

615.324324

AST

P 9

**PENGARUH JUS *Aloe vera* TERHADAP
PROLIFERASI LIMFOSIT, PRODUKSI *REACTIVE OXYGEN*
INTERMEDIATE DAN KOLONI KUMAN ORGAN HEPAR
MENCIT Balb/c YANG DIINFEKSI *Salmonella typhimurium***

**The Effects of *Aloe vera* Juice on Lymphocyte Proliferation,
Reactive Oxygen Intermediate Production and Bacterial Colonies in the Liver
of *Salmonella typhimurium* Infected Balb/c Mice**



TESIS

**untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Sarjana S-2**

Magister Ilmu Biomedik

**IKE IRMAWATI PURBO ASTUTI
G4A002032**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
DESEMBER 2004**

TESIS

**PENGARUH JUS *Aloe vera* TERHADAP
PROLIFERASI LIMFOSIT, PRODUKSI *REACTIVE OXYGEN
INTERMEDIATE* DAN KOLONI KUMAN ORGAN HEPAR
MENCIT Balb/c YANG DIINFEKSI *Salmonella typhimurium***

Oleh

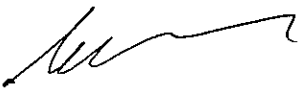
Ike Irmawati Purbo Astuti
G4A002032

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 24 Desember 2004
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

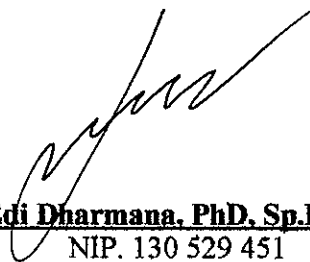
Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Pembimbing Utama :

Pembimbing Kedua :



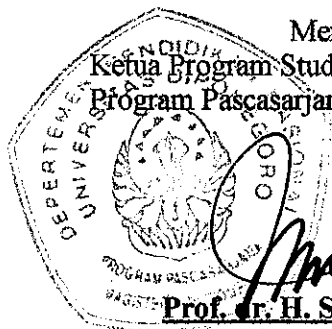
Prof. Dr. dr. H. Tjahjono, SpPA(K), FIAC
NIP. 130 368 076



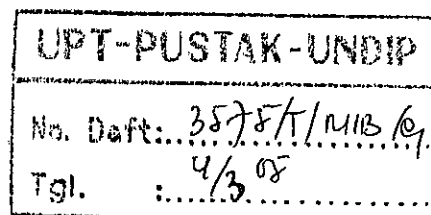
dr. Edi Dharmana, PhD, Sp.ParK
NIP. 130 529 451

Mengetahui :

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Program Pascasarjana Universitas Diponegoro



Prof. dr. H. Soebowo, SpPA (K)
NIP. 130 352 549



PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam tesis ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Semarang, Desember 2004

Ike Irmawati P.A

RIWAYAT HIDUP

Nama : Ike Irmawati Purbo Astuti, S.Si

Tempat/tanggal lahir : Cilacap, 21 Oktober 1977

Jenis kelamin : Perempuan

RIWAYAT PENDIDIKAN

1. SD Negeri Tambakreja III Cilacap 1983 - 1989
2. SMP Negeri I Cilacap 1989 - 1992
3. SMA Negeri I Cilacap 1992 - 1995
4. Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman 1995 - 2000
5. Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana UNDIP 2002 - 2004

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT karena hanya dengan berkah, rahmat dan anugerah-Nya sehingga tesis dengan judul “ Pengaruh Jus *Aloe vera* terhadap Proliferasi Limfosit, Produksi *Reactive Oxygen Intermediate* dan Koloni Kuman Organ Hepar Mencit Balb/c Yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*” ini dapat selesai tepat pada waktunya.

Pada kesempatan ini pula penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada :

1. Direktur Program Pascasarjana Universitas Diponegoro yang memberikan kesempatan kepada penulis untuk meningkatkan ilmu pengetahuan.
2. Prof. dr. H. Soebowo, Sp.PA (K) sebagai Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Pascasarjana UNDIP beserta seluruh staf yang telah mengajarkan keilmuannya.
3. Prof. Dr. dr. H. Tjahjono, Sp.PA (K), FIAC dan dr. Edi Dharmana, MSc, PhD, Sp.ParK selaku pembimbing yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga dan pikirannya serta memberikan pengarahan cakrawala baru untuk maju.
4. dr. Neni Susilaningsih, MSi sebagai konsultan penelitian dibidang imunologi yang dengan penuh kesabaran selalu memberikan bimbingan dan pengarahan selama pelaksanaan penelitian laboratoris.
5. Para nara sumber dan tim penguji yang telah berkenan memberikan petunjuk, saran dan arahan dalam pelaksanaan penelitian hingga penulisan tesis untuk mencapai hasil yang baik.

6. Pimpinan dan staf laboratorium Bioteknologi, laboratorium Mikrobiologi Kedokteran dan laboratorium Biokimia FK UNDIP yang telah membantu pelaksanaan teknis laboratoris dan memberi kesempatan memanfaatkan fasilitas laboratorium untuk penelitian tesis.
7. Ayah dan ibu serta adik-adik atas doa restu, dorongan semangat dan materinya.
8. Rekan-rekan seperjuangan (Suharni, Bahrudin, mb: Tatik, Emma, Isti, Arina), mb Nata, mas Dul dan semua pihak yang telah memberikan dukungan dan bantuan selama pendidikan dan penelitian hingga selesai penulisan tesis ini.

Akhir kata dengan segala kerendahan hati penulis mohon maaf bila terdapat kata-kata yang kurang berkenan dalam penulisan tesis ini dan semoga Allah SWT memberikan balasan dan karunia-Nya pada kita semua. Semoga tesis ini bermanfaat dan dapat menambah pengetahuan bagi yang membutuhkan.

Semarang, Desember 2004

Penulis

DAFTAR ISI

	halaman
Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Halaman Pernyataan	iii
Riwayat Hidup	iv
Kata Pengantar	v
Daftar Isi	vii
Daftar Tabel	ix
Daftar Gambar	x
Daftar Lampiran	xi
Abstrak	xii
Abstract	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
Latar Belakang	1
Perumusan Masalah	5
Tujuan Penelitian	5
Manfaat Penelitian	6
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	7
Respon Imun Tubuh	7
Organ Limfoid	8
Pemrosesan dan Presentasi Antigen	10
Aktivasi Makrofag	10
<i>Salmonella typhi</i>	12
Aspek Bakteriologi	12
Patogenesis pada Manusia	13
Patogenesis oleh <i>Salmonella typhimurium</i>	15
Imunitas terhadap <i>Salmonella typhi</i>	17
<i>Reactive Oxygen Intermediate</i>	21
Sel T dan Sel B	25
<i>Aloe vera</i>	31
Sinonim dan Taksonomi	31
Morfologi Tumbuhan	31
Kandungan Kimia	31
Sediaan <i>Aloe vera</i>	34
Efek Farmakologi <i>Aloe vera</i>	35
Efek <i>Aloe vera</i> terhadap Sistem Imun	36
BAB 3. KERANGKA TEORI, KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	38
Kerangka Teori	38
Kerangka Konsep	40
Hipotesis	41

BAB 4. METODE PENELITIAN	42
Rancangan Penelitian	42
Populasi dan Sampel	43
Variabel Penelitian	45
Bahan dan Reagen Penelitian	46
Alat/Instrumen Penelitian	47
Tempat dan Waktu Penelitian	47
Prosedur Pengumpulan Data	47
Alur Kerja Penelitian	50
Prosedur pemeriksaan	51
Prosedur Pengambilan Sampel dari Hewan Percobaan	51
Pemeriksaan Proliferasi limfosit	52
Pemeriksaan ROI dengan Cara Reduksi NBT	53
Pemeriksaan Koloni Kuman Organ Hepar	55
Analisis Data	56
 BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	 57
Hasil	57
Pembahasan	67
 BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	 73
 BAB 7. RINGKASAN	 75
 DAFTAR PUSTAKA	 79
 LAMPIRAN	 87

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 1. Hasil analisis berat limpa	57
Tabel 2. Hasil analisis jumlah limfosit	58
Tabel 3. Hasil Uji <i>Mann Whitney U</i> jumlah limfosit	60
Tabel 4. Hasil analisis jumlah relatif limfoblas	60
Tabel 5. Hasil <i>Post Hoc Test (Uji Bonferroni)</i> jumlah relatif limfoblas	62
Tabel 6. Hasil analisis produksi ROI makrofag	63
Tabel 7. Hasil Uji <i>Mann Whitney U</i> produksi ROI makrofag	64
Tabel 8. Hasil analisis hitung kuman	65
Tabel 9. Hasil Uji <i>Mann Whitney U</i> hitung kuman	66

DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 1. Tahap-tahap pematangan limfosit	9
Gambar 2. Interaksi antara ROI dan NO	23
Gambar 3. Grafik <i>boxplot</i> berat limpa	57
Gambar 4. Grafik <i>boxplot</i> jumlah limfosit	59
Gambar 5. Grafik <i>boxplot</i> jumlah relatif limfoblas	61
Gambar 6. Grafik <i>boxplot</i> produksi ROI makrofag	63
Gambar 7. Grafik <i>boxplot</i> hitung kuman	65

DAFTAR LAMPIRAN

	halaman
Lampiran 1. Foto respon proliferasi limfosit di limpa	87
Lampiran 2. Foto produksi ROI makrofag (superoksid)	88
Lampiran 3. Data hasil pemeriksaan laboratoris	90
Lampiran 4. Hasil analisis statistik	91

**PENGARUH JUS *Aloe vera* TERHADAP
PROLIFERASI LIMFOSIT, PRODUKSI *REACTIVE OXYGEN
INTERMEDIATE* DAN KOLONI KUMAN ORGAN HEPAR
MENCIT Balb/c YANG DIINFEKSI *Salmonella typhimurium***

ABSTRAK

Latar Belakang : Demam tifoid merupakan penyakit paling serius yang disebabkan oleh serovar *Salmonella*, terjadi di seluruh bagian dunia, termasuk di Indonesia. Bakteri intraseluler ini mampu menstimulasi respon imun tubuh, terutama respon imun seluler. *Aloe vera* merupakan tanaman obat tradisional yang mengandung banyak komponen aktif diantaranya *acemannan*, mampu berperan sebagai imunomodulator.

Tujuan : Penelitian ditujukan untuk mengetahui pengaruh jus *A. vera* terhadap respon proliferasi limfosit, produksi ROI makrofag dan koloni kuman organ hepar mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Metoda : Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan *the post test only control group design* menggunakan mencit Balb/c betina berusia 8-10 minggu dan diadaptasikan selama 1 minggu. Jumlah mencit yang dipergunakan sebanyak 24 ekor yang secara acak dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu : kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan (P) yang diberi jus *A. vera* yaitu P1 (0,1 ml/hari), P2 (0,3 ml/hari) dan P3 (0,5 ml/hari) selama 9 hari peroral. Pada hari ke-6 semua mencit diinfeksi 10^5 CFU *S. typhimurium* intraperitoneal. Hari ke-10 mencit dibunuh dan dilakukan pemeriksaan respon proliferasi limfosit (berat limpa, jumlah limfosit dan jumlah relatif limfoblas), produksi ROI makrofag dan jumlah koloni kuman kultur organ hepar. Hasil pemeriksaan dianalisis dengan uji ANOVA dan uji *Kruskal Wallis* dengan batas signifikansi (α) = 0,05.

Hasil : Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian jus *A. vera* tidak dapat meningkatkan berat limpa ($p= 0,705$) tetapi dapat meningkatkan jumlah limfosit pada P2 dan P3 ($p= 0,004$) secara bermakna, sedangkan pada P1 ($p= 0,337$) cenderung meningkat tetapi tidak berbeda bermakna dibanding kontrol. Pemberian jus *A. vera* juga meningkatkan jumlah relatif limfoblas pada P2 ($p= 0,011$) dan P3 ($p= 0,002$) secara bermakna, sedang pada P1 ($p= 1,000$) meningkat tapi tidak berbeda bermakna. Produksi *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) makrofag meningkat secara bermakna dibanding kontrol pada semua kelompok yang di beri jus *A. vera* yaitu P1 ($p= 0,003$), P2 ($p= 0,004$) dan P3 ($p= 0,003$). Hitung kuman menurun secara bermakna pada semua kelompok yang diberi jus *A. vera* dibanding kontrol yaitu P1 ($p= 0,037$), P2 ($p= 0,004$) dan P3 ($p= 0,004$).

Kesimpulan : Pemberian jus *A. vera* pada mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium* tidak meningkatkan berat limpa secara bermakna tetapi mampu meningkatkan jumlah limfosit, jumlah relatif limfoblas dan produksi ROI makrofag secara bermakna, serta mampu menurunkan hitung kuman organ hepar secara bermakna.

Kata kunci : Jus *A. vera*, respon proliferasi limfosit, ROI, hitung kuman, *Salmonella typhimurium*.

**The Effects of *Aloe vera* Juice on Lymphocyte Proliferation,
Reactive Oxygen Intermediate Production and Bacterial Colonies in the Liver
of *Salmonella typhimurium* Infected Balb/c Mice**

ABSTRACT

Background : Typhoid fever is serious illness caused by *Salmonella typhimurium* spread in the world such as Indonesia. This intracellular bacteria can stimulate immunity respon in the body such as cellular mediated immunity. *Aloe vera* is one of traditional herbal medicine which contains various active compounds like acemannan with immunomodulatory effect.

Objective : This research was aimed to examine the effect of *Aloe vera* juice on lymphocyte proliferation, reactive oxygen intermediate production and bacterial colony in liver of Balb/c mice infected with *Salmonella typhimurium*.

Method : This study was experimental study, using *the post test only control group design* in Balb/c female mice, 8-10 weeks and adapted for 1 week. Twenty four mice randomly divided into 4 groups : control group (K) and the 3 group was given *A. vera* juice, 0,1ml/day (P1), 0,3 ml/day (P2) and 0,5 ml/day (P3) for 9 days. All groups were infected with dosage 10^5 cfu of *S. typhimurium* at 6th days. Samples were executed on 10th days for laboratory test : lymphocyte proliferation, ROI production and bacterial growth of the liver. Collected data were analyzed by using *ANOVA* and *Kruskal Wallis test* with significance $p < 0,05$.

Result : The result showed that *A. vera* juice did not increase spleen weight ($p = 0,705$), but increased the count of lymphocyte significantly for P2 and P3 ($p = 0,004$), whereas P1 ($p = 0,337$) increased but not significant with control. The relative count of lymphoblast increased significantly in P2 ($p = 0,011$) and P3 ($p = 0,002$), but in P1 ($p = 1,000$) increased but not significant. ROI production of macrophage increased significantly in 3 group treatment with *A. vera* juice: P1 ($p = 0,003$), P2 ($p = 0,004$) dan P3 ($p = 0,003$). *A. vera* juice decreased bacterial count of liver significantly compared with control group : P1 ($p = 0,037$), P2 ($p = 0,004$) dan P3 ($p = 0,004$).

Conclusion : *A. vera* juice administration in Balb/c mice infected with *S. typhimurium* can not increases spleen weight but is able to increase lymphocyte number, the relative count of lymphoblast, ROI production and could reduced the bacterial count in the liver significantly.

Key word : *A. vera* juice, lymphocyte proliferation, ROI, bacterial count, *Salmonella typhimurium*.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

Demam tifoid merupakan penyakit paling serius yang disebabkan oleh serovar *Salmonella*, terjadi di seluruh bagian dunia, diperkirakan 16,6 juta kasus terjadi per tahun di negara-negara berkembang termasuk di Indonesia.¹ *S. typhimurium* merupakan agen yang bertanggung jawab terhadap salmonellosis pada mencit, penyakit yang analog dengan demam tifoid yang disebabkan oleh *S. typhi* pada manusia.²

Infeksi *Salmonella* pada hewan juga umum terjadi dan diyakini menjadi faktor utama dalam pemindahan *Salmonella* ke manusia lewat rantai makanan.³ Setelah masuk lewat oral, *S. typhimurium* melewati epitel intestin dan masuk *Peyer's Patches (PP)*. Dari sini, bakteri menyebar lewat nodus limfatikus mesentrik ke limpa dan hepar, di mana mereka mampu bereplikasi dan menyebabkan penyakit serius. Bakteri ini dapat menginfeksi dan survival pada tipe sel berbeda, yakni makrofag dan hepatosit.⁴

S. typhimurium merupakan bakteri gram negatif yang mempunyai faktor virulensi utama berupa lipopolisakarida (LPS) yang dapat menstimulasi respon imun pada inang.⁵ Dalam menghadapi bakteri intraseluler ini, sistem imun terutama menanganinya dengan respon imun seluler (*cell mediated immunity : CMI*). Makrofag merupakan eksekutor non-spesifik dan sel T merupakan mediator spesifik untuk menghancurkan mikroba intraseluler yaitu melalui 2 jenis reaksi

yang terjadi : (1). Fagositosis oleh makrofag yang teraktivasi melalui sitokin terutama IFN- γ yang diproduksi sel T, (2). Lisis sel yang terinfeksi oleh T CD8⁺ ^{6,7}

Antigen mikroba intraseluler ini akan diproses oleh makrofag sebagai *antigen presenting cell (APC)* menjadi peptida-peptida kecil yang imunogenik sebelum dipresentasikan dan dapat dikenal oleh sel T melalui molekul *Major Histocompatibility Complex (MHC)*.⁷ Selanjutnya sel T akan memproduksi limfokin yaitu IFN- γ yang dapat meningkatkan aktivasi makrofag dalam melakukan mekanisme *killing* terhadap *Salmonella*.⁸

Makrofag mampu menghancurkan bakteri yang terfagosit dengan membentuk fagolisosom. Bersamaan dengan itu, adanya ikatan antara mikroba dengan reseptor fagosit, maka reseptor akan mengirim sinyal yang mengaktivasi beberapa enzim dalam fagolisosom yang penting untuk terjadinya *respiratory burst*.⁹ *Respiratory burst* ini antara lain terdiri dari *reactive oxygen (ROI)* dan *reactive nitrogen intermediate (RNI)* yang bersifat toksik bagi mikroba. Akan tetapi *Salmonella* mampu bertahan hidup dalam makrofag. Kemampuan ini merupakan strategi pertahanan mikroba dan penting untuk virulensi.¹⁰

Untuk melawan bakteri intraseluler yang mampu bertahan di dalam sel makrofag, diperlukan imunostimulan untuk meningkatkan kemampuan makrofag dalam mengeliminasi bakteri tersebut. Salah satu tanaman yang dapat berperan sebagai imunomodulator terutama sebagai imunostimulan yaitu *Aloe vera* ¹¹ atau yang di Indonesia dikenal sebagai tanaman lidah buaya. *A. vera* ini biasanya diolah dalam bentuk aloe gel, aloe gel konsentrat, aloe gel bubuk maupun dalam bentuk jus.

Pengobatan rakyat dengan menggunakan jus *A. vera* sebagai penyembuh yang unik telah dipergunakan lebih dari ribuan tahun. Jus Aloe dibuat dari bagian dalam daun, sedangkan ekstrak *A. vera* dibuat dengan menjadikan bubuk seluruh daunnya. Jus *A. vera* antara lain mengandung enzim, asam amino dan vitamin. Jus ini dapat membantu sistem pencernaan dan mengurangi resiko kanker paru-paru serta dapat menstimulasi sistem imun dengan menurunkan gejala alergi dan signifikan menurunkan infeksi saluran pernapasan.¹¹ Pemakaian sediaan *A. vera* dalam bentuk jus ini diharapkan dapat mendapatkan sebagian besar substansi biologik aktif pada *A. vera* yang dibutuhkan untuk mencapai manfaat akhir yang maksimal.

A. vera memiliki aktivitas imunomodulator diantaranya : 1. menghambat aktivitas komplemen melalui jalur alternatif, 2. menghambat opsonisasi zymosan, 3. sebagai adjuvant dalam produksi antibodi spesifik, dan 4. menginduksi reaksi DTH pada mencit.¹²

Komponen *A. vera* antara lain vitamin, enzim, mineral, polisakarida, *anthraquinones*, lignin, saponin, asam lemak, asam salisilat dan asam amino.¹³ Berbagai hasil penelitian menunjukkan *A. vera* ini mempunyai aktivitas anti-inflamasi, anti-viral, anti-bakteri, anti-jamur, anti-kanker, anti-diabetik, peningkat imunitas dan penting dalam penyembuhan luka.^{14,15} *A. vera* diketahui mampu pula untuk menghambat reproduksi virus HIV dan herpes.¹⁴ *A. vera* memodulasi beberapa aspek sistem imun, memicu aktivitas monosit dan makrofag dan memblokir produksi leukotrin dan prostaglandin. Salah satu komponen *A. vera* yaitu polisakarida *acemannan*, mempunyai efek anti-neoplastik dan modulasi sistem imun. Pada studi manusia, *acemannan* mampu meningkatkan respon

limfosit terhadap allogen dengan meningkatkan pelepasan IL-1 oleh monosit.¹² Sehingga dalam penelitian ini akan diteliti mengenai pengaruh *A. vera* terhadap respon proliferasi limfosit. Penelitian lain pada sel makrofag tikus, *acemannan* dapat menstimulasi produksi sitokin makrofag (IL-6, TNF- α), produksi NO, ekspresi molekul permukaan dan perubahan morfologi sel.¹² Studi pada kanker, *A. vera* dapat mengaktifkan sistem imun dengan cara mengaktivasi makrofag untuk melepas interferon, interleukin dan TNF.¹⁶ Stimulasi *acemannan* terhadap makrofag dilakukan melalui reseptor mannan pada permukaan sel makrofag. Pada sel target *Candida albicans*, dapat meningkatkan *respiratory burst*, fagositosis dan aktivitas *killling*.¹² Hasil dari *respiratory burst* diantaranya yaitu ROI, oleh karena itu pengaruh pemberian jus *A. vera* ini terhadap pembentukan ROI pada infeksi oleh *Salmonella typhimurium* akan diteliti. Respon-respon imun yang terjadi tersebut diharapkan dapat untuk melihat bagaimana efeknya pada pertumbuhan bakteri tersebut di organ seperti hepar setelah perlakuan dengan *A. vera*.

Penelitian dengan menggunakan *A. vera* sebagai antimikroba secara in vitro dan untuk pemakaian topikal telah banyak dilakukan, tetapi aktivitasnya sebagai stimulator sistem imun terhadap infeksi oleh *S. typhimurium* secara in vivo belum pernah dilaporkan. Berdasarkan pada beberapa fakta tersebut diatas, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh jus *A. vera* terhadap respon proliferasi limfosit, produksi *reactive oxygen intermediate* (ROI) makrofag dan jumlah koloni kuman kultur organ hepar pada mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium*.

1.2. PERUMUSAN MASALAH

Apakah pemberian jus *A. vera* mampu meningkatkan respon proliferasi limfosit, produksi ROI makrofag dan jumlah koloni kuman organ hepar mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium* dibandingkan dengan yang tidak diberi jus tersebut ?

1.3. TUJUAN PENELITIAN

1.3.1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan mengetahui respon proliferasi limfosit, produksi ROI makrofag dan jumlah koloni kuman kultur hepar pada mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium* pada pemberian berbagai dosis jus *A. vera* dibandingkan dengan yang tidak diberi jus tersebut.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Mengetahui respon proliferasi limfosit yang meliputi berat limpa, jumlah limfosit dan jumlah relatif limfoblas pada kelompok mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium* dan diberi berbagai dosis jus *A. vera* dibandingkan dengan yang tidak diberi jus tersebut.
2. Mengetahui respon produksi ROI makrofag pada kelompok mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium* dan diberi berbagai dosis jus *A. vera* dibandingkan dengan yang tidak diberi jus tersebut.

3. Mengetahui jumlah koloni kuman pada kultur hepar pada kelompok mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium* dan diberi berbagai dosis jus *A. vera* dibandingkan dengan yang tidak diberi jus tersebut.

1.4. MANFAAT PENELITIAN

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan rujukan untuk mengetahui peranan *A. vera* sebagai tanaman yang mempunyai efek imunomodulator terhadap sistem imun tubuh dalam mengeliminasi patogen intraseluler terutama *Salmonella*. Karena penelitian ini bersifat eksperimental pada hewan coba, diharapkan hasilnya dapat memberikan informasi dan landasan bagi penelitian selanjutnya, terutama untuk uji preklinik.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Respon Imun Tubuh

Tubuh memiliki suatu sistem yang disebut sistem imun yang memberikan respon dan melindungi tubuh terhadap unsur-unsur patogen yang ada di lingkungan.⁶ Pertahanan imun terdiri dari sistem imun alamiah atau non-spesifik (*innate/natural*) dan sistem imun didapat atau spesifik (*adaptive/acquired*). Antara ke dua sistem tersebut ada kerja sama yang erat, yang satu tidak dapat dipisahkan dari yang lain.⁷

Respon imun natural (*innate*) memberikan sinyal yang hubungannya dengan antigen berfungsi untuk menstimulasi proliferasi dan diferensiasi dari limfosit T yang spesifik antigen. Imunitas natural berperan sebagai inisiasi sinyal peringatan bagi sistem imun adaptif untuk memberikan respon protektif terhadap inang. Molekul yang diproduksi selama reaksi imun natural yang berfungsi sebagai sinyal kedua untuk aktivasi limfosit yaitu kostimulator, sitokin dan produk pecahan dari komplemen.⁵

Kostimulator merupakan protein membran yang diekspresikan pada APC yang berfungsi bersama-sama dengan antigen untuk menstimulasi limfosit T spesifik, seperti protein B7 yang dikenal oleh reseptor CD28 pada sel T. Ketika APC menjumpai produk mikrobial seperti LPS dan IFN- γ yang diproduksi sel NK, APC merespon dengan mengekspresikan protein B7 pada level tinggi dan kemudian mampu untuk menstimulasi respon sel T. Dalam respon terhadap mikroba, makrofag dan sel dendritik juga memproduksi sitokin misalnya IL-12

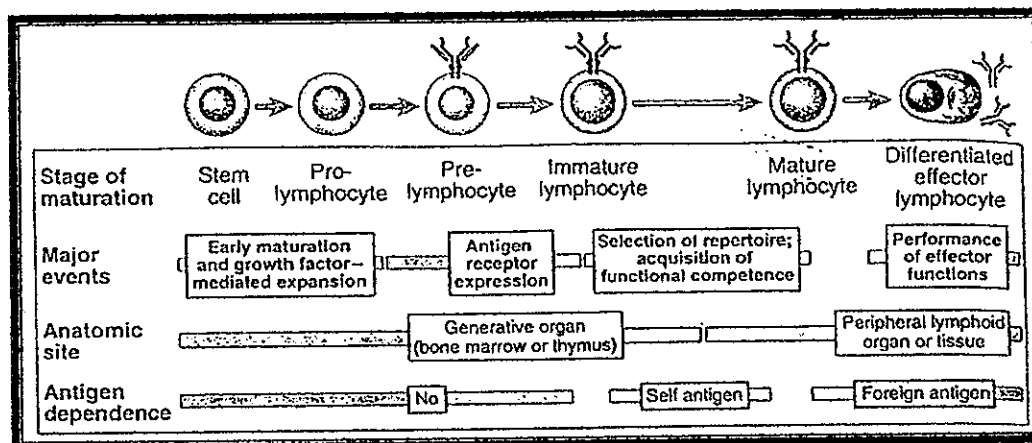
yang memicu pertumbuhan dan diferensiasi limfosit T. IL-12 menstimulasi limfosit T naïf berkembang menjadi sel efektor Th1 yang memproduksi IFN- γ . Pada infeksi oleh mikroba intraseluler, makrofag memfagositosis atau mengenal mikroba dan merespon dengan mengekspresikan kostimulator dan produksi sitokin yang menstimulasi *T cell-mediated immunity*. Fungsi utama respon CMI ini adalah untuk mengaktivasi makrofag untuk membunuh mikroba intraseluler.⁵

2.1.1. Organ Limfoid

Di dalam organ limfoid; terjadi interaksi antara limfosit dengan sel non limfoid yang penting untuk perkembangan limfosit, untuk inisiasi respon imun adaptif maupun untuk pemeliharaan limfosit. Organ limfoid dapat dibagi menjadi dua yaitu organ limfoid primer terdiri dari sumsum tulang (*bone marrow*) dan timus, dimana limfosit dibentuk dan organ limfoid perifer/ sekunder, di mana respon imun adaptif diinisiasi dan limfosit dipelihara. Limfosit B dan T berasal dari sumsum tulang tetapi hanya sel B yang matur di sana sedangkan sel T bermigrasi dan matur di timus. Setelah maturasi, kedua limfosit tersebut masuk ke dalam aliran darah bermigrasi ke organ limfoid perifer seperti limpa, nodus limfatikus dan jaringan limfoid mukosal. Di dalam organ limfoid perifer, sel khusus seperti sel dendritik mempresentasikan antigen pada limfosit. Sel T naïf yang berjumpa dengan antigen akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel efektor spesifik antigen, sedangkan sel B berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel pensекреksi antibodi.¹⁷

Saat pengenalan terhadap antigen spesifik, limfosit yang berada dalam fase G0 siklus sel berhenti bermigrasi, membesar dan masuk fase G1. Kromatin di dalam nukleusnya menjadi kurang padat, nukleoli terlihat, volume nukleus dan

sitoplasma meningkat dan RNA serta protein baru disintesis. Dalam beberapa jam, sel telah lengkap berdiferensiasi dan dikenal sebagai limfoblas. Limfoblas selanjutnya mulai membelah, sehingga satu limfosit naif menghasilkan klon sekitar 1000 sel anak dengan spesifitas yang identik dan kemudian berdiferensiasi menjadi sel efektor.^{6,17} Limfosit juga mengekspresikan reseptor baru yang memungkinkan mereka merespon sitokin dari sel lain, yang merupakan sinyal proliferasi. Limfosit juga mulai mensekresi sitokin sendiri.¹⁸ Sel T efektor mampu menghancurkan sel terinfeksi atau mengaktifasi sel-sel lain dari sistem imun. Setelah limfosit naif diaktivasi, memerlukan 4 sampai 5 hari sebelum ekspansi klonal dan limfosit telah berdiferensiasi menjadi sel efektor. Limfosit ini dapat membentuk sel memori yang dapat memberikan respon yang efektif terhadap infeksi sekunder dari antigen yang sama.¹⁷ Perkembangan sel limfosit seperti terlihat pada gambar 1.⁵



Gambar 1. Tahap-Tahap Pematangan Limfosit

(Diambil dari Abbas AK, Lichmant AH. Cellular and Molecular Immunology. Fifth edition. Philadelphia; Saunders, 2003 : 130)⁵

2.1.2. Pemrosesan dan Presentasi Antigen

Respon Imun spesifik dimulai dengan aktivitas *antigen-presenting cell* (APC) yang memproses antigen demikian rupa sehingga dapat menimbulkan interaksi dengan sel-sel sistem imun spesifik. Dengan rangsangan antigen yang telah diproses tadi, sel-sel sistem imun berproliferasi dan berdiferensiasi sehingga menjadi sel-sel yang memiliki kompetensi imunologik dan mampu bereaksi dengan antigen. Dalam mengenali antigen secara spesifik, ada 3 macam molekul pengikat antigen (*antigen binding molecules*) yang terlibat, yaitu reseptor antigen pada permukaan sel B (sIg), reseptor antigen pada sel T (TCR) dan molekul MHC kelas I dan II.⁶

Sel T mengenal antigen hanya jika bersama-sama dengan molekul MHC yang berada pada permukaan sel lain. Tahap awal dalam respon imun mengikuti masuknya antigen meliputi penangkapan dan pemrosesan antigen oleh APC dan presentasi hasil prosesing antigen yang berhubungan dengan molekul MHC kelas II ke subset sel T yang disebut sel T helper (Th). Meskipun semua sel somatik mengekspresikan protein MHC kelas I, relatif kecil tipe sel yang mengekspresikan protein kelas II, yaitu meliputi makrofag, sel dendritik pada jaringan limfoid, sel *Langerhans* pada kulit, sel *Kupffer's* pada hepar dan sel mikroglial pada jaringan sistem saraf pusat. Sel B, prekursor sel pensекреksi antibodi juga mengekspresikan molekul MHC kelas II. Makrofag memainkan peran dominan sebagai APC dalam inisiasi respon imun primer, sedangkan sel B dominan pada respon sekunder.¹⁹

2.1.3. Aktivasi Makrofag

Sel monosit setelah 24 jam akan bermigrasi dari peredaran darah ke tempat tujuan di berbagai jaringan dan disana berdiferensiasi sebagai makrofag. Sel

tersebut disebut *fixed macrophage* dan berbentuk khusus yang tergantung dari jaringan yang ditempati. Sel *Kupffer* di hepar berupa sel yang besar dengan banyak proyeksi sitoplasma. Makrofag peritoneal bebas dalam cairan peritoneum. Kehadirannya sepanjang kapiler memungkinkan untuk menangkap patogen dan antigen yang masuk tubuh. Pencernaan dan adheren oleh makrofag dipermudah melalui reseptor pada permukaan sel untuk fraksi Fc dari IgG dan komplemen seperti C3b. Makrofag juga mempunyai reseptor untuk interferon, *Migration Inhibition Factor (MIF)*, *Macrophage Activating Factor (MAF)* serta reseptor yang mengenal non-self seperti reseptor manosa, *scavenger receptor* dan *toll receptor*. Menurut fungsinya, makrofag dapat dibagi menjadi 2 golongan yaitu sebagai fagosit profesional dan sebagai APC.^{6,7}

Makrofag diaktivasi oleh produk mikrobial seperti LPS dan oleh IFN- γ yang dihasilkan sel NK. Proses aktivasi makrofag memicu aktivasi faktor transkripsi, transkripsi berbagai gen dan sintesis protein yang memperantarai fungsi sel ini. Pada imunitas CMI adaptif, makrofag sebagai efektor diaktivasi oleh stimuli dari limfosit T (ligand CD40 dan IFN- γ).⁵

Fagosit profesional berkembang sebagai sel khusus dalam pertahanan menghadapi mikroba penginvasi. Ada 2 tipe utama fagosit profesional yaitu granulosit dan makrofag. Elemen kunci yang memungkinkan proses fagositosis adalah *actin sitoskeleton*, sedangkan proses fagositosis itu sendiri meliputi proses kemotaksis yang menarik fagosit mendatangi mikroba penginfeksi, *adherens* (penempelan) membran plasma fagosit ke permukaan mikroba, *ingesti* (penelanan) mikroba dengan membentuk pseudopod dan fagosom, dan proses *digesti* (pencernaan) mikroba dalam fagolisosom oleh enzim pencernaan dan substansi

bakterisidal. Mekanisme *killing* dari fagosit dibagi secara klasik dalam mekanisme yang tergantung oksigen dilakukan oleh *NADPH oksidase* fagosit dengan produk reaksinya sebagai spesies oksigen reaktif dan yang tidak bergantung oksigen dengan pelepasan eksositosis protein mikrobisidal ke lumen fagosom. Disamping membentuk produk toksik, fagosit profesional mempunyai mekanisme kuat untuk mengubah lingkungan ionik dalam fagosom untuk mencegah survivalnya mikroba.^{20,21}

2.2. *Salmonella typhi*

2.2.1. Aspek Bakteriologi

Salmonella merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang yang termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae*, genus *Salmonellae* ini terdiri lebih dari 2300 serovar. *Salmonella* bersifat sangat motil dan patogenik, dengan karakteristik pertumbuhan yaitu menghasilkan asam pada fermentasi glukosa, mereduksi nitrat menjadi nitrit, negatif oksidase, positif katalase, tidak membentuk spora dan fakultatif anaerobik.^{22,23} Semua *Salmonella* tumbuh pada media sederhana, akan tetapi umumnya dikultur pada medium selektif seperti *Salmonella-Shigella* agar, untuk memisahkan pertumbuhan *Salmonella* dengan bakteri enterik lain.⁴

Salmonella dibagi menjadi serovar berdasarkan pada deteksi 3 antigen utama yaitu antigen O somatik, antigen Vi permukaan dan antigen H flagellar. Pada umumnya, laboratorium klinik membagi *Salmonella* dalam serogrup (A, B, C1, C2, D dan E) berdasarkan pada reaktivitas antisera antigen O somatik.²² Diantara *Salmonella*, hanya *S. typhi* dan *S. paratyphi C* yang mempunyai antigen K (polisakarida) yang disebut antigen Vi, disamping antigen O (oligosakarida), antigen H (protein), dan kompleks makromolekul LPS yang disebut endotoksin

yang membentuk bagian luar dinding sel. Endotoksin ini tersusun atas tiga lapisan: bagian luar (O-oligosakarida), bagian tengah (R-pusat) dan bagian dasar (lapisan lipid A).⁴

2.2.2. Patogenesis pada Manusia

Salmonella ini mampu beradaptasi dan tumbuh pada inang manusia dan hewan dan menyebabkan penyakit dengan spektrum yang luas. Serotipe *Salmonella* yang meliputi *S. typhi* dan *S. paratyphi* menyebabkan demam tifoid dan menginfeksi hanya pada manusia. Sedangkan serotip *Salmonella* yang lain merupakan *Salmonella* non tifoid yang banyak terdapat pada saluran gastrointestinal pada banyak hewan, meliputi mamalia, reptil, burung dan insekta.^{4,22}

Di Indonesia, umumnya demam tifoid yang disebabkan oleh *S. typhi* dan *S. typhimurium* banyak terjadi pada musim penghujan terutama di daerah dengan tingkat sanitasi rendah dan daerah banjir. Penularan umumnya melalui makanan ataupun minuman yang tercemar oleh agen penyakit tersebut, penanganan yang kurang higienis ataupun dari sumber air yang digunakan untuk mencuci. Gejala yang timbul yaitu berupa demam tinggi berfluktuasi, mual, muntah, nyeri kepala hebat, nyeri perut yang diawali sembelit dan kadang diikuti diare bercampur darah.^{10,24,25}

Salmonella yang masuk lewat oral, kemudian melewati saluran gastrointestinal. Setelah mencapai usus halus, bakteri ini melawan berbagai faktor imun natural sebelum berpenetrasi ke lapisan mukus. Saat masuk ke inang yang potensial, berbagai interaksi diinisiasi. Spesies *Salmonella* patogenik mempunyai urutan gen invasi yang menghasilkan protein yang disekresi oleh bagian sekresi

khusus tipe III. Protein ini digunakan oleh bakteri untuk penetrasi ke mukosa intestinal dengan invasi dan menghancurkan epitel khusus pada sel M dari *Peyer's patches*. Respon inang terhadap aksi ini dengan sel-sel fagosit nonspesifik dan respon inflamasi sebaik seperti aktivasi respon imun selular spesifik dan humoral.²⁶

Pada demam tifoid, *Salmonella* mampu melewati pertahanan intestinal, dimana fagositosis oleh makrofag dihasilkan dalam penyebarannya ke dalam sistem retikuloendotelial. Setelah terfagosit, *Salmonella* tersebar dalam tubuh pada makrofag lewat limfatik dan membentuk kolonisasi pada jaringan retikuloendotelial (hepar, limpa, nodus limfatikus dan sumsum tulang), sehingga bakteri ini terlindung dari sel *polymorphonuclear leucocytes (PMN)*, sistem komplemen dan respon imun adaptif yang berupa antibodi.²²

Salah satu faktor virulen utama dari *Salmonella* adalah lipopolisakarida (LPS), merupakan komponen membran luar dari bakteri gram negatif. Struktur LPS terdiri dari tiga daerah : *O-specific polysaccharide*, *core polysaccharide*, dan *lipid A*. Rantai samping O menambah virulensi bakteri. Daerah lipid A memprasaranaikan paling banyak efek biologi LPS, meliputi induksi sitokin (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α dari sel mononuklear).²⁷

Dengan struktur LPS yang lengkap, mungkin lebih resistan terhadap enzim yang memproses antigen dan mungkin memperlambat pemrosesan atau merintangikan fungsi dari epitop tertentu. Hal ini mungkin merintangikan aktivasi sel-sel T dan ini merupakan bagian virulensi dari *Salmonella*. Sel T CD4⁺ kurang responsif terhadap *wild-type Salmonella* dibanding terhadap strain avirulen in vitro, karena sel-sel T tidak merespon secara langsung terhadap LPS dan karena sel-sel T CD4⁺ umumnya mengenali epitop peptida, ini memungkinkan bahwa LPS mempengaruhi

pembentukan epitop peptida pada tingkat makrofag. *Salmonella* terikat pada protein pengikat LPS, yang mengikat pada reseptor CD14 pada makrofag.¹⁷ Polisakarida diperlihatkan ikut serta dalam presentasi antigen yang terbatas pada MHC II. Epitop protein terlindungi dari proteolisis dalam endosom oleh LPS, karena protein membran luar berhubungan dengan LPS dan terikat erat pada LPS. Strain yang mempunyai struktur LPS yang lengkap resisten terhadap lisis jalur komplemen *membrane attack complex (MAC)* karena berkumpulnya kompleks tersebut pada permukaan membran dicegah oleh LPS. Hal ini menggambarkan bahwa LPS dapat mengganggu atau ikut campur tangan dalam pemrosesan dan presentasi antigen bakterial terutama antigen yang hadir pada bagian luar membran. Jadi tidak efisiennya pemrosesan dan presentasi antigen berkaitan dengan virulensi.²⁷

LPS juga dibutuhkan untuk invasi. Fagositosis yang merupakan proses aktif dari makrofag diinisiasi ketika bakteri berikatan dengan salah satu reseptor pada makrofag antara lain Fc, C3b atau reseptor mannitol. Ikatan ini kemudian menstimulasi invaginasi dan penelanan bakteri oleh makrofag. Jadi kemampuan *Salmonella* untuk survive pada makrofag dapat diperoleh dari mekanisme invasi bakteri.²⁸

2.2.3. Patogenesis oleh *Salmonella typhimurium*

S. typhimurium dapat menghambat fusi fagosom-lisosom diluar pengaruh adanya LPS dan opsonisasi. Inhibisi fusi fagosom-lisosom berhubungan dengan meningkatnya survival intraseluler dan virulensi. *Salmonella* merespon terhadap lingkungan intraseluler dengan meningkatkan lebih dari 30 macam protein.

Beberapa dari protein yang diinduksi ini mungkin terlibat dalam modifikasi membran fagosom untuk mencegah fusi dengan lisosom. *S. typhimurium* ini juga dapat bereplikasi di dalam fagosom yang tidak berfusi.²⁹

Salmonella dapat bersifat toksik terhadap murin makrofag. Sitotoksitas ditandai dengan penghambatan pengerutan membran dan makropinositosis pada makrofag yang terinfeksi dan diikuti dengan kematian sel. Makrofag yang dibunuh oleh *Salmonella spp* menunjukkan gambaran apoptosis seperti kondensasi dan fragmentasi kromatin, pembengkakan membran dan munculnya nukleosom sitoplasmik dan badan apoptotik. Efek sitotoksik sangat bergantung pada ekspresi sistem sekresi protein tipe III yang berhubungan dengan invasi. Serotipe dari *Salmonella* yang menyesuaikan dengan inang seperti *S. typhi*, *S. gallinarum* dan *S. dublin* juga toksik untuk murin makrofag, mengindikasikan bahwa kemampuan virulensi hadir pada banyak *Salmonella spp*.³⁰

S. typhimurium juga mampu bermultiplikasi dalam sel parenkimal nonfagosit, seperti hepatosit dan sel epithelial pada intestin dengan proses yang disebut endositosis yang diperantarai bakteri. Tidak seperti makrofag, sel nonfagosit ini tidak mampu membunuh dan mencerna bakteri penyusup. Ini memungkinkan *Salmonella* terlindung dari makrofag yang teraktivasi dan respon humoral inang. Akan tetapi, jika antigen bakteri intraseluler mencapai sitoplasma maka akan dapat didegradasi dan menghasilkan fragmen peptida yang dapat berasosiasi dengan molekul MHC I untuk menstimulasi respon CTL yang dapat melisis sel terinfeksi. *S. typhimurium* yang survival intraseluler berada dalam vakuola yang terikat membran yang dibentuk dari sel inang. Pada sel nonfagosit, ini mungkin bentuk pertahanan untuk bakteri.^{2,22}

S. typhimurium salah satu bakteri intraseluler fakultatif dengan kemampuan untuk menginvasi dan tumbuh di dalam sel nonfagositik in vivo, seperti di dalam hepar, patogen ini terlihat menginvasi dan bermultiplikasi secara luas di dalam hepatosit. Fagosit inflamasi dengan cepat menyusun foci infeksi dimana mereka tampil untuk menyebabkan destruksi hepatosit terinfeksi, dengan cara demikian melepaskan bakteri ke dalam ruang ekstraseluler, dimana kiranya mereka dapat ditangkap dan dihancurkan oleh fagosit. Jika sel fagosit dicegah dari akumulasi pada foci infeksi di hepar oleh terapi dengan antibodi monoklonal, pada tikus langsung melawan reseptor komplemen tipe 3 sel mielomonositik, sehingga lisis hepatosit gagal terjadi dan proliferasi bakteri tidak dapat dibatasi di dalam hepar. Di bawah keadaan ini, sebaliknya infeksi subletal dengan cepat menjadi letal. Penemuan ini meyakinkan dengan kuat bahwa lisis hepatosit terinfeksi oleh sel fagositik merupakan strategi pertahanan diri yang umum melawan infeksi hepar dengan bakteri intraseluler seperti *Salmonella*.³¹

2.2.4. Imunitas terhadap *Salmonella typhi*

Sistem imun natural mempunyai fungsi dasar mengidentifikasi dan membasmi mikroba penyusup dan penanda bagi sistem imun adaptif untuk hadir. Respon imun natural terhadap bakteri meliputi pengenalan komponen bakterial seperti LPS dan DNA.¹⁷ Pelepasan mediator inflamasi menimbulkan infiltrasi dari berbagai tipe sel ke tempat infeksi dan memperkuat respon. Pengambilan dan penghancuran bakteri oleh sel fagosit juga memfasilitasi proteksi inang. Proses imun natural dilakukan oleh sel-sel yang relatif tidak terbatas pada patogen spesifik, meliputi sel NK, sel NKT, neutrofil dan makrofag. Neutrofil dan

makrofag penting bagi survivalnya inang selama respon primer terhadap infeksi *Salmonella*, terutama dalam mengontrol replikasi bakteri tersebut. Makrofag berfungsi dalam kapasitas protektif daripada beraksi sebagai APC.³²

Studi eksperimental pada survival inang dari mencit dengan defisiensi genetik untuk sitokin spesifik atau reseptornya seperti juga studi netralisasi sitokin dengan antibodi telah memperlihatkan bahwa TNF,^{33,34,35} IFN- γ ,^{35,36,37} IL-12³⁸ dan IL-18³⁹ penting pada awal respon primer terhadap *Salmonella*.

Netralisasi TNF in vivo dapat mencegah inang berhubungan dengan respon protektif dan memperparah infeksi. Melimpahnya neutrofil dan makrofag dalam memproduksi TNF menggarisbawahi pentingnya mereka sebagai sumber utama sitokin ini pada awal infeksi.³² Sel-sel T, IFN- γ dan TNF- α semuanya penting dalam memanggil kembali imunitas spesifik terhadap *Salmonella* virulen yang diberikan dengan imunisasi vaksin hidup, dengan efek penghilangan sel T dan IFN- γ (ditandai dengan infiltrasi makrofag) secara kualitatif berbeda dari netralisasi TNF- α (tidak ada infiltrasi mononuklear atau pembentukan granuloma).³³ TNF berperan dalam proteksi terhadap salmonellosis pada imunitas non-spesifik yang diperantarai makrofag dan pada imunitas spesifik yang diperantarai sel-sel T.³⁴

IFN- γ endogenus maupun eksogenus meningkatkan resistensi terhadap *S. typhimurium*, begitu juga dengan TNF- α eksogenus dan endogenus yaitu dengan menstimulasi aktivitas bakterisidal makrofag. Antara IFN- γ dan TNF- α mempunyai interaksi sinergik. IFN- γ meningkatkan sejumlah reseptor TNF- α dan transkripsi mRNA TNF- α pada makrofag. TNF- α juga dibutuhkan untuk produksi IFN- γ oleh sel NK.³⁵ Berdasarkan penelitian Kagaya dkk, IFN- γ rekombinan (*rIFN- γ*) mampu mengaktivasi makrofag peritoneal untuk menginduksi aktivitas

killing terhadap *Salmonella* dan diyakini bahwa peningkatan fusi fagosom-lisosom diikuti oleh mekanisme *killing* yang tidak bergantung pada oksigen terutama memungkinkan untuk peningkatan aktivitas *killing Salmonella* pada makrofag yang diaktivasi dengan *rIFN-γ*.³⁶ Mencit yang diperlakukan dengan anti IFN- γ tidak mampu membersihkan dosis subletal dari bakteri virulen. Mencit memproduksi IFN- γ selama fase awal infeksi *Salmonella* dan hal ini menyebabkan reduksi kecepatan pertumbuhan dari bakteri virulen, tetapi tidak mempengaruhi produksi antibodi.³⁷

Lesi granuloma berkembang pada limpa dan hepar mencit kontrol, berlawanan dengan penyebaran luas dari infiltrasi sel mononuklear terlihat pada organ mencit yang diperlakukan dengan anti IL-12. Pada infeksi yang berat, *Salmonella* terlihat di dalam sel mononuklear, mengindikasikan kegagalan kemampuan bakterisidal atau bakteristatik dari fagosit dengan tidak hadirnya aktivasi biologik IL-12. Level IFN- γ berkurang pada mencit dengan anti IL-12. *Nitric oxide synthase* inducibel dan produksi mRNA IFN- γ berkurang pada mencit dengan anti IL-12, yang juga memperlihatkan peningkatan produksi mRNA IL-10 dan penurunan aktivitas *nitric oxide synthase* di jaringan. Pemberian *rIFN-γ* pada mencit dengan anti IL-12 mampu memperbaiki resistensi inang, pembentukan granuloma, dan ekspresi MHC II.³⁸

TNF- α diperlukan untuk pembentukan granuloma, IL-12 diperlukan untuk produksi IFN- γ oleh sel NK, dan IFN- γ merupakan faktor kunci dalam peningkatan *killing* oleh makrofag. Sedangkan IL-18 merupakan sitokin yang diproduksi oleh berbagai tipe sel meliputi sel mononuklear yang teraktivasi dan sel epidermal dalam respon terhadap bakteri dan stimuli inflamasi. IL-18 memiliki beberapa

aktivitas biologik yaitu menginduksi IFN- γ dari sel NK dan sel Th1, regulasi IL-2R pada sel T, meningkatkan sitotoksitas sel Th murin yang diperantarai Fas ligand, peningkatan sitotoksitas sel NK. IL-18 dan IL-12 mempunyai efek sinergik pada induksi IFN- γ dari sel T, kemungkinan karena regulasi reseptor IL-18 oleh IL-12. IL-18 juga menginduksi TNF- α dari sel T dan NK pada manusia. Makrofag limpa dan peritoneal melepaskan IL-18 selama infeksi *Salmonella*. IL-18 positif memodulasi produksi IFN- γ dari splenosit mencit dan meningkatkan produksi IFN- γ in vivo. IFN- γ ternyata juga positif memodulasi produksi IL-18 dari makrofag.³⁹

Neutrofil, makrofag, sel NK dan sel TNK mampu memproduksi berbagai sitokin yang terlibat selama awal infeksi *Salmonella*. IFN- γ diproduksi oleh limfoid dan sel myeloid selama awal infeksi. Sel NK yang aktif memproduksi sitokin seperti IFN- γ , TNF- α dan *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)*. Dengan memproduksi IFN- γ , sel NK dapat meningkatkan respon CMI dengan mengaktifasi makrofag dan mengarahkan diferensiasi sel Th ke arah Th1. Sitokin yang dihasilkan sel NK juga memodulasi hematopoiesis dan meningkatkan produksi granulosit dan makrofag. Sel NK berfungsi sebagai jembatan antara sistem imun innate dan adaptif, beraksi sebagai dasar pertahanan seraya memproduksi sitokin untuk memicu perkembangan respon imun spesifik.⁴⁰

Seperti sel NK, makrofag juga dapat mensekresi IFN- γ mengikuti stimulasi dengan IL-12 dan IL-18. Kapasitas makrofag untuk memproduksi IFN- γ secara cepat selama infeksi *Salmonella* dan kelimpahannya pada limpa dari mencit yang terinfeksi diyakini sebagai peran tambahan dari fagosit ini pada respon innate dan adaptif terhadap infeksi primer. IFN- γ yang dihasilkan makrofag mungkin berperan untuk meningkatkan kapasitas bakterisidal dari fagosit, memfasilitasi

presentasi antigen, dan atau mempengaruhi polarisasi Th dari respon imun.⁴¹ Neutrofil juga mengandung simpanan intraseluler IFN- γ yang dapat dilepaskan saat infeksi *Salmonella*³²

Makrofag yang teraktivasi oleh *Salmonella* juga mensekresi sitokin-sitokin seperti IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 dan TNF- α . TNF- α merupakan induser respon inflamasi lokal terhadap infeksi. IL-8 juga terlibat dalam respon inflamasi, membantu menarik netrofil ke tempat infeksi. IL-1, IL-6 dan TNF- α penting dalam menginduksi respon fase akut pada hepar dan menginduksi demam. IL-12 mengaktifasi sel NK dan memicu diferensiasi sel T CD4⁺ menjadi sel Th1 selama imunitas adaptif.^{17,42} Interleukin lain yang disekresi oleh makrofag dalam respon terhadap LPS dari *Salmonella* yaitu IL-15 yang penting dalam mengaktifasi inflamasi dan fungsi antimikrobal pada sel PMN,⁴³ berperan dalam perkembangan, survival dan fungsi sel NK,⁴⁴ serta mampu menstimulasi sel TCD8⁺ in vivo.⁴⁵

2.2.4.1. Reactive Oxygen Intermediate

Selain sitokin, makrofag yang teraktivasi juga akan melepaskan berbagai metabolit *reactive oxygen intermediate (ROI)* dan *reactive nitrogen intermediate (RNI)* yang dapat meningkatkan mekanisme *killing* dari makrofag.⁴ Makrofag dapat dipicu oleh substansi seperti partikel opsonin dan aktivator dari protein kinase C untuk mensekresi ROI. Substansi ini merupakan mediator kunci inflamasi, mikrobisidal dan aktivitas tumorisidal dari makrofag. Makrofag yang teraktivasi dikarakteristikan dengan peningkatan sekresi ROI. IFN- γ dan *growth hormone (GH)* merupakan faktor pengaktivasi makrofag yang baik yang meningkatkan *respiratory burst* dari makrofag dan meningkatkan resistensi inang

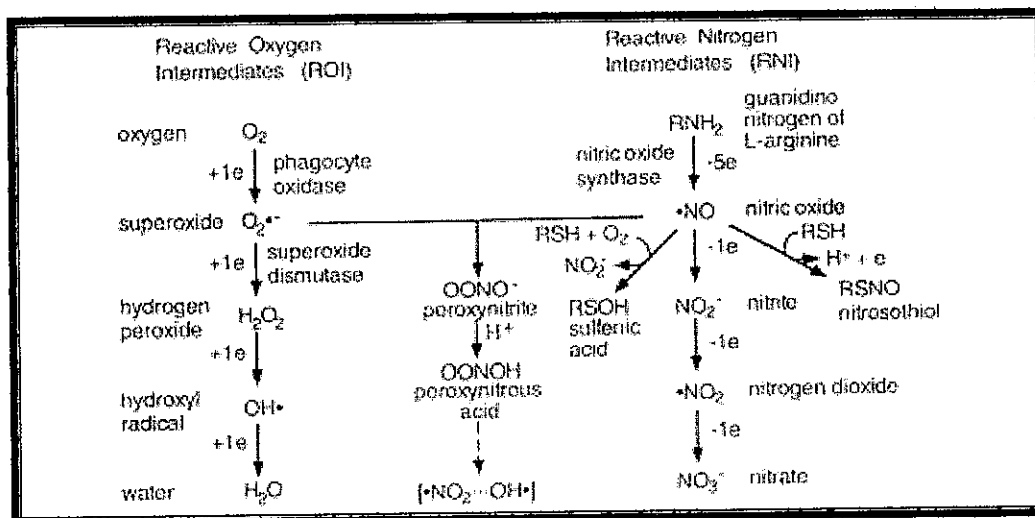
terhadap *S. typhimurium*. IFN- γ meningkatkan kecepatan transkripsi 91 kDa subunit dari sitokrom b558, yang ditemukan pada granul spesifik dari sel fagosit dan ditranslokasi ke membran fagosomal selama aktivasi seluler.⁴⁶

Oksidase fagosit merupakan multisubunit enzim yang terhimpun dalam fagosit teraktivasi terutama dalam membran fagolisosomal. Fungsi dari enzim ini yaitu untuk mereduksi oksigen molekular menjadi ROI seperti radikal superoksida, dengan bentuk reduksi dari *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) yang beraksi sebagai kofaktor. Pada saat kuman mulai mengalami fagositosis terjadi peningkatan mencolok dalam hal kegiatan *hexose monophosphate shunt* yang membangun NADPH. Elektron-elektron keluar dari NADPH menuju ke flavoprotein membran yang mengandung FAD dan selanjutnya menuju ke suatu sitokrom membran plasma yang khas (*cyt b₅₅₈*). Ini menimbulkan *midpoint redox potential* yang sangat rendah yakni -245 mV yang memungkinkan elektron untuk mengurangi oksigen molekular langsung menjadi anion superoksida. Proses pembentukan ROI ini disebut sebagai *respiratory burst*.^{5, 18} Reaksi kunci yang dikatalisa oleh oksidase NADPH yang memulai terbentuknya ROI adalah sebagai berikut :



Makrofag mampu menghancurkan bakteri dengan *respiratory burst* yang menghasilkan level tinggi *reactive oxygen species* seperti *superoxide*, hidrogen peroksida dan *nitric oxide (NO)*, sebaik dalam penggunaan faktor antimikroba yang berhubungan dengan lisosom.⁴⁷ Neutrofil juga mampu menghasilkan *oxidative burst* seperti makrofag yang berkontribusi dalam *killing* bakteri.⁴⁸

Pada sel mamalia, NO diproduksi bersama dengan *L-citrulline* melalui oksidasi enzimatik dari L-arginine. Produksi NO oleh *NO sintase* distimulasi oleh sitokin proinflamasi seperti IFN- γ , TNF- α , IL-1 dan IL-2 sebaik oleh produk mikrobial seperti LPS. Produksi NO merupakan implikasi dari respon inang yang efektif terhadap infeksi. NO telah diimplikasikan pada pertahanan inang melawan bakteri intraseluler seperti *Salmonella*, yaitu tercermin dengan melimpahnya NO dibagian luar fagosom.⁴⁹ Antara ROI dan NO dapat membentuk suatu interaksi dengan membentuk spesies antimikroba yang lebih toksik seperti peroksinitrit (ONOO^-) yang dapat meningkatkan daya bunuh makrofag terhadap *Salmonella*, interaksi tersebut seperti terlihat pada gambar 2.⁵⁰



Gambar 2. Interaksi antara ROI dan NO

(Diambil dari Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. PNAS. 2000 ; 97 (16) : 8841-48)⁵⁰

Stres oksidatif diketahui dapat merusak sel bakteri pada semua tingkat makromolekuler dan *S. typhimurium* telah memperlihatkan respon terhadap stres

tersebut dengan derepresi sistem pertahanan multigenik. Hidrogen peroksida diketahui untuk menginduksi respon multigenik pada sel *S. typhimurium*.⁵¹ Respon terhadap stres oleh hidrogen peroksida merupakan hasil induksi kira-kira 30 protein dan sebagian kecil gen yang mengkode protein ini diregulasi oleh protein yang disebut *OxyR*. Gen dari *OxyR regulon* meliputi *katG* (katalase), *ahpCF* (alkyl hydroperoxide reductase) dan *dps* (DNA binding protein) dari sel-sel mati, membantu mengurangi efek merugikan dari hidrogen peroksida.⁵² Protein stres yang diinduksi H_2O_2 , meliputi katalase II adalah antigen dominan untuk respon CMI terhadap *S. typhimurium* dan *burst* protein stres pada fagosit bertanggung jawab untuk induksi CMI yang terlibat dalam proteksi mencit melawan infeksi *Salmonella*.⁸

Perbaikan DNA yang rusak oleh *Salmonella* diperlukan untuk virulensi penuh in vivo dan bahwa *oxidative burst* dari fagosit merupakan salah satu sumber kerusakan DNA.⁵³ Gen-gen yang mengkode protein yang terlibat dalam proteksi melawan kerusakan oleh hidrogen peroksida mungkin penting untuk survival *S. typhimurium* selama infeksi dan terutama selama berinteraksi dengan makrofag atau sel-sel PMN. Penemuan terbaru bahwa *slyA* penting untuk virulensi, diekspresikan oleh *Salmonella* di dalam makrofag dan dibutuhkan untuk resistansi terhadap stres oksidatif. Telah dilaporkan bahwa *ahp*, salah satu loki yang diregulasi *OxyR*, terinduksi selama interaksi makrofag. Respon CMI dan humoral terhadap *ahpC* ditemukan untuk perkembangan selama infeksi, kemungkinan dalam aktivasi sel *T helper 1*. Jadi meski tidak penting dalam virulensi, *ahpC* diekspresikan oleh *S. typhimurium* selama infeksi pada mencit BALB/c dan merupakan target bagi sistem imun.⁵²

2.2.4.2. Sel T dan Sel B

Demam tifoid menginduksi respon imun humoral dan selular baik sistemik maupun lokal.⁶ Pasien tifoid dan manusia yang diberi vaksin hidup lewat oral mempunyai sirkulasi antibodi IgG, IgM dan IgA dan imunitas seluler sebaik sIgA pada permukaan mukosal dalam melawan *S. typhi*.⁵⁴

Meskipun pembentukan antibodi merupakan fungsi sentral dari sel B, mereka dapat menjalankan fungsi alternatif seperti sebagai presentasi antigen, inisiasi respon sel T dan produksi sitokin. Sel B penting untuk proteksi terhadap infeksi oral dari *S. typhimurium* virulen. Pada usus, IgA spesifik *S. typhimurium* dapat mencegah adhesi bakteri ke sel epitelial dan mengaglutinasi bakteri. Oponisasi dengan antibodi memicu pengambilan dan penghancuran bakteri lebih efektif oleh fagosit pada *gut-associated lymphoid tissue (GALT)*. Dengan produksi sitokin seperti IFN- γ , sel B pada GALT dapat mengaktivasi fagosit dan menginduksi mekanisme bakterisidal dari sel ini. Dengan kehadiran sel B sebagai sebuah perangkat yang menyebabkan lebih sedikitnya *Salmonella* yang mencapai limpa dan hepar.⁵⁵

Mencit yang defisien sel B mampu mengontrol infeksi primer dan membersihkan bakteri dari sistem retikuloendotelial, tetapi gagal menimbulkan resistensi adaptif terhadap *S. typhimurium*. Splenosit total dan sel-sel T CD4⁺ yang diperoleh dari mencit defisiensi sel B, 4 bulan setelah vaksinasi memperlihatkan reduksi kemampuan untuk melepas sitokin tipe Th1 (IL-2 dan IFN- γ). Pada model mencit, imunisasi dengan vaksin *Salmonella* menimbulkan respon antibodi yang baik terhadap protein dan lipopolisakarida, respon sel T memori tipe Th1 dan sel T sitotoksik CD8⁺ serta IFN- γ , TNF- α , IL-12 dan pembentukan granuloma.⁵⁶

Subset sel T diperlukan untuk ekspresi penuh imunitas terhadap *S. typhimurium*. Pada infeksi *Salmonella* primer pada mencit model, pembersihan bakteri tersebut dari jaringan memerlukan sel-sel T CD4⁺ fungsional dan perkembangan imunitas sel T tipe Th1. Sel-sel T CD4⁺ berfungsi penting dalam membantu aktivasi dan diferensiasi sel B.⁵⁶ Fungsi sel T CD4⁺ ini selain membantu sel B untuk memproduksi antibodi, juga membantu pembentukan sel T CD8⁺ spesifik *Salmonella* dan pengaturan pembentukan granuloma untuk membatasi penyebaran bakteri. Sel T CD8⁺ sitotoksik dapat melisis sel terinfeksi dan dapat memproduksi sitokin yang dibutuhkan untuk pengerahan dan aktivasi fagosit.⁵⁷

Sel-sel T CD4⁺ naif ketika distimulasi memproduksi IL-2 sebagai limfokin utamanya. Pada saat awal, sel-sel ini berkembang menjadi sel-sel yang memproduksi IFN- γ , TNF- β dan IL-2 atau IL-4. IL-2 dibutuhkan oleh sel-sel naif untuk berkembang menjadi sel-sel seperti Th1 atau Th2 tetapi tidak menentukan diferensiasinya. Jika IL-4 juga muncul selama awal periode, sel-sel T CD4⁺ yang dihasilkan memproduksi IL-4 saat restimulasi. Perkembangan sel-sel yang memproduksi IFN- γ dihambat oleh IL-4. Dengan tidak munculnya IL-4, awal untuk produksi IFN- γ terjadi, tetapi ini ditandai dengan peningkatan oleh IL-12. Pada beberapa sistem in vitro, IFN- γ beraksi bersama-sama dengan IL-12 untuk meningkatkan produksinya. Anti IFN- γ menghambat awal untuk produksi IFN- γ in vivo. Limfokin juga menggunakan regulator silang atau efek inhibitor. IL-4 menghambat awal produksi IFN- γ , meskipun efek inhibitor ini berkurang dengan kehadiran IL-12. IFN- γ sama menghambat awal produksi IL-4. Faktor-faktor lain

yang yang berperan penting dalam menentukan fenotip limfokin yang diproduksi yaitu dosis antigen, tipe APC dan ekspresi molekul asesoris dan hormon.⁵⁸

Pada mencit yang defisien sel T terutama sel T CD4⁺, menimbulkan infeksi *S. typhimurium* kronis. Berbeda dari mencit defisiensi sel T CD4⁺, mencit defisiensi sel B mampu mengontrol dan mengeliminasi *Salmonella*, mengindikasikan bahwa fungsi utama sel T CD4⁺ pada model infeksi ini tidak memberi bantuan untuk sel B tetapi untuk mengaktivasi makrofag.⁵⁵

Infeksi *Salmonella* tidak hanya mempengaruhi sel-sel sistem imun natural selama infeksi awal, tetapi juga sel T limpa, tetapi tidak limfosit B. Reduksi sel T limpa selama infeksi *Salmonella* primer dapat disebabkan oleh karena kematian sel atau rekrutmen ke sirkulasi dan perifer. Induksi pelepasan sel T limpa ke perifer sebagai hasil inflamasi di tempat lain juga berkontribusi pada hilangnya sel T selama infeksi primer. Akan tetapi, sel-sel T limpa diaktifasi pada akhir infeksi *Salmonella* dan sel T yang memproduksi IFN- γ meningkat 5 hari setelah infeksi primer. Respon sel T CD4⁺ yang spesifik *Salmonella* mulai terdeteksi 7 hari postinfeksi, meskipun kinetika dari respon adaptif mungkin bervariasi pada strain *Salmonella* yang dijumpai.³¹

Antibodi dan sel-sel T keduanya dibutuhkan untuk memanggil imunitas terhadap *Salmonella* virulen dan diyakini bahwa kemampuan untuk menimbulkan opsonisasi antibodi dalam respon CMI adalah penting untuk proteksi yang optimal terhadap bakteri tersebut.⁵⁹

Infeksi *Salmonella* menginduksi sel T CD4⁺ dan CD8⁺, dan sel T CD4⁺ ternyata penting terutama untuk proteksi melawan *S. typhimurium*. Pengenalan antigen oleh TCR menginduksi aktivasi limfosit T. Tetapi, sinyal yang diperantarai

TCR tidak mencukupi untuk aktivasi sel T yang efisien dan sinyal kostimulasi dibutuhkan. Salah satu molekul permukaan yang paling penting yang mengirimkan sinyal kostimulator untuk sel T adalah CD28. CD28 diekspresikan pada sel T dan sel NK, dan ligan untuk CD28 serta struktur yang berhubungan dengan CTLA4 adalah molekul CD80 dan CD86. Kedua molekul tersebut diekspresikan pada APC profesional. Stimulasi sel T tanpa hadirnya CD28 menimbulkan kegagalan proliferasi, reduksi produksi sitokin, dan perubahan pembentukan subset sel Th CD4⁺. CD28 juga penting dalam kooperasi sel T-B. Pada respon terhadap *S.typhimurium*, IgM dan IgG3 spesifik berkurang dan IgG1 dan IgG2a tidak hadir pada mencit defisien CD28. Berbeda dari IgM dan IgG3, IgG1 dan IgG2a adalah bergantung pada sel T, mengindikasikan bahwa hilangnya ekspresi CD28 menggagalkan kooperasi sel T-B selama infeksi.⁶⁰

Meski antibodi penting untuk proteksi melawan infeksi oral *S. typhimurium*, perannya dalam infeksi sistemik masih kontroversial. *S. typhimurium* menginfeksi makrofag dan hepatosit dan oleh karena lokalisasi intraselulernya, patogen terlindung dari antibodi, sehingga antibodi tidak berperan atau hanya sedikit berperan pada proteksi melawan infeksi sistemik *Salmonella*.⁶⁰

Pembentukan respon Th1 beroperasi dalam keseimbangan dengan pembentukan respon Th2. Pembentukan sel Th2 tidak bergantung pada kostimulasi CD28 in vitro dan ternyata pembentukan sel Th1 pensекреksi IFN- γ kurang bergantung pada kostimulasi CD28. Akan tetapi hilangnya kostimulasi CD28 mereduksi produksi IL-2 yang menimbulkan kegagalan proliferasi dan ekspansi sel-sel Th1. Mekanisme lain yang mungkin dalam melawan sel terinfeksi

adalah sitotoksitas oleh sel T CD8⁺, tetapi ini bukan mekanisme penting untuk pembersihan *Salmonella*.⁶⁰

Sel dendritik dan sel-sel T diaktivasi mengikuti infeksi *Salmonella*. Ini diperlihatkan dengan peningkatan ekspresi permukaan dari CD86 dan CD40 pada sel CD11c⁺ MHC-II⁺ dan peningkatan ekspresi CD44 dan CD69 pada sel T CD4⁺ dan CD8⁺. Sel-sel dendritik adalah APC penting yang terlibat dalam inisiasi dan modulasi respon imun yang diprasarani sel T. Sel dendritik progenitor meningkat di sumsum tulang dan ditransport lewat darah, mereka masuk jaringan. Sel dendritik murin dari berbagai jaringan dan organ berhubungan dengan ekspresi permukaan seperti CD11cp150/90 integrin dan ekspresi molekul MHC II dan molekul kostimulator. Pada umumnya sel dendritik ditemukan di perifer seperti kulit dan permukaan mukosal dalam bentuk immatur. Mereka diharapkan dapat menangkap dan memproses antigen tetapi relatif sedikit untuk stimulator sel-sel T naif. Paparan terhadap antigen dan stimuli inflamasi menginisiasi proses maturasi dimana sel dendritik immatur menjadi aktivator sel T yang efektif dan langsung menuju tempat berkembangnya limfosit. Makrofag dan sel dendritik dapat mempresentasikan antigen yang diproses dari bakteri gram negatif intraseluler *S. typhimurium* dan menginduksi maturasi sel dendritik invitro. *S. typhimurium* dapat tinggal dan bereplikasi dalam fagosom sel fagosit. Bakteri ini telah ditemukan pada sel yang mengekspresikan CD18, yang meliputi berbagai populasi APC.⁶¹

Infeksi dengan bakteri tersebut menimbulkan aktivasi sel-sel T CD4⁺ dan CD8⁺ dan pembentukan sel-sel T yang memproduksi IFN- γ dari kedua subset sel T tersebut. Frekuensi IFN- γ spesifik *Salmonella* yang diproduksi sel T CD4⁺ secara signifikan lebih besar dibanding sel T CD8⁺, ini mendukung pendapat

bahwa sumber utama IFN- γ pada respon imun spesifik adalah sel T CD4⁺. Pentingnya sel T CD8⁺ yang terbentuk mungkin untuk fungsi sitolitiknya dalam pemusnahan strain virulen dibanding untuk produksi IFN- γ .⁶¹

Infeksi sistemik pada mencit oleh *S. typhimurium* secara eksperimental meliputi.⁶²

1. Fase pertama: beberapa jam setelah infeksi secara intraperitoneal atau intravena, mikroorganisme ini mampu berdistribusi ke berbagai tempat dimana setelah 3 – 8 jam infeksi mikroorganisme ini ditemukan di hati dan limpa.
2. Fase kedua : selama hari pertama infeksi disebut tahap pertumbuhan eksponensial dan terjadi sebelum imunitas natural. Faktor genetik hospes berperan penting dalam fase ini. Neutrofil sangat penting pada fase ini sebagai pertahanan hospes yang efektif melawan infeksi *Salmonella* dengan menghambat pertumbuhan bakteri tersebut.
3. Fase ketiga (*plateau phase*): setelah 3-7 hari, pertumbuhan pesat selama infeksi *Salmonella* dalam hati dan limpa menjadi pertumbuhan yang menetap (*plateau*) dibawah pengaruh makrofag teraktivasi yang memproduksi sitokin proinflamasi. Pada fase ini limfosit T tidak berperan penting. Makrofag diaktivasi bukan untuk membunuh lebih baik tapi untuk meningkatkan *killing* oleh sel lain (sel NK atau granulosit) dengan memproduksi sitokin.
4. Fase pembersihan : terjadi selama minggu ketiga infeksi yang melibatkan aktivitas limfosit T. Pada fase ini limfosit T CD4⁺ memfasilitasi pembersihan dan ekspresi mRNA IFN- γ terlihat pada sel T CD4⁺ dan sel NK.

2.3. *Aloe vera*

2.3.1. Sinonim dan Taksonomi

Aloe vera mempunyai banyak sinonim antara lain *A. barbadensis* (Mill), *Curacao aloes*, *Barbados aloes*, *first-aid plant*, tanaman obat, *burn plant*, *wand of heaven*, dan *plant of life*. Suku bangsa Mesir kuno menyebutnya sebagai *plant of immortality*. Nama *A. vera* berasal dari kata Arabik "*Alloeh*" yang berarti cairan pahit yang ditemukan pada daunnya.^{63,64,65} *A. vera* ini termasuk dalam ordo *Liliaceae*⁶³ dan famili *Aloe*⁶⁶ dengan lebih dari 500 spesies *Aloe* tumbuh di seluruh dunia.

2.3.2. Morfologi Tumbuhan

A. vera tumbuh dengan ukuran berbeda, antara 10 inchi sampai 30 kaki. *Aloe* tumbuh dalam bentuk roset yang menolongsnya menangkap air hujan sebanyak yang mereka mampu. Tumbuhan ini mempunyai serabut akar yang kuat. *A. vera* mempunyai warna daun yang bervariasi dari hijau muda sampai hijau tua, biasanya lebih tua dari kaktus umumnya. Daunnya datar dan panjang, tepinya mempunyai ujung-ujung tetapi tidak tajam, serta dilapisi lilin untuk menjaga kelembaban di dalam daun.⁶⁷ *Aloe* berasal dari Afrika timur dan selatan dan telah dikultivasi di Hindia Barat dan daerah tropik lain.⁶³

2.3.3. Kandungan Kimia

Kandungan kimia dari *A. vera* ini yaitu meliputi :¹³

1. **Vitamin:** aloe kaya akan vitamin seperti Vitamin D, terutama antioksidan vitamin A (*beta karoten*), C dan E, serta vitamin B-1,2,6,12. Ini biasanya penting untuk para vegetarian.

2. **Enzim:** beberapa tipe yang berbeda dari katalis biokimia ini ketika diberikan secara oral dapat membantu pencernaan dengan memecah lemak dan karbohidrat. *Bradikinase* membantu mengurangi inflamasi yang berlebihan ketika diaplikasi untuk kulit secara topical dan mengurangi rasa sakit, serta mendigesti jaringan mati pada luka. *Lipase, protease, amilase, carboxypeptidase, catalase, cellulase* dan *peroxidase* mampu memecah makanan, membantu dalam pencernaan serta mampu meningkatkan absorpsi nutrisi.
3. **Mineral:** kalsium, sodium, potassium, mangan, magnesium, copper, seng, kromium dan antioksidan selenium. Meskipun mineral dan *trace elemen* hanya sedikit dibutuhkan, mereka penting untuk fungsi berbagai sistem enzim pada jalur metabolik yang berbeda.
4. **Karbohidrat:** dibentuk dari lapisan mukosa dari tanaman aloe yang mengelilingi gel bagian dalam dan diketahui sebagai mukopolisakarida, yang meningkatkan sistem imun dan membantu detoksifikasi. *A. vera* mengandung mono dan polisakarida, tetapi yang paling penting adalah gula rantai panjang yang terdiri glukosa dan mannan atau glukomannan serta acemannan. Karbohidrat ini dicerna keseluruhan pada usus, tidak dipecah seperti gula lain dan ternyata hadir dalam aliran darah dengan bentuk yang sama. Proses ini diketahui sebagai *pinositosis*. Saat di dalam aliran darah mereka mampu menimbulkan efek imunoregulasi. Beberapa dari polisakarida ini tidak diabsorpsi tetapi melekat pada lapisan sel tertentu pada usus dan membentuk pertahanan yang mencegah absorpsi materi asing sehingga membantu mencegah sindrom kebocoran usus. Lignin

merupakan substansi inert tetapi ketika dipakai secara topikal mereka mempunyai efek penetratif sehingga komponen *A vera* yang lain dapat diabsorpsi kulit.

5. **Antraquinon:** ada dua belas senyawa fenolik ini yang ditemukan pada cairan tumbuhan (*aloe emodin, aloectic acid, aloin, anthracine, antranol, barbaloin, chrysophanic acid, emodin, ethereal oil, ester cinnamonic acid, isobarbaloin* dan *resistannol*). Pada jumlah sedikit, mereka membantu absorpsi dari saluran gastrointestinal dan mempunyai efek anti-mikrobia dan efek membunuh rasa sakit. Pada beberapa minuman kesehatan, *antraquinon* dihilangkan karena dapat menimbulkan diare. *Aloin* dan *Emodin* beraksi sebagai pembunuh rasa sakit. Mereka juga berfungsi sebagai anti-bakteri dan anti-virus.
6. **Saponin:** substansi ini adalah 3% dari *A. vera* gel dan mampu membersihkan dengan kemampuan antiseptik. Substansi ini beraksi kuat sebagai anti-mikroba melawan bakteri, virus, jamur dan yeast.
7. **Sterol:** kolesterol, kampesterol, b. sisosterol dan lupeol. Keempat steroid ini penting sebagai agen anti-inflamasi.
8. **Asam salisilat:** senyawa menyerupai aspirin dengan efek anti-inflamasi dan anti bakterial.
9. **Asam amino:** *A. vera* mengandung 22 asam amino (arginin, asparagin, asam aspartik, analin, serin, valin, glutamat, threonin, glisin, lisin, prolin, histidin, leusin, isoleusin). Yang lebih penting bahwa dalam gel tersebut terkandung 7 dari 8 asam amino esensial yang tubuh tidak dapat mensintesisnya.

2.3.4. Sediaan *Aloe vera*

Bentuk sediaan dari *A. vera* ini biasanya dalam bentuk Aloe gel, Aloe gel konsentrat, Aloe gel bubuk maupun dalam bentuk jus. Produk *A. vera* ini diproduksi dengan menggunakan *cold extraction* (ekstraksi dingin).⁶⁷ *A. vera* harus diproses dalam beberapa jam setelah dipanen untuk mencegah oksidasi. *A. vera* harus diproses dingin, tanpa pemanasan atau diperlakukan dengan bahan kimia. Proses dingin meyakinkan bahwa produk gel adalah sama pentingnya seperti daun yang masih segar.⁶⁸ *A. vera gel* mengandung 99,3% air dan sisanya berupa bahan padat mengandung sejumlah besar polisakarida tipe glukosa dan mannosida.⁶⁹ Proses dengan menggunakan panas tinggi seperti pasteurisasi dan metode *autoclave* akan merusak kandungan Aloe yang penting untuk penyembuhan seperti enzim, polisakarida dan mukopolisakarida.⁷⁰

Pengobatan rakyat dengan menggunakan jus *A. vera* sebagai penyembuh yang unik telah dipergunakan lebih dari ribuan tahun. Jus Aloe dibuat dari bagian dalam daun, sedangkan ekstrak *A. vera* dibuat dengan menjadikan bubuk seluruh daunnya. Jus *A. vera* dibuat dengan mengupas kulit luar daunnya dengan menggunakan tangan (*hand filleting*) untuk menghindari kontaminasi bagian gel dengan getah yang berwarna kuning, dipotong menjadi bagian yang kecil dan dihancurkan dengan alat jus, selanjutnya cairan jus tersebut dimasukkan dalam berbagai *filtering columns* yang dapat memisahkan dari bahan *laxative*.⁶⁵ Jus Aloe secara komersial umumnya diproduksi dengan mengencerkan gel *A. vera* dengan air agar rasanya lebih baik.⁷¹ Jus *A. vera* antara lain mengandung enzim, asam amino dan vitamin. Jus ini dapat membantu sistem pencernaan dan mengurangi

resiko kanker paru-paru serta dapat menstimulasi sistem imun dengan menurunkan gejala alergi dan signifikan menurunkan infeksi saluran pernapasan.⁶⁶

2.3.5. Efek Farmakologi *Aloe vera*

Sejumlah spesies aloe terdiri dari dua bagian yang berkhasiat obat yaitu gel musilago yang terdapat ditengah daun (digunakan terutama pada kulit dan membran mukus) dan getah yang merupakan bagian daun yang pahit digunakan sebagai stimulan *laxative*. Lapisan daun mengandung *anthraquinones* (*aloin*, *aloe-emodin*, *barbaloin*) yang dapat menyebabkan diare dan kram intestin, dehidrasi, kehilangan potassium. Oleh karena itu penggunaan Aloe harus dihindari oleh wanita hamil dan menyusui, anak kecil dan orang-orang dengan gangguan intestin. Aloe gel aman untuk pemakaian luar seperti untuk luka bakar minor, abrasi, gigitan serangga, dan iritasi kulit. Aloe gel ini mengandung polisakarida (*acemannan*), *karboksipeptidase*, sterol yang mempunyai aktivitas anti-inflamasi, asam amino seperti *tryptophan* dan *phenilalanin* yang mereduksi inflamasi, vitamin C dan B kompleks yang dapat memelihara hewan setelah *adrenalectomi* dan mineral seperti seng yang sangat penting dalam penyembuhan luka.^{71,72,73}

A. vera mempunyai banyak efek biologik antara lain sebagai anti virus melawan virus influenza, virus campak dan herpes simplex type 1 (HSV-1) dengan menghambat replikasi dan dapat merusak pembungkus (*envelope*) dari virus.⁷⁴ Aloe juga penting dalam terapi AIDS yaitu dapat meningkatkan level CD8 dan mengatur level CD4, meningkatkan monosit/makrofag dan aktivitas fagosit.^{75,76} Aloe berguna bagi penderita diabetes tipe 2 dengan menstimulasi sintesis dan pelepasan insulin, serta menurunkan glukosa darah 40% pada mencit diabetik.⁷⁷

A. vera juga telah dikenal sebagai agen anti inflamasi, yaitu dengan memblokir integrin tertentu. Integrin merupakan protein yang memperlancar *cell adherence*. Pada jaringan yang mengalami inflamasi, sel-sel pertahanan seperti neutrofil harus terikat ke sel endotel pada dinding pembuluh darah sebelum masuk ke jaringan. Karbohidrat yang berasal dari Aloe mereduksi inflamasi dengan memblokir emigrasi neutrofil yang diperantarai oleh *integrin $\beta 2$* .^{78,79}

Komponen polisakarida utama yang terdapat pada *A. vera* yaitu *acemannan*. Polisakarida ini banyak ditemukan pada *A. barbadensis*.⁸⁰ Toksisitas oral akut dari *acemannan* pada tikus dan mencit adalah >5 g/kg. Studi farmakokinetik dengan pemberian 20 mg/kg *acemannan* pada *beagle dog* memperlihatkan polisakarida diabsorpsi dari usus dan level pada darah memuncak dalam 4-6 jam dengan *half life* >48 jam.⁸¹

Semua substansi biologik aktif pada *A. vera* dibutuhkan untuk mencapai manfaat akhir yang maksimal, hal ini diibaratkan seperti sebuah orkestra dari substansi-substansi aktif dengan konduktor berupa polisakarida yang bekerja secara sinergisme.⁸²

2.3.6. Efek *Aloe vera* terhadap Sistem Imun

A. vera dapat beraksi sebagai adjuvant untuk meningkatkan respon imun terhadap antigen. Ada dua senyawa modulator pada gel *A. vera* yang dibedakan secara fungsional dan kimiawi. Fraksi yang pertama dapat meningkatkan pembentukan antibodi dan fraksi yang lain dapat menghambat pembentukan antibodi sehingga *A. vera* disebut sebagai imunomodulator. *A. vera* juga dapat menghambat dan menstimulasi fagositosis. *A. vera* beraksi sebagai stimulator

imun pada penyembuhan luka dan inhibitor imun pada inflamasi, dan kedua peristiwa tersebut dapat terjadi bersamaan. Sehingga *A. vera* disebut sebagai modulator yang membawa sistem biologik ke dalam keseimbangan.⁸²

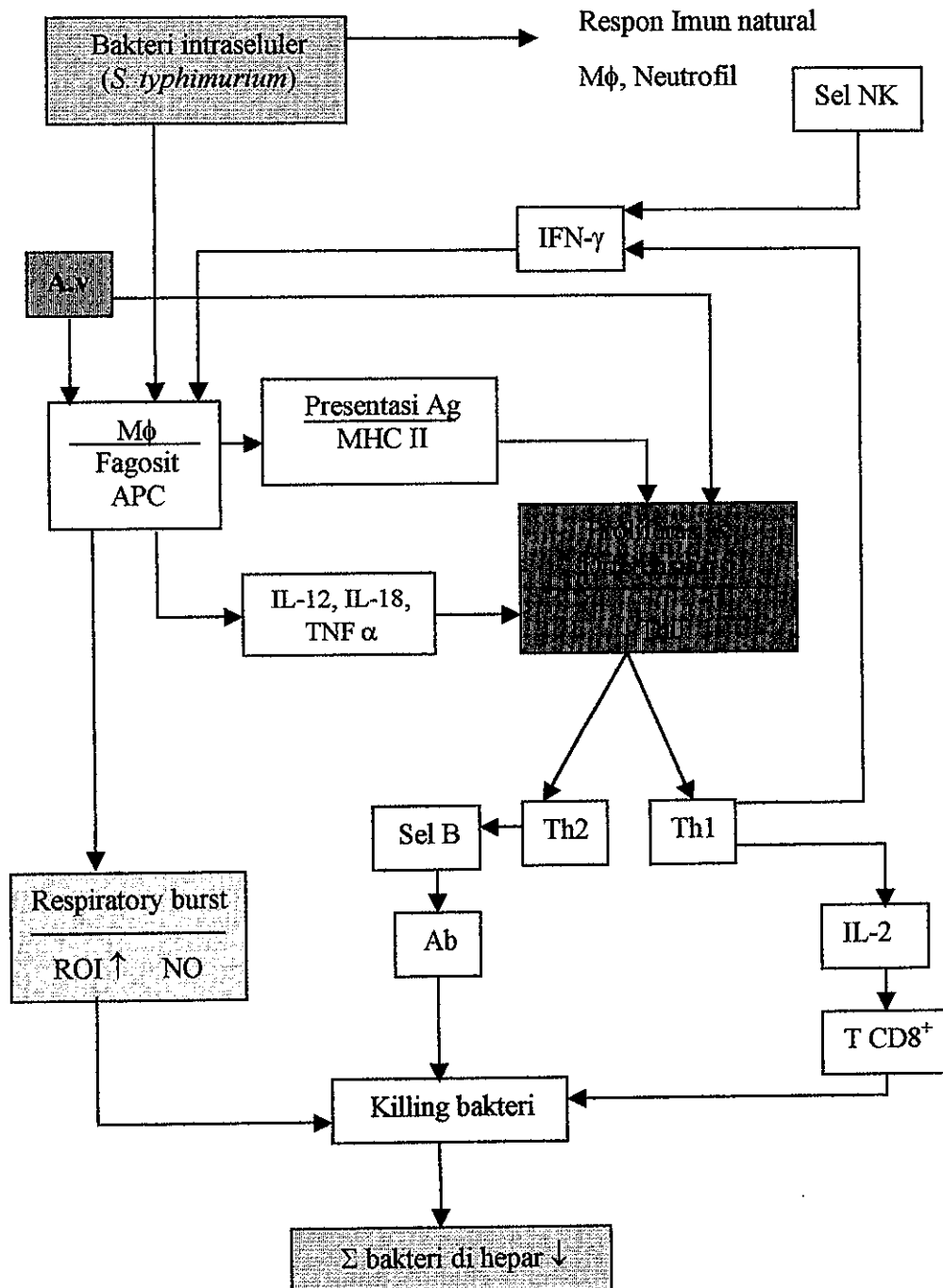
Komponen polisakarida utama yang dapat berperan sebagai imunomodulator yaitu *acemannan*. *Acemannan* mempunyai efek langsung pada sel-sel sistem imun, mengaktivasi dan menstimulasi makrofag, monosit, antibodi dan sel-sel T.⁸³ *Acemannan* dapat menstimulasi produksi sitokin seperti IFN, TNF dan interleukin terutama oleh makrofag.¹² Penelitian lain pada sel makrofag tikus, *acemannan* dapat menstimulasi produksi sitokin makrofag (IL-6, TNF- α), produksi NO, ekspresi molekul permukaan dan perubahan morfologi sel.⁸⁴ Studi pada manusia, *acemannan* ini mampu meningkatkan respon limfosit terhadap allogen dengan meningkatkan pelepasan IL-1 oleh monosit.¹² *Aloe* juga meningkatkan sejumlah antibodi oleh sel B dengan bantuan sel T dan meningkatkan aktivitas *killing* dari sel T, disamping itu juga melindungi sumsum tulang dari kerusakan bahan kimia toksik.⁸³

Sistem komplemen, normalnya distimulasi dengan kehadiran polisakarida permukaan dari organisme penginfeksi. Sebuah studi telah memperlihatkan bahwa polisakarida *glukomannan* dari *A. vera* dapat melakukan fungsi tersebut.⁸⁵ *Acemannan* dari *A. vera* juga dapat menginduksi maturasi dari sel dendritik.⁸⁶ Komponen lain dari aloe yaitu *glikoprotein (lectin)* mempunyai aktivitas mitogenik untuk limfosit.⁸²

BAB 3

KERANGKA TEORI, KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1. KERANGKA TEORI



Infeksi oleh bakteri intraseluler seperti *S. typhimurium* akan menginisiasi respon imun tubuh. Pada awal infeksi, stimulasi oleh antigen bakteri seperti LPS akan menimbulkan respon imun natural yang melibatkan berbagai sel imun diantaranya makrofag, netrofil dan sel NK.

Dengan memproduksi IFN- γ , sel NK dapat meningkatkan respon CMI dengan mengaktifasi makrofag dan mengarahkan diferensiasi sel Th ke arah Th1. Sel NK berfungsi sebagai jembatan antara sistem imun natural dan adaptif, beraksi sebagai dasar pertahanan seraya memproduksi sitokin untuk memicu perkembangan respon imun spesifik.

Makrofag dapat berfungsi sebagai fagosit profesional dan sebagai APC. Selama proses fagositosis makrofag membentuk fagolisosom yang mengandung berbagai enzim pencernaan dan substansi bakterisidal. Makrofag teraktivasi selain akan memproduksi berbagai sitokin juga akan melepaskan berbagai produk *respiratory burst* seperti ROI dan NO yang dapat meningkatkan mekanisme *killing* terhadap mikroba. Sebagai APC, makrofag berperan dalam memproses dan mempresentasikan antigen kepada limfosit T melalui molekul MHC II. Hal ini merupakan awal dari respon imun adaptif dengan menstimulasi proliferasi dan diferensiasi dari limfosit T. Proliferasi dan diferensiasi limfosit ini juga distimulasi oleh berbagai sitokin yang dihasilkan makrofag seperti IL-12, IL-18 dan TNF- α .

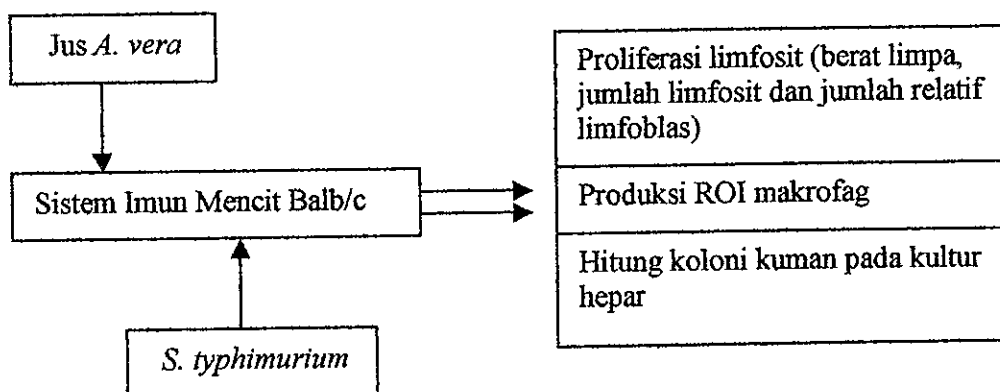
Respon terhadap *Salmonella* ini melibatkan respon imun adaptif yang bersifat seluler maupun humoral. Limfosit T ini akan berdiferensiasi menjadi sel Th1 yang menghasilkan sitokin seperti IFN- γ yang akan ikut serta dalam mengaktifasi makrofag. Sitokin lain seperti IL-2 dapat membantu dalam perkembangan sel T CD8⁺. Diketahui bahwa *Salmonella* ini dapat hidup dan

tumbuh dalam sel nonfagosit seperti hepatosit dan splenosit, maka untuk itu sel T CD8⁺ berperan dalam melisis sel terinfeksi sehingga dapat meningkatkan *killing* terhadap bakteri tersebut salah satunya *killing* bakteri pada organ hepar.

Sel limfosit T juga akan berdiferensiasi menjadi sel Th2 yang menghasilkan sitokin yang berperan dalam perkembangan sel B menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi. Antibodi berperan terutama untuk opsonisasi bakteri yang akan memicu pengambilan dan penghancuran bakteri lebih efektif oleh fagosit seperti makrofag. Jadi antara sistem imun natural dan adaptif membentuk suatu kerja sama dalam mengeliminasi bakteri patogen.

A. vera diharapkan mampu meningkatkan aktivitas makrofag diantaranya dalam memproduksi metabolit ROI dan dapat memicu respon proliferasi limfosit yang pada akhirnya diharapkan mampu menurunkan jumlah kuman di organ seperti hepar.

3.2. KERANGKA KONSEP



Mencit Balb/c diberi jus *A.vera* selama 9 hari kemudian diinfeksi dengan *S. typhimurim* pada hari ke-6, setelah 4 hari post infeksi mencit dibunuh untuk dilihat respon proliferasi limfosit yang meliputi berat limpa, jumlah limfosit dan jumlah relatif limfoblas, produksi ROI makrofag serta hitung koloni kuman pada kultur hepar.

3.3. HIPOTESIS

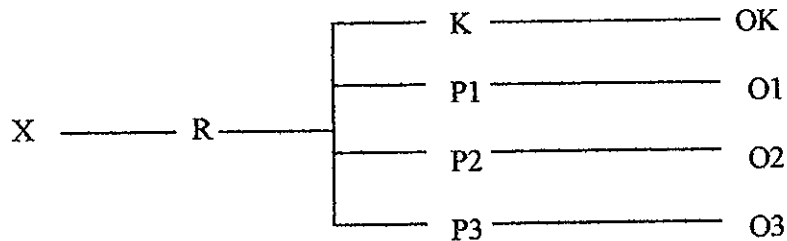
1. Respon proliferasi limfosit lebih tinggi pada kelompok mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium* yang diberi jus *A. vera* dibandingkan dengan kelompok kontrol.
2. Produksi ROI makrofag lebih tinggi pada kelompok mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium* yang diberi jus *A. vera* dibandingkan dengan kelompok kontrol.
3. Hitung kuman pada kultur hepar lebih rendah pada kelompok mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium* yang diberi jus *A. vera* dibandingkan dengan kelompok kontrol.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik murni dengan rancangan *The Post Test-Only Control Group* yang menggunakan hewan coba sebagai objek penelitian.⁸⁷ Percobaan dilakukan dengan rancangan acak lengkap. Perlakuan adalah pemberian ekstrak *Aloe vera* dengan keluaran adalah perubahan respon proliferasi limfosit, produksi ROI makrofag dan hitung koloni kuman pada organ hepar.



Keterangan :

X → R : masa adaptasi 1 minggu

R : randomisasi

K : kontrol, sebagai pembanding, mencit hanya mendapat pakan standar selama 9 hari dan diinfeksi dengan *S. typhimurium* intra peritoneal pada hari ke-6.

P1 : mencit diberi jus *A. vera* dosis 0,1 ml per oral setiap hari selama 9 hari dan diinfeksi *S. typhimurium* intra peritoneal pada hari ke-6.

- P2 : mencit diberi jus *A. vera* dosis 0,3 ml per oral setiap hari selama 9 hari dan diinfeksi *S. typhimurium* intra peritoneal pada hari ke-6.
- P3 : mencit diberi jus *A. vera* dosis 0,5 ml per oral setiap hari selama 9 hari dan diinfeksi *S. typhimurium* intra peritoneal pada hari ke-6.
- OK : pengamatan pada mencit kelompok kontrol
- O1 : pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P1
- O2 : pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P2
- O3 : pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P3

4.2. POPULASI DAN SAMPEL

4.2.1. Populasi

Populasi target penelitian ini adalah mencit strain Balb/c. Populasi terjangkau adalah mencit betina Balb/c berusia 8-10 minggu.⁸⁸ Beberapa penelitian menunjukkan bahwa strain ini sensitive terhadap infeksi *S. typhimurium* dan beberapa jam setelah infeksi akan menimbulkan respon imunitas seluler melawan bakteri tersebut.

Kuman *S. typhimurium* virulen (*phage type 510*) dipilih dalam penelitian ini karena patogen ini merupakan organisme ideal dan banyak dijadikan model untuk mempelajari respon imun non spesifik maupun spesifik terhadap infeksi bakteri intraseluler.

4.2.2. Sampel

4.2.2.1. Cara Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit dengan kriteria inklusi untuk menghindari bias dalam perlakuan, yaitu⁸⁹:

1. Faktor keturunan mencit, diambil dari populasi mencit yang secara genetis adalah homogen yaitu strain Balb/c.
2. Jenis kelamin betina.
3. Umur, 8-10 minggu.
4. Berat badan sebelum perlakuan 20-30 gram.
5. Penampilan fisik, dipilih mencit yang sehat, lincah dan tidak mempunyai kelainan anatomis yang nampak.

Faktor eksklusi yaitu :

1. Jenis kelamin jantan.
2. Umur lebih atau kurang dari 8-10 minggu.
3. Berat badan sebelum perlakuan lebih atau kurang dari 20-30 gram.
4. Mencit terlihat sakit dan mempunyai kelainan anatomis yang nampak.

4.2.2.2. Jumlah Sampel

Perhitungan jumlah sampel minimal menggunakan rumus besar sampel eksperimental dari *Ferederer*, yaitu $(t-1)(r-1) \geq 15$ dimana t = jumlah perlakuan dan r = jumlah ulangan atau sampel perkelompok.⁹⁰ Dalam penelitian ini jumlah perlakuan adalah 4, sehingga jumlah sampel perkelompok perlakuan harus lebih dari 5. Pada penelitian ini menggunakan 6 ekor mencit perkelompok, sehingga

jumlah yang dibutuhkan untuk penelitian eksperimental laboratorik sebanyak 24 ekor mencit.

4.3. VARIABEL PENELITIAN⁸⁷

4.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian jus *A. vera* dengan dosis bervariasi (0,1 ml/hari, 0,3 ml/hari dan 0,5 ml/hari). Dosis yang digunakan berdasarkan dosis yang telah dikonversi dari kisaran dosis jus *A. vera* untuk tikus (0,5-3 ml).^{91,92}

4.3.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah respon proliferasi limfosit, produksi ROI makrofag dan pertumbuhan kuman pada kultur organ hepar.

- a. Respon proliferasi limfosit yang berupa berat limpa dalam mg, jumlah limfosit dihitung dari jumlah limfosit dalam larutan limpa /cc dan jumlah relatif limfoblas pada sediaan apus limpa dihitung per 200 sel.⁹³
- b. Produksi ROI makrofag diperiksa dengan menggunakan *Nitroblue Tetrazolium (NBT) Reduction Assay*. Dengan adanya anion superoksid/ O_2^- pada kultur makrofag yang diinduksi PMA, akan menyebabkan NBT tereduksi membentuk presipitat *formazan* yang hasilnya dibaca dibawah mikroskop cahaya dengan diukur prosentase dan derajatnya/ 50 makrofag.⁹⁴
- c. Pertumbuhan kuman pada kultur organ hepar adalah penghitungan jumlah koloni kuman yang dinyatakan dalam CFU/gram jaringan.⁹⁵

4.5. ALAT/ INSTRUMEN PENELITIAN

- ☼ S spuit disposable 1 cc dan 10 cc steril dengan jarum ukuran 18 atau 20 gauge
- ☼ Tabung sentrifuse 15 ml dan 50 ml steril
- ☼ Pipet ukur 25 ml dan 50 ml
- ☼ Gelas ukur
- ☼ Gunting, pinset dan klem
- ☼ Kaca benda, coverslip
- ☼ Pipet Pasteur steril
- ☼ *Refrigerated centrifuge*
- ☼ Tabung reaksi biasa
- ☼ *Pipet ependorf*
- ☼ *Hemocytometer*
- ☼ *Microplate 24 well*
- ☼ *Laminar flow hood*
- ☼ Timbangan elektrik
- ☼ Inkubator
- ☼ Sonde lambung
- ☼ Mikroskop cahaya, kamera foto
- ☼ *Colony counter*
- ☼ Alluminium foil, mortir
- ☼ Cawan petri
- ☼ *Vortex Genie 2*
- ☼ Kandang hewan coba

4.6. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di : Laboratorium Biokimia, Laboratorium Bioteknologi, dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang pada bulan Juli – Agustus 2004.

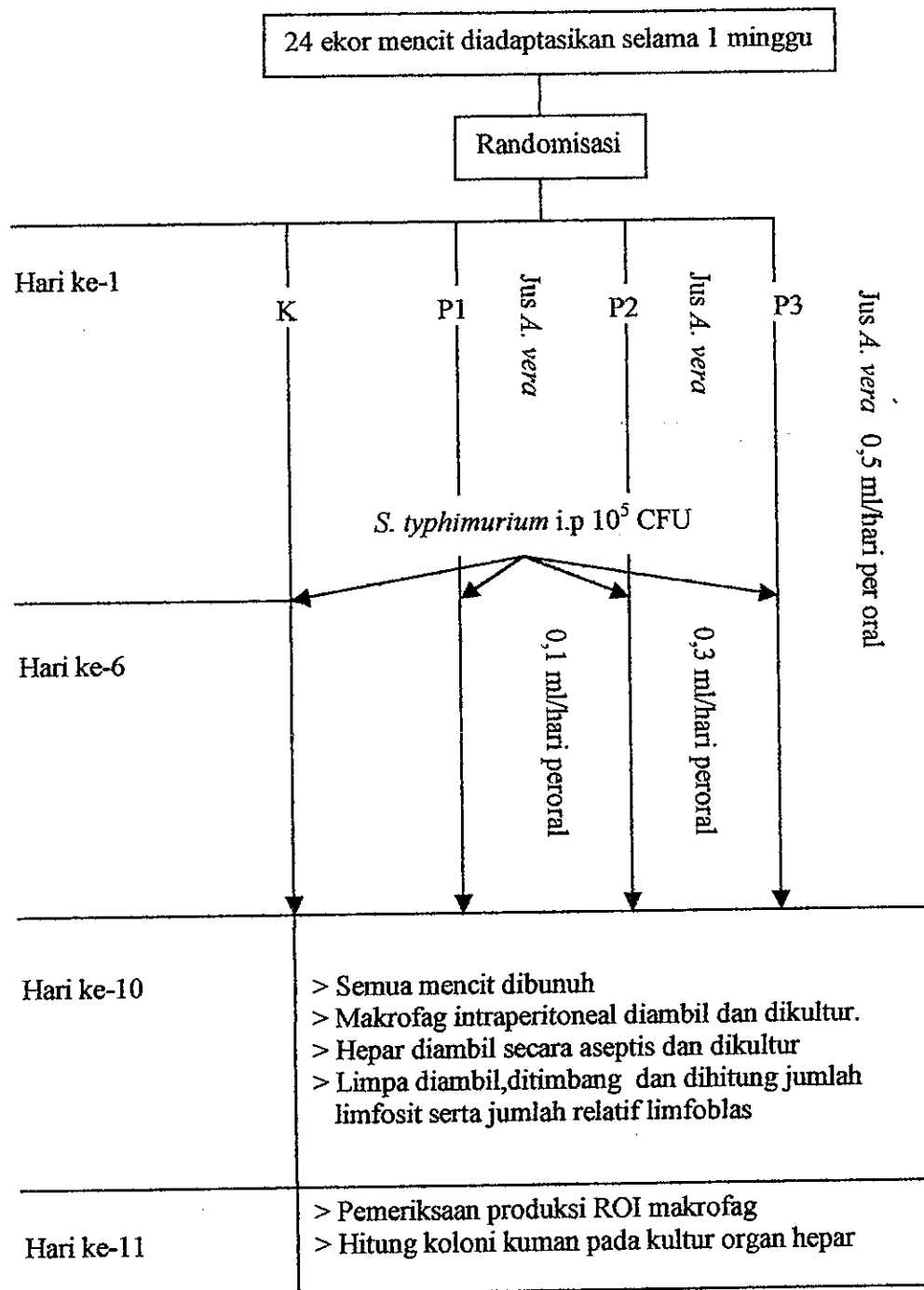
4.7. PROSEDUR PENGUMPULAN DATA

1. Dua puluh empat ekor mencit betina strain Balb/c berumur 8-10 minggu diadaptasikan selama seminggu di laboratorium dengan dikandangkan secara memadai dan diberi pakan standar serta minum secara *ad libitum*.

2. Dua puluh empat ekor mencit dibagi menjadi 4 kelompok kecil dimana masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit yang ditentukan dengan cara acak sederhana lalu dikandangan berkelompok.
3. Setiap kelompok diberi pakan standar sama dan dilakukan penimbangan berat badan sebelum perlakuan
 - ◆ Kelompok kontrol (K) : mencit hanya mendapat diet standar selama 9 hari, pada hari ke-6 diinfeksi 10^5 CFU *S. typhimurium* intra peritoneal. Hari ke-10 mencit dibunuh untuk dilakukan pemeriksaan respon proliferasi limfosit, produksi ROI makrofag dan kultur organ hepar. Pada hari ke-11 dihitung koloni kuman pada kultur organ hepar.
 - ◆ Kelompok P1 : mencit mendapat diet standar dan jus *A. vera* dengan dosis 0,1 ml peroral setiap hari selama 9 hari, pada hari ke-6 diinfeksi 10^5 CFU *S. typhimurium* intraperitoneal. Hari ke-10 mencit dibunuh untuk dilakukan pemeriksaan respon proliferasi limfosit, produksi ROI makrofag dan kultur organ hepar. Pada hari ke-11, hitung koloni kuman pada kultur organ hepar.
 - ◆ Kelompok P2 : mencit mendapat diet standar dan jus *A. vera* dengan dosis 0,3 ml peroral setiap hari selama 9 hari, pada hari ke-6 diinfeksi 10^5 CFU *S. typhimurium* intraperitoneal. Hari ke-10 mencit dibunuh untuk dilakukan pemeriksaan respon proliferasi limfosit, produksi ROI makrofag dan kultur organ hepar. Pada hari ke-11, hitung koloni kuman pada kultur organ hepar.

- ◆ Kelompok P3 : mencit mendapat diet standar dan jus *A. vera* dengan dosis 0,5 ml peroral setiap hari selama 9 hari, pada hari ke-6 diinfeksi 10^5 CFU *S. typhimurium* intraperitoneal. Hari ke-10 mencit dibunuh untuk dilakukan pemeriksaan respon proliferasi limfosit, produksi ROI makrofag dan kultur organ hepar. Pada hari ke-11, hitung koloni kuman pada kultur organ hepar.

4.8. ALUR KERJA PENELITIAN



4.9. PROSEDUR PEMERIKSAAN

4.9.1. Prosedur Pengambilan Sampel dari Hewan Percobaan

1. Mencit dibunuh dengan dislokasi leher setelah dinarkose dengan kloroform. Mencit diletakkan dalam posisi terlentang dan seluruh permukaan ventral disemprot alkohol 70 %.
2. Buat irisan kecil pada kulit menggunakan gunting pada medial abdomen. Robek kulit menggunakan 2 pinset ke arah kepala dan ekor mencit, sehingga kulit terkelupas dan tampak peritoneum. Basahi peritoneum dengan alkohol 70 % untuk menyingkirkan bulu-bulu yang rontok.
3. Sepuluh ml medium RPMI yang mengandung 2% FBS disuntikkan dalam rongga peritoneum, ditunggu 2 menit sambil dipijat perlahan.
4. Cairan peritoneal diaspirasi dari rongga peritoneum dengan cara menekan organ dalam dengan 2 jari, cairan diaspirasi dengan spuit injeksi, dipilih bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus. Aspirat yang didapat ditampung dalam tabung sentrifuse.
 - a. Aspirat yang didapat kemudian disentrifuse pada kecepatan 1200 rpm, suhu 4°C selama 10 menit. Bila cairan terkontaminasi darah, sel dicuci dengan NH_4Cl 2 ml disentrifus pada 1200 rpm, 4°C selama 2 menit, supernatan dibuang. Dicuci kembali dengan RPMI 2% FBS disentrifus pada 1200 rpm, 4°C selama 10 menit, lalu supernatan dibuang. Pencucian diulang sampai 2 kali
 - b. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 2 ml medium RPMI komplet (RPMI 1640 yang mengandung *L*-glutamin (1mM), *Foetal*

Bovine Serum (FBS) 10% dan ditambah antibiotika (*Penicillin* 50 unit dan *Streptomycin* 50 µg/ml).

- c. Sel-sel dihitung dengan hemositometer dengan cara meneteskan setetes larutan (10 µl) pada bilik hitung dan dihitung jumlah sel makrofagnya. Resuspensikan lagi dengan medium komplet RPMI sehingga di dapat suspensi sel dengan kepadatan 5×10^5 sel/ml.
 - d. Sel yang didapat merupakan PEC yang dipergunakan untuk pemeriksaan produksi ROI makrofag.
5. Peritoneum dibuka, hepar diambil secara aseptis untuk dilakukan kultur hitung kuman. Limpa diambil untuk pengukuran berat limpa dan penghitungan proliferasi limfosit.

4.9.2. Pemeriksaan Proliferasi Limfosit

Respon proliferasi limfosit dapat dinilai berdasarkan parameter makroskopis dan mikroskopis. Respon secara makroskopis dilihat dari penambahan berat limpa, sedangkan parameter mikroskopis berupa jumlah limfosit di limpa dan jumlah relatif sel limfosit muda (limfoblas).⁹³

1. Setelah limpa diangkat dari rongga peritoneum, kemudian dibersihkan dari jaringan ikat maupun pembuluh darah yang masih melekat. Berat limpa diukur menggunakan timbangan elektrik dalam satuan milligram.
2. Penghitungan jumlah limfosit dilakukan dengan cara: limpa diletakkan di atas cawan kemudian dihancurkan dan menjadi cair. Kotoran pada substrat dibersihkan, selanjutnya dilakukan pencucian dengan PBS 5 ml disentrifuse pada 1200 rpm, 4°C selama 10 menit lalu supernatan

dibuang. Eritrosit dilisisikan dengan NH_4Cl 2 ml disentrifus pada 1200 rpm, 4°C selama 2 menit dan supernatan dibuang, kemudian dicuci dengan PBS 1 kali lagi. Setelah pencucian dengan PBS yang kedua kali dan supernatan dibuang lalu ditambah PBS 2 ml. Jumlah limfosit dihitung dengan bilik hitung *Neubauer Improve*, dengan cara meneteskan cairan limpa tersebut pada bilik hitung.

3. Untuk penghitungan jumlah relatif limfoblas yaitu dengan cara :

- Setetes substrat limpa diambil dan dibuat preparat apus di atas gelas sediaan.
- Dilakukan fiksasi dengan methanol dan dikeringkan.
- Dicat dengan pewarna Giemsa.
- Jumlah sel limfoblas dihitung dari 200 sel (limfoblas + limfosit) di area homogen menggunakan mikroskop cahaya dengan objective 400X. Limfoblas diidentifikasi sebagai sel besar dengan inti yang bernukleolus, kromatin belum padat (warna lebih muda) dan masih terlihat adanya sitoplasma. Sedangkan limfosit ukuran selnya lebih kecil dengan inti bulat berkromatin padat (warna lebih tua) tidak ada nucleolus dan hampir tidak terlihat sitoplasma.

4.9.3. Pemeriksaan Produksi ROI (O_2^-) dengan Cara Reduksi NBT⁹⁴

Prinsip: Makrofag distimulasi dengan PMA sehingga mensekresi anion superoksid (O_2^-) yang akan mengoksidasi NBT menjadi presipitat *formazan* (tidak larut) yang tampak berwarna biru dengan pewarnaan *Neutral Red* jika dilihat dengan mikroskop cahaya. Terbentuknya presipitat yang berwarna

biru tersebut dihitung persentasenya pada tiap sel makrofag sebanyak 50 sel kemudian ditentukan derajatnya.

Cara pemeriksaan sebagai berikut :

1. Suspensi makrofag (PEC) yang telah dihitung dikultur pada microplate 24 well yang telah diberi coverslip bulat, setiap sumuran 200 μ l (5×10^5 sel), diinkubasi dalam incubator CO₂ 5% 37°C selama 30 menit.
2. Ditambahkan medium komplet 1 ml/ sumuran, diinkubasi selama 2 jam.
3. Sel dicuci dengan RPMI 2x, kemudian ditambahkan medium komplet 1ml/sumuran diinkubasi 24 jam.
4. Setelah itu ditambahkan 500 μ l larutan NBT yang mengandung 125 ng/ml PMA. Pada sumuran kontrol hanya diberi NBT saja.
5. Diinkubasi dalam incubator CO₂ 5% 37°C selama 60 menit.
6. Sel dicuci dengan PBS 3x, dikeringkan pada suhu kamar.
7. Fiksasi dengan methanol absolut selama 2-3 menit.
8. Setelah kering diwarnai dengan 2% *Neutral Red Sol.* selama 15 menit, dicuci dengan aquades dan dikeringkan pada suhu kamar.
9. Coverslip dimounting pada kaca obyek dengan canada balsam.
10. Sel dengan reduksi NBT (biru) dihitung presentasi dan derajatnya.

Derajat presipitat didasarkan pada persentase terbentuknya presipitat, dengan kriteria sebagai berikut :

Derajat 1 : presipitat < 25%	Derajat 3 : presipitat 50-75%
Derajat 2 : presipitat 25-50%	Derajat 4 : presipitat > 75%

Masing-masing sediaan dibaca pada 50 sel makrofag kemudian dibuat rata-ratanya.

4.9.4. Pemeriksaan Koloni Kuman pada Kultur Organ Hepar⁹⁵

1. Diambil organ hepar secara aseptis dari setiap individu mencit dan dilakukan penimbangan.
2. Jaringan hepar dihancurkan dengan mortir setelah menambahkan 1 ml NaCl fisiologis steril di dalam tabung.
3. Disiapkan 6 buah tabung untuk pengenceran bertingkat yang masing-masing berisi 4,5 ml NaCl fisiologis steril.
4. Dimasukkan 0,5 ml larutan dari mortir ke tabung I dan dilakukan homogenisasi menggunakan vortex.
5. Diambil 0,5 ml larutan dari tabung I kemudian masukkan ke tabung II dan seterusnya dilakukan prosedur yang sama sampai tabung VI sehingga telah dilakukan pengenceran 1 : 10 untuk tiap tingkat pengenceran. Pada tabung terakhir diambil 0,5 ml untuk dibuang. Semua proses dilakukan dalam *laminar flow*.
6. Sampel dari masing-masing tabung pengenceran sebanyak 0,1 ml diinokulasikan pada *Salmonella-Shigella Agar*, dengan cara *surface spreading* kemudian diinkubasi dalam inkubator 37°C selama 24 jam. Semua prosedur diatas dilakukan secara aseptis.
7. Dihitung jumlah koloni pada masing-masing plate pengenceran yang berisi 30-300 CFU.
8. Hitung *Colony Forming Unit/gram* jaringan dengan rumus sebagai berikut :

$$\frac{\text{Jumlah CFU} \times \text{Pengenceran} \times 10 \text{ (karena inokulasinya hanya 0,1 ml per plate)}}{\text{Berat jaringan (gram)}}$$

4.10. ANALISIS DATA^{97,98}

Sebelum dilakukan uji hipotesis, data yang terkumpul terlebih dahulu diedit, dikoding, di-entry dalam file komputer dan di-cleaning. Setelah itu dilakukan analisis statistik deskriptif dan analitik.

Dalam analisis deskriptif, dihitung nilai kecenderungan sentral (*mean* dan *median*) dan sebaran (SD) dari variabel tergantung (proliferasi limfosit, produksi ROI makrofag dan hitung koloni pada organ hepar). Hasilnya disajikan dalam bentuk tabel silang. Dibuat grafik *box-plot* menurut kelompok perlakuan. Untuk menilai normalitas dari variabel tergantung dilakukan uji dengan *Shapiro-Wilk*.

Kemampuan proliferasi limfosit yang meliputi berat limpa dan jumlah relatif limfoblas berdistribusi data normal sehingga dalam analisis digunakan uji hipotesis menggunakan *One way ANOVA* dilanjutkan dengan uji *Bonferroni*. Sedangkan untuk jumlah limfosit dan hitung koloni kuman organ hepar didapatkan distribusi data yang tidak normal sehingga dilakukan uji *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji beda *Mann-Whitney U*. Untuk hasil pemeriksaan produksi ROI yang berupa data berskala ordinal dilakukan analisis non parametrik menggunakan uji *Kruskal Wallis* dilanjutkan uji *Mann-Whitney U*. Analisis statistik dibantu dengan program *SPSS 11.0 for windows*. Nilai signifikansi dalam penelitian ini apabila variabel yang dianalisis memiliki $p < 0,05$.

BAB 5

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. HASIL

5.1.1. Respon Proliferasi limfosit

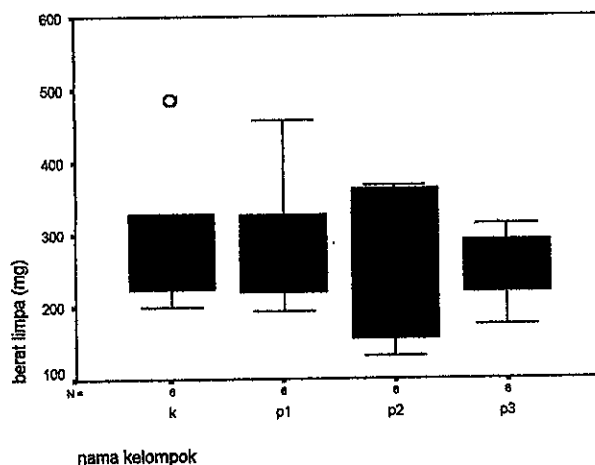
5.1.1.1. Berat Limpa

Berat limpa diukur dengan menggunakan timbangan elektrik dalam satuan milligram (mg), data hasil pengukuran dapat dilihat pada lampiran 3, sedangkan hasil analisis deskriptif terlihat pada tabel 1 dan gambar 3 :

Tabel 1. Hasil Analisis Berat Limpa

Berat limpa (mg)

Kelompok	N	Rerata \pm SD	Median	Std Error	Interval Kepercayaan 95%		Minimum	Maximum
					Batas bawah	Batas atas		
K	6	290,12 \pm 105,91	251,00	43,24	178,96	401,27	199,10	487,30
P1	6	289,58 \pm 94,67	268,85	38,65	190,23	388,93	194,40	458,30
P2	6	247,43 \pm 104,69	232,60	42,74	137,56	357,31	131,70	369,00
P3	6	243,18 \pm 51,28	228,75	20,93	189,37	296,99	174,90	314,30



Gambar 3. Grafik *Boxplot* Berat Limpa

Pada tabel 1 terlihat bahwa rerata berat limpa pada kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3) lebih rendah dibanding kelompok kontrol. Rerata berat limpa paling tinggi terdapat pada kelompok kontrol, yaitu sebesar $290,12 \pm 105,91$ mg, sedangkan rerata paling rendah terdapat pada kelompok P3, yaitu $243,18 \pm 51,28$ mg. Pada grafik *boxplot* terlihat bahwa nilai median antara kelompok kontrol dengan ke tiga kelompok perlakuan terlihat tidak berbeda nyata.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa distribusi data berat limpa adalah normal sehingga uji beda dilakukan dengan *One Way ANOVA*. Berdasarkan uji beda tersebut ternyata antara kelompok kontrol dengan semua kelompok perlakuan tidak didapatkan perbedaan yang bermakna dengan $p > 0,05$ ($p = 0,705$).

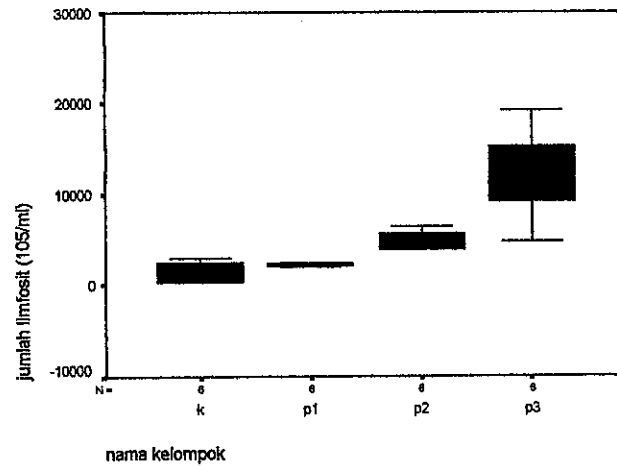
5.1.1.2. Jumlah Limfosit

Jumlah limfosit dihitung dari jumlah limfosit dalam larutan limpa /cc dengan menggunakan bilik hitung *Neubauer Improve*. Data hasil penghitungan disajikan pada lampiran 3 dan hasil analisisnya pada tabel 2 dan gambar 4 :

Tabel 2. Hasil Analisis Jumlah Limfosit

Jumlah Limfosit ($\times 10^5$)

Kelompok	N	Rerata \pm SD	Median	Std Error	Interval Kepercayaan 95%		Minimum	Maksimum
					Batas bawah	Batas atas		
K	6	1.420,83 \pm 1.168,38	1.312,5	467,99	194,70	2.646,97	250	2.950
P1	6	2.179,17 \pm 145,27	2.150	59,31	2.026,71	2.331,62	2.000	2.375
P2	6	4.866,67 \pm 960,55	4.600	392,14	3.858,63	5.874,71	4.000	6.400
P3	6	11.866,67 \pm 5.025,80	11.400	2.051,8	6.592,41	1.7140,92	4.800	19.200



Gambar 4. Grafik *Boxplot* Jumlah Limfosit

Rerata jumlah limfosit tertinggi terlihat pada kelompok perlakuan P3, yaitu $(11866,67 \times 10^5) \pm (5025,80 \times 10^5)$ sedangkan terendah pada kelompok kontrol (K) yaitu $(1420,83 \times 10^5) \pm (1168,38 \times 10^5)$. Pada grafik *boxplot* diatas terlihat bahwa kecenderungan nilai median yang makin meningkat pada kelompok perlakuan di banding kontrol, hal ini memperlihatkan adanya *dose response relationship*.

Berdasarkan uji *Kruskal Wallis* terlihat adanya perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan ($p < 0,0001$), dimana kelompok yang diberi jus *A. vera* jumlah limfositnya lebih tinggi dari kelompok kontrol.

Selanjutnya dengan menggunakan uji beda terkecil *Mann Whitney U* (tabel 3) terlihat bahwa kelompok yang mempunyai jumlah limfosit yang berbeda bermakna dengan kelompok kontrol adalah kelompok P2 ($p = 0,004$) dan kelompok P3 ($p = 0,004$), sedangkan kelompok P1 tidak berbeda bermakna ($p = 0,337$) dengan kontrol. Kelompok P1 berbeda bermakna dengan kelompok P2 dan P3 ($p = 0,004$). Kelompok P3 berbeda bermakna dengan P1 dan P2 ($p = 0,013$).

Berdasarkan hasil tersebut maka disimpulkan bahwa semakin meningkat dosis jus *A. vera* yang diberikan semakin tinggi jumlah limfositnya.

Tabel 3. Hasil Uji *Mann Whitney U* Jumlah limfosit

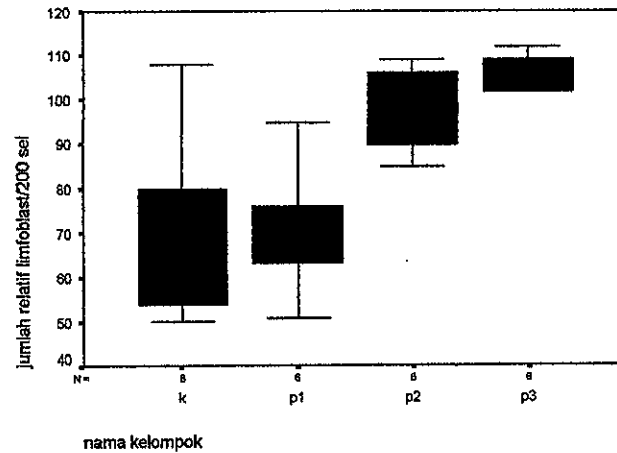
Kelompok	K	P1	P2	P3
K		0,337	0,004*	0,004*
P1	0,337		0,004*	0,004*
P2	0,004*	0,004*		0,013*
P3	0,004*	0,004*	0,013*	

5.1.1.3. Jumlah Relatif Limfoblas

Jumlah relatif sel limfoblas dihitung dari preparat apus limpa yang telah diwarnai dengan pewarna *Giemsa* dan dihitung dari 200 sel (limfoblas + limfosit) dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 X. Data hasil penghitungan tersaji pada lampiran 3 dan hasil analisisnya pada tabel 4 dan gambar 5 :

Tabel 4. Hasil Analisis Jumlah Relatif Limfoblas

Kelompok	N	Rerata ± SD	Median	Std Error	Interval Kepercayaan		Minimum	Maksimum
					95%			
					Batas bawah	Batas atas		
K	6	69,83 ± 21,89	63,5	8,94	46,86	92,81	50	108
P1	6	70,50 ± 14,65	69,0	5,92	55,12	85,88	51	95
P2	6	99,17 ± 9,62	102,5	3,93	89,07	109,26	85	109
P3	6	105,50 ± 4,09	104,0	1,67	101,21	109,79	102	112



Gambar 5. Grafik *Boxplot* Jumlah Relatif Limfoblas

Dari tabel di atas tampak bahwa rerata jumlah relatif limfoblas dari kelompok perlakuan (P1, P2, P3) lebih tinggi dari kelompok kontrol. Rerata pada kelompok kontrol yaitu $69,83 \pm 21,89$ sel, sedangkan rerata tertinggi terdapat pada kelompok P3 yaitu $105,50 \pm 4,09$. Grafik *boxplot* di atas menunjukkan nilai median jumlah relatif limfoblas yang semakin meningkat dengan meningkatnya dosis *A. vera*, terutama antara dosis P1 ke P2 terlihat peningkatan jumlah relatif limfoblas yang menyolok.

Data dari jumlah relatif limfoblas ini berdistribusi normal sehingga uji lanjutnya menggunakan *One Way ANOVA* dan didapatkan hasil analisis berbeda bermakna antar kelompok percobaan dengan $p < 0,05$ ($p < 0,0001$). Perbedaan lebih lanjut antar kelompok percobaan dianalisis menggunakan *Post Hoc Test (uji Bonferroni)* seperti terlihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil *Post Hoc Test (Uji Bonferroni)* Jumlah Relatif Limfoblas

Kelompok	K	P1	P2	P3
K		1,000	0,011*	0,002*
P1	1,000		0,013*	0,002*
P2	0,011*	0,013*		1,000
P3	0,002*	0,002*	1,000	

Pada tabel tersebut terlihat bahwa perbedaan bermakna terjadi antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan P2 ($p= 0,011$) dan dengan kelompok P3 ($p= 0,002$), sedangkan dengan kelompok P1 tidak berbeda bermakna ($p= 1,000$). Kelompok P1 berbeda bermakna dengan P2 ($p= 0,013$) dan P3 ($p= 0,002$). Kelompok P3 tidak berbeda bermakna dengan P2 ($p= 1,000$). Berdasarkan hasil tersebut maka disimpulkan bahwa pemberian jus *A. vera* yang mampu meningkatkan jumlah relatif limfoblas secara bermakna yaitu pada dosis 0,3 ml dan 0,5 ml, jadi dengan meningkatnya dosis mampu meningkatkan jumlah relatif limfoblas.

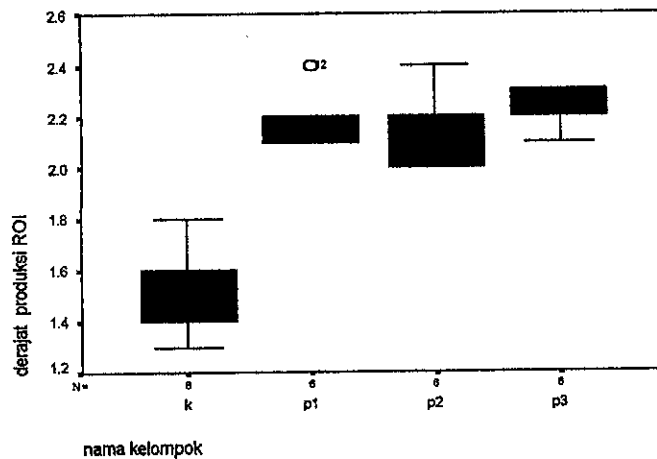
5.1.2. Produksi ROI Makrofag

Produksi ROI makrofag diperiksa dengan menggunakan *Nitroblue Tetrazolium (NBT) Reduction Assay*. Dengan adanya anion superoksid/ O_2^- pada kultur makrofag yang diinduksi PMA, akan menyebabkan NBT tereduksi membentuk presipitat formazan. Hasilnya dibaca dibawah mikroskop cahaya dengan diukur prosentase dan derajatnya per 50 makrofag kemudian dibuat rata-rata dan dinyatakan dalam derajat 1 - 4. Data hasil pemeriksaan terlihat pada lampiran 3 dan hasil analisisnya tampak dalam tabel 6 dan gambar 6:

Tabel 6. Hasil Analisis Produksi ROI Makrofag

Produksi ROI (superoksida)

Kelompok	N	Rerata \pm SD	Median	Std Error	Interval Kepercayaan 95%		Minimum	Maksimum
					Batas bawah	Batas atas		
					K	6		
P1	6	2,17 \pm 0,12	2,1	0,05	2,04	2,29	2,1	2,4
P2	6	2,13 \pm 0,15	2,1	0,06	1,97	2,29	2,0	2,4
P3	6	2,25 \pm 0,08	2,3	0,03	2,16	2,34	2,1	2,3

Gambar 6. Grafik *Boxplot* Produksi ROI

Pada grafik *boxplot* di atas terlihat bahwa nilai median produksi ROI makrofag pada kelompok perlakuan (P1, P2, P3) tampak berbeda nyata dibanding kontrol, namun antar kelompok perlakuan tidak berbeda nyata. Hal ini memperlihatkan tidak adanya perbedaan pengaruh dosis yang berbeda.

Data penghitungan ROI merupakan data dalam skala ordinal, sehingga digunakan uji nonparametrik *Kruskal Wallis* yang dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil dengan uji *Mann Whitney U*. Berdasarkan uji *Kruskal Wallis* ($p=0,002$) terlihat bahwa pemberian jus *A. vera* meningkatkan produksi ROI dilihat dari reratanya yang lebih tinggi dari rerata kelompok kontrol ($1,53 \pm 0,17$).

Kelompok P3 mempunyai rerata produksi ROI tertinggi yaitu $2,25 \pm 0,08$ diikuti oleh kelompok P2 ($2,13 \pm 0,15$) dan P1 ($2,17 \pm 0,12$).

Selanjutnya dengan menggunakan uji beda terkecil *Mann Whitney U* (tabel 7) terlihat bahwa semua produksi ROI kelompok perlakuan berbeda bermakna dengan kelompok kontrol yaitu kelompok P1 ($p= 0,003$), kelompok P2 ($p= 0,004$) dan kelompok P3 ($p= 0,003$). Terdapat perbedaan bermakna produksi ROI pada mencit yang mendapat jus *A. vera* dibandingkan dengan mencit yang tidak diberikan jus tersebut, tetapi antar perlakuan dosis yang berbeda tidak ada perbedaan pengaruh yang nyata. Berdasarkan hasil tersebut maka disimpulkan bahwa pemberian dosis jus *A. vera* terkecil (0,1 ml/hari) sudah mampu meningkatkan produksi ROI secara maksimal.

Tabel 7. Hasil Uji *Mann Whitney U* Produksi ROI Makrofag

Kelompok	K	P1	P2	P3
K		0,003*	0,004*	0,003*
P1	0,003*		0,492	0,149
P2	0,004*	0,492		0,117
P3	0,003*	0,149	0,117	

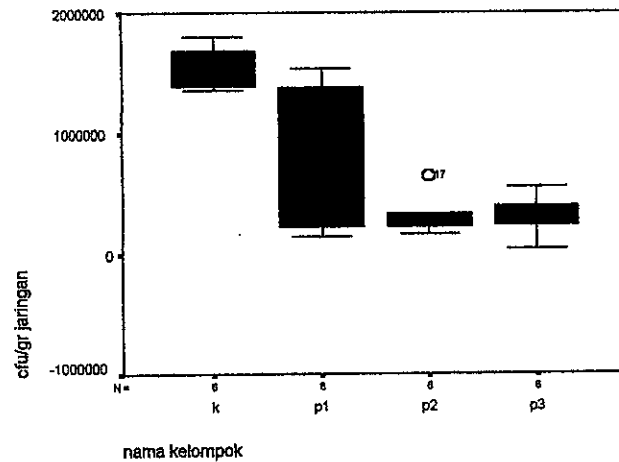
5.1.3. Hitung Kuman Organ Hepar

Pertumbuhan kuman pada kultur organ hepar adalah penghitungan jumlah koloni kuman yang dinyatakan dalam CFU/gram jaringan. Data hitung kuman terlihat pada lampiran 3 dan hasil analisis statistik terlihat pada tabel 8 dan gambar

7:

Tabel 8. Hasil Analisis Hitung Kuman

Kelompok	N	Rerata ± SD	Median	Std Error	Interval Kepercayaan		Minimum	Maksimum
					95%			
					Batas bawah	Batas atas		
K	6	1.534.000 ± 173.023,69	1.484.500	70636,63	1.352.422,76	1.715.577,24	1.362.000	1.799.000
P1	6	666.683,33 ± 624.114,92	345.650	254793,9	11.714,89	1.321.651,78	153.600	1.541.000
P2	6	319.355,00 ± 172.718,60	255.225	70512,07	138.097,94	500.612,06	173.000	653.600
P3	6	314.466,67 ± 174.055,59	320.600	71057,9	131.806,52	497.126,81	42.700	560.300

Gambar 7. Grafik *Boxplot* Hitung Kuman

Pada tabel di atas terlihat bahwa rerata hitung kuman organ hepar tertinggi terdapat pada kelompok kontrol yang tidak mendapat jus *A. vera* yaitu 1534000 ± 173023,7 cfu/gram, berturut-turut diikuti oleh kelompok P1 (666683,33 ± 624114,9 cfu/gram), kelompok P2 (319355,00 ± 172718,6 cfu/gram) dan rerata yang paling rendah pada kelompok P3 yaitu 314466,67 ± 174055,6 cfu/gram. Grafik *boxplot* di atas memperlihatkan nilai median yang tampak berbeda nyata semakin menurun pada semua kelompok perlakuan (P1, P2, P3) dibanding kontrol, tetapi antar kelompok perlakuan dengan dosis yang berbeda tidak menunjukkan penurunan hitung kuman yang berbeda secara nyata.

Data hitung kuman berdistribusi tidak normal, maka uji hipotesis untuk melihat perbedaan pada keempat kelompok percobaan menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Hasil uji tersebut memperlihatkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok percobaan $p < 0,05$ ($p = 0,011$). Untuk melihat besarnya perbedaan yang nyata antar kelompok percobaan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney U*. Hasil analisis terlihat pada tabel 9. Perbedaan yang bermakna terlihat pada semua kelompok perlakuan (P1, P2, P3) dibandingkan dengan kelompok kontrol, yaitu dengan kelompok P1 ($p = 0,037$), dengan kelompok P2 ($p = 0,004$) dan dengan kelompok P3 ($p = 0,004$). Antar kelompok P1, P2 dan P3 tidak ada perbedaan bermakna. Pemberian jus *A. vera* dapat menurunkan hitung kuman organ hepar dengan perbedaan yang bermakna dibanding kelompok yang tidak diberi jus tersebut, akan tetapi antar kelompok perlakuan dengan semakin meningkatnya dosis tidak menunjukkan perbedaan bermakna pada jumlah kuman. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa pemberian dosis jus *A. vera* terkecil (0,1 ml/hari) sudah mampu menurunkan hitung kuman secara maksimal.

Tabel 9. Hasil Uji *Mann Whitney U* Hitung Kuman

Kelompok	K	P1	P2	P3
K		0,037*	0,004*	0,004*
P1	0,037*		0,631	0,631
P2	0,004*	0,631		0,631
P3	0,004*	0,631	0,631	

5.2. PEMBAHASAN

5.2.1. Proliferasi Limfosit

Respon imun seluler akan teraktifasi untuk mengeliminasi infeksi oleh bakteri intraseluler seperti *S. typhimurium*, diantaranya dengan adanya respon proliferasi limfosit. Respon proliferasi limfosit secara makroskopis dilihat dengan adanya penambahan ukuran (besar dan berat) limpa (*splenomegaly*). Pembesaran limpa merupakan penemuan klinis penting pada sepsis dan mencerminkan penambahan fungsi fagositik.⁹⁹ Pada penelitian ini ternyata tidak ada penambahan berat limpa yang berbeda bermakna terhadap kontrol pada semua kelompok yang diberi *A. vera*, berat limpa justru menurun dengan semakin meningkatnya dosis *A. vera*. Hal ini kemungkinan karena lamanya infeksi yang hanya 4 hari belum mencukupi untuk terjadinya pembesaran limpa. Menurut Manson dan Guerrant dalam Gasem (2001), pada infeksi oleh *S. typhimurium*, *hepatomegaly* lebih sering terjadi daripada *splenomegaly*, keduanya terjadi pada akhir minggu pertama atau awal minggu ke dua.¹⁰⁰

Berat limpa yang cenderung menurun pada kelompok yang diberi *A. vera* meski tidak berbeda bermakna dengan kontrol kemungkinan disebabkan oleh efek anti-inflamasi dari *A. vera* sehingga pembesaran organ karena pengaruh inflamasi dapat ditekan. Diketahui bahwa pada infeksi oleh *S. typhimurium* akan menginisiasi respon inflamasi pada tempat penyebaran bakteri ini, diantaranya akan mencapai limpa dan dapat menyebabkan pembesaran pada limpa tersebut.⁶⁰ Efek anti-inflamasi dari *A. vera* ini seperti ditunjukkan oleh beberapa penelitian, yaitu penelitian oleh Davis dan Maro (1989), *A. vera* mempunyai aktivitas anti-

inflamasi pada mencit diabetik dengan memblok respon leukosit *Polimorfonuklear* (PMN) ke tempat inflamasi.¹⁰² Penelitian lain oleh Vasques dkk (1996), efek anti-inflamasi *A. vera* yaitu dengan aksi inhibisi pada jalur asam *arachidonic* via *cyclooxygenase*.⁷⁸ Sedang penelitian oleh Tizard (1996) menyatakan bahwa ekstrak *Aloe* memprasarani mekanisme anti-inflamasi dengan memblok emigrasi neutrofil yang diprasarani oleh integrin $\beta 2$ tertentu (*LFA-01* dan *Mac-1*).⁷⁹

Imunitas terhadap *Salmonella* melibatkan komponen *cell mediated immunity* (CMI) seperti limfosit. Limfosit secara genetis diprogram agar mampu mengenal antigen tertentu saja. Organ limfoid sekunder seperti limpa berfungsi untuk menangkap dan mengumpulkan antigen dengan efektif, untuk proliferasi dan diferensiasi limfosit yang sudah disentisasi (*antigen committed lymphocyte*). Limfosit mengalami resirkulasi dari organ limfoid satu ke lainnya, ke saluran limfe dan darah sehingga sewaktu terjadi infeksi akan banyak limfosit terpajan dengan antigen kuman penginfeksi. Kemampuan mengenal antigen tersebut disebabkan oleh adanya reseptor pada permukaan sel limfosit tersebut. Limfosit yang telah distimulasi oleh antigen spesifik akan segera membelah dan akan mengekspresikan reseptor baru yang memungkinkan mereka untuk merespon terhadap sitokin dari sel lain yang merupakan sinyal proliferasi. Limfosit juga akan mulai mensekresi sitokin sendiri dan dibawah pengaruh sitokin tersebut mereka akan mengalami sejumlah siklus pembelahan sebelum berdiferensiasi menjadi sel efektor yang matang. Proliferasi akan menurunkan sel-sel yang secara genetis identik (*clonal selection*).^{7, 18}

Pengaruh pemberian jus *A. vera* pada penelitian ini dapat meningkatkan jumlah limfosit pada limpa dibandingkan kontrol, dengan perbedaan yang

bermakna dengan kelompok yang diberi dosis 0,3 ml (P2) dan 0,5 ml (P3) jus *A. vera*. Meski dengan dosis 0,1 ml (P1) tidak berbeda bermakna tetapi kelompok yang diberi jus *A. vera* ini jumlah limfositnya cenderung lebih tinggi dari kontrol. Hal ini kemungkinan disebabkan karena adanya rangsangan dari komponen *A. vera* yang bersifat mitogen terhadap limfosit. Mitogen dan lectin merupakan bahan alamiah yang mempunyai kemampuan mengikat dan merangsang banyak klon limfoid untuk proliferasi dan diferensiasi.⁷ Berdasarkan penelitian Imanishi (1993) dan Koike dkk (1995), *Aloctin A* (lectin) merupakan substansi aktif pada tanaman *Aloe* yang mempunyai aktivitas mitogenik bagi limfosit tikus.^{102, 103} Stimulasi limfosit dengan mitogen mengakibatkan berbagai reaksi biokimia di dalam sel, diantaranya fosforolasi nukleoprotein, pembentukan DNA dan RNA dan sebagainya. Secara morfologik perubahan-perubahan tersebut tampak sebagai sel yang menyerupai *blast*.⁶

Perlakuan dengan *A. vera* pada penelitian ini dapat meningkatkan jumlah relatif limfoblas limpa. Berdasarkan jumlah relatif limfoblas yang tinggi maka diasumsikan jumlah limfositnya juga akan tinggi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah relatif limfoblas yang berbeda bermakna dengan kontrol adalah kelompok P2 dan P3, sedangkan P1 cenderung lebih tinggi dari kontrol tetapi tidak berbeda bermakna. Hal ini sejalan dengan hasil yang diperoleh pada jumlah limfosit, dengan demikian pemberian *A. vera* mampu meningkatkan proliferasi limfosit meskipun tidak disertai dengan peningkatan berat limpa.

5.2.2. Produksi ROI Makrofag

Imunitas terhadap *Salmonella* melibatkan proses fagositosis oleh makrofag teraktivasi, di mana aktivasi terjadi melalui salah satu sitokin yang dihasilkan sel T. Sitokin yang dihasilkan oleh sel T ini yaitu IFN- γ yang merangsang dan mengaktifkan makrofag untuk memproduksi sitokin, metabolit asam *arachidonic* dan berbagai substansi pembunuh kuman, termasuk ROI, NO serta enzim lisosim yang disekresikan ke dalam fagosom.^{4, 5, 6, 18}

Makrofag teraktivasi mengubah oksigen menjadi *reactive oxygen intermediates (ROI)* yang merupakan agen pengoksidasi reaktif yang menghancurkan mikroba. Pada penelitian ini pemberian jus *A.vera* pada semua dosis mampu meningkatkan produksi ROI makrofag yang berbeda bermakna dengan kontrol. Berdasarkan penelitian t'Hart dkk (1990), senyawa yang terkandung pada *A. vera* dengan berat molekul (Mr) rendah mampu menghambat pelepasan *reactive oxygen spesies (ROS)* oleh PMN pada manusia yang distimulasi PMA tetapi efek menghambat ini merupakan hasil tak langsung dari berkurangnya penggunaan ion Ca bebas intraseluler, dimana senyawa dengan Mr rendah bersifat antagonis terhadap Ca-ionophore A23187.¹⁰⁴ Kemungkinan dosis jus *A. vera* yang diberikan pada penelitian ini mengandung senyawa dengan Mr rendah yang masih bisa ditolerir oleh makrofag sehingga belum mampu menghambat pembentukan ROI sehingga produksi ROI makrofag masih mampu ditingkatkan.

5.2.3. Hitung Kuman Organ Hepar

Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan bermakna pada penurunan jumlah kuman pada semua kelompok yang diberi *A. vera* dibanding dengan kelompok kontrol. Hal ini sebagai gambaran adanya interaksi antara komponen sistem imun dalam mengeliminasi *Salmonella* ditunjang oleh pemberian *A. vera* yang berfungsi sebagai imunomodulator.

Sistem imun natural mempunyai fungsi dasar mengidentifikasi dan membasmi mikroba penyusup dan penanda bagi sistem imun adaptif untuk hadir.¹⁷ Pelepasan mediator inflamasi menimbulkan infiltrasi dari berbagai tipe sel ke tempat infeksi dan memperkuat respon. Pengambilan dan penghancuran bakteri oleh sel fagosit juga memfasilitasi proteksi inang. Proses imun natural dilakukan oleh sel-sel yang relatif tidak terbatas pada patogen spesifik, meliputi sel NK, sel NKT, neutrofil dan makrofag. Neutrofil dan makrofag penting bagi survivalnya inang selama respon primer terhadap infeksi *Salmonella*, terutama dalam mengontrol replikasi bakteri tersebut.³²

Neutrofil, makrofag, sel NK dan sel TNK mampu memproduksi berbagai sitokin yang terlibat selama awal infeksi *Salmonella*. Studi eksperimental pada survival inang dari mencit dengan defisiensi genetik untuk sitokin spesifik atau reseptornya telah memperlihatkan bahwa TNF,^{33,34,35} IFN- γ ,^{35,36,37} IL-12³⁸ dan IL-18³⁹ penting pada awal respon primer terhadap *Salmonella*. IFN- γ diproduksi oleh limfoid dan sel myeloid selama awal infeksi. Sel NK yang aktif memproduksi sitokin seperti IFN- γ , TNF- α dan *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)*. Dengan memproduksi IFN- γ , sel NK dapat meningkatkan respon CMI dengan mengaktifasi makrofag dan mengarahkan diferensiasi sel Th ke

arah Th1. Sitokin yang dihasilkan sel NK juga memodulasi hematopoiesis dan meningkatkan produksi granulosit dan makrofag. Sel NK berfungsi sebagai jembatan antara sistem imun innate dan adaptif, beraksi sebagai dasar pertahanan seraya memproduksi sitokin untuk memicu perkembangan respon imun spesifik.⁴⁰

Subset sel T diperlukan untuk ekspresi penuh imunitas terhadap *S. typhimurium*. Pada infeksi *Salmonella* primer pada mencit model, pembersihan bakteri tersebut dari jaringan memerlukan sel-sel T CD4⁺ fungsional dan perkembangan imunitas sel T tipe Th1.⁵⁶ Fungsi sel T CD4⁺ ini juga membantu pembentukan sel T CD8⁺ spesifik *Salmonella* dan pengaturan pembentukan granuloma untuk membatasi penyebaran bakteri. Sel T CD8⁺ sitotoksik dapat melisis sel terinfeksi dan dapat memproduksi sitokin yang dibutuhkan untuk pengerahan dan aktivasi fagosit.⁵⁷

Dari meningkatnya respon proliferasi limfosit dapat menggambarkan awal dari perkembangan respon imun spesifik untuk mengatasi infeksi oleh bakteri tersebut. Begitu juga dari peningkatan produksi ROI makrofag dapat mendukung proses *killing* terhadap *Salmonella* tersebut. Dalam penelitian ini terbukti pemberian *A. vera* dapat menurunkan jumlah kuman di hepar.

Dari hasil penelitian diatas perlu diperiksa sitokin yang berperan dalam aktivasi sel-sel yang berperan dalam imunitas terhadap *Salmonella* yaitu IFN- γ dan IL-12. Karena kemampuan *Salmonella typhimurium* dalam menginvasi berbagai organ seperti hepar dan limpa, serta untuk mengetahui akibat pemberian *A. vera* pada ginjal maka perlu dilakukan pemeriksaan histopatologi pada organ-organ tersebut.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. KESIMPULAN

1. Meskipun tidak memberikan perbedaan bermakna pada berat limpa, pemberian jus *A. vera* dapat meningkatkan respon proliferasi limfosit :
 - a. Dengan meningkatnya dosis akan meningkatkan jumlah limfosit.
 - b. Dengan meningkatnya dosis akan meningkatkan jumlah relatif limfoblas.
2. Pemberian dosis jus *A. vera* terkecil (0,1 ml/hari) sudah mampu meningkatkan produksi ROI secara optimal.
3. Pemberian dosis jus *A. vera* terkecil (0,1 ml/hari) sudah mampu menurunkan hitung kuman secara optimal.

Jadi pemberian jus *A. vera* mampu meningkatkan respon proliferasi limfosit, respon produksi ROI makrofag dan mampu menurunkan hitung kuman organ hepar mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium*.

6.2. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lanjut untuk melengkapi konsep pemikiran penelitian ini yaitu :
 - a. Pemeriksaan sitokin-sitokin yang berperan dalam respon imun terhadap *S. typhimurium* terutama IL-12, TNF- α dan IFN- γ , karena IL-12 dan TNF- α berperan dalam menstimulasi sel-sel imun seperti sel NK dan sel T untuk memproduksi IFN- γ yang penting untuk mengaktivasi makrofag sehingga mampu meningkatkan proses *killing* terhadap bakteri tersebut.
 - b. Pemeriksaan histopatologi pada berbagai organ seperti hepar, limpa, dan intestin selain karena *Salmonella* mampu hidup dalam organ-organ tersebut juga dilihat efek *A. vera* terhadap organ-organ tersebut.
 - c. Dilakukan penelitian survival terhadap mencit yang diinfeksi *S. typhimurium* dan diberi jus *A. vera*.
2. Perlu dilakukan penelitian preklinik untuk mengetahui efek jus *A. vera* sebagai terapi pendamping untuk memodulasi sistem imun dalam mengatasi infeksi *S. typhimurium*.

BAB 7

RINGKASAN

Demam tifoid merupakan penyakit paling serius yang disebabkan oleh serovar *Salmonella*, terjadi di seluruh bagian dunia, diperkirakan 16,6 juta kasus terjadi per tahun di negara-negara berkembang termasuk di Indonesia. *S. typhimurium* merupakan agen yang bertanggung jawab terhadap salmonellosis pada mencit, penyakit yang analog dengan demam tifoid yang disebabkan oleh *S. typhi* pada manusia. Dalam menghadapi bakteri intraseluler ini, sistem imun terutama menanganinya dengan respon imun seluler (*cell mediated immunity/ CMI*). Makrofag merupakan eksekutor non-spesifik dan sel T merupakan mediator spesifik untuk menghancurkan mikroba intraseluler. Untuk melawan bakteri intraseluler yang mampu bertahan di dalam sel makrofag, diperlukan imunostimulan untuk meningkatkan kemampuan makrofag dalam mengeliminasi bakteri tersebut. Salah satu tanaman yang dapat berperan sebagai imunomodulator terutama sebagai imunostimulan yaitu *Aloe vera*.

Permasalahan dalam penelitian ini yaitu apakah pemberian jus *A. vera* mampu meningkatkan respon proliferasi limfosit, produksi ROI makrofag dan jumlah koloni kuman organ hepar pada mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium* bila dibandingkan dengan yang tidak diberi jus tersebut ?

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui respon proliferasi limfosit yang meliputi berat limpa, jumlah limfosit dan jumlah relatif limfoblas, respon produksi ROI makrofag dan jumlah koloni kuman pada kultur hepar pada kelompok mencit

Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium* dan diberi berbagai dosis jus *A. vera* dibandingkan dengan yang tidak diberi jus tersebut.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik murni dengan rancangan *The Post Test-Only Control Group* yang menggunakan hewan coba mencit betina Balb/c berusia 8-10 minggu, sehat, berat badan 20-30 gram.

Sebanyak 24 ekor mencit yang telah diadaptasikan selama 1 minggu dan diberi pakan standar serta minum secara *ad libitum*, dibagi secara acak menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu : kelompok kontrol (K) hanya mendapat diet standar selama 9 hari dan 3 kelompok perlakuan (P) yang diberi jus *A. vera* yaitu P1 (0,1 ml/hari), P2 (0,3 ml/hari) dan P3 (0,5 ml/hari) selama 9 hari peroral. Pada hari ke-6, mencit pada semua kelompok diinfeksi 10^5 CFU *S. typhimurium* intraperitoneal. Hari ke-10 mencit dibunuh dan dilakukan pemeriksaan respon proliferasi limfosit (berat limpa, jumlah limfosit dan jumlah relatif limfoblas), produksi ROI makrofag dan jumlah koloni kuman kultur organ hepar.

Data berat limpa dan jumlah relatif limfoblas dianalisis menggunakan *One way ANOVA* dilanjutkan dengan uji *Bonferroni*, sedangkan data jumlah limfosit, produksi ROI makrofag dan hitung koloni kuman organ hepar dianalisis dengan uji *Kruskal Wallis* dilanjutkan dengan uji beda *Mann-Whitney U*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian jus *A. vera* tidak dapat meningkatkan berat limpa ($p= 0,705$). Hal ini kemungkinan karena lamanya infeksi yang hanya 4 hari belum mencukupi untuk terjadinya pembesaran limpa. Kemungkinan lain disebabkan oleh efek anti-inflamasi dari *A. vera* sehingga pembesaran organ karena pengaruh inflamasi dapat ditekan. Pemberian jus *A. vera* dapat meningkatkan jumlah limfosit pada P2 dan P3 ($p= 0,004$) secara

bermakna, sedangkan pada P1 ($p= 0,337$) cenderung meningkat tetapi tidak berbeda bermakna dibanding kontrol. Hal ini kemungkinan disebabkan karena adanya rangsangan dari komponen *A. vera* yang bersifat mitogen terhadap limfosit yang mempunyai kemampuan mengikat dan merangsang banyak klon limfoid untuk proliferasi dan diferensiasi. Pemberian jus *A. vera* juga meningkatkan jumlah relatif limfoblas pada P2 ($p= 0,011$) dan P3 ($p= 0,002$) secara bermakna, sedang pada P1 ($p= 1,000$) meningkat tapi tidak berbeda bermakna. Berdasarkan jumlah relatif limfoblas yang tinggi maka diasumsikan jumlah limfositnya juga akan tinggi. Peningkatan jumlah limfosit dan jumlah relatif limfoblas dalam penelitian ini berhubungan dengan bertambahnya dosis jus *A. vera* yang diberikan. Produksi *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) makrofag meningkat secara bermakna dibanding kontrol pada semua kelompok yang di beri jus *A. vera* yaitu P1 ($p= 0,003$), P2 ($p= 0,004$) dan P3 ($p= 0,003$). Hitung kuman menurun secara bermakna pada semua kelompok yang diberi jus *A. vera* dibanding kontrol yaitu P1 ($p= 0,037$), P2 ($p= 0,004$) dan P3 ($p= 0,004$). Pada produksi ROI makrofag dan hitung kuman antar perlakuan jus *A. vera* tidak terdapat perbedaan bermakna jadi pada dosis terendah sudah bisa meningkatkan produksi ROI maupun menurunkan hitung kuman secara optimal dibanding dengan kontrol. Hal ini merupakan gambaran adanya interaksi antara komponen sistem imun dalam mengeliminasi *Salmonella* ditunjang oleh pemberian *A. vera* yang berfungsi sebagai imunomodulator. Dari meningkatnya respon proliferasi limfosit dapat menggambarkan awal dari perkembangan respon imun spesifik untuk mengatasi infeksi oleh bakteri tersebut. Begitu juga dari peningkatan produksi ROI makrofag, memperlihatkan salah satu

gambaran fagosit teraktivasi yang dapat mendukung proses *killing* terhadap *Salmonella* tersebut.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian jus *A. vera* dapat meningkatkan respon proliferasi limfosit dilihat dari peningkatan jumlah limfosit dan jumlah relatif limfoblas yang berhubungan dengan meningkatnya dosis tetapi tidak meningkatkan berat limpa, serta dapat meningkatkan produksi ROI makrofag dan menurunkan hitung kuman di hepar secara optimal pada dosis jus *A. vera* terendah (0,1 ml/hari).

DAFTAR PUSTAKA

1. Cammie FL, Samuel IM. Salmonellosis. In : Issebacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, editors. Harrison's principles of internal medicine. Thirteenth edition. New York : McGraw-Hill, 1999: 672-6.
2. Gao XM, Tite JP, Lipscombe M, Jones SR, Ferguson DJP, McMichael AJ. Recombinant *Salmonella typhimurium* strains that invade nonphagocytic cells are resistant to recognition by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Infect. Immun.* 1992; 60 (9): 3780-9.
3. Health's. Salmonellosis, salmonella infection and animal. URL. http://www.health.rg.gov/disease/communicable/salmon_animals.htm
4. Le TP, Hoffman SL. Typhoid fever. In : Guerrant RL, Walker DH, Weller PF. Tropical infectious diseases principles, pathogens & practice. New York: Churchill Livingstone, 1999: 277-95.
5. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. Fifth edition. Philadelphia; Saunders, 2003.275-97.
6. Kresno SB. Imunologi : Diagnosis dan prosedur laboratorium. Edisi 4. Jakarta; Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 2001.
7. Baratawidjaja KG. Imunologi dasar. Edisi 5. Jakarta; Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 2002.
8. Kagaya K, Miyakawa Y, Watanabe K, Fukazawa Y. Antigenic role of stress-induced catalase of *Salmonella typhimurium* in cell-mediated immunity. *Infect. Immun.* 1992; 60 (5): 1820-5.
9. Edwards CK, Ghiasuddin SM, Yungler LM, Lorence RM, Arkins S, Dantzer R, Kelley KW. In vivo administration of recombinant growth hormone or gamma interferon activates macrophages : Enhanced resistance to experimental *Salmonella typhimurium* infection is correlated with generation of reactive oxygen intermediates. 1992; 60 (6): 2514-21.
10. Kaufmann HE. Immune response to intracellular bacteria. In: Rich RR, Fleisher TA, Schwartz BD, Shearer WT, Strober W, editors. Clinical immunology principles and practice. St. Louis: Mosby, 1999: 503-17.
11. Reynolds T, Dweckb AC. *Aloe vera* leaf gel: a review update. *J Ethnopharmacol.* 1999; 68 (1-3): 3-37.
12. Saputra K, Maat S, Soedoko R. Terapi biologi untuk kanker. Surabaya: Airlangga University Press, 2000: 58-60.

13. Anonymous. *Aloe vera* components. URL: <http://www.1st-alo-vera.com/alo-vera-components.htm>
14. Kemper JK. *Aloe vera* clinical information summary. Longwood Herbal Task. 1999;2. URL: <http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>
15. Williams DE. Whole leaf *Aloe vera* a natural solution to drug-resistant bacteria, viruses & fungi. URL: <http://www.wholeleafaloe.com/aloevera/aloeverainfo/aloeverabacteria.html>
16. Anonymous. A comprehensive *Aloe vera* study. URL : <http://www.flp-aloevera.co.uk/Aloe%20Vera%20Study%201.html>
17. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunobiology the immune system in health and disease. Fifth edition. New York; Churchill Livingstone, 2001: 1-34
18. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. Sixth edition. Toronto; Mosby Elsevier Science Limited, 2001: 1-13.
19. Stites DP, Terr AI. Basic human immunology. First edition. USA; Appleton & Lange, 1991.
20. Lu L. Introduction to health and disease Blok : Non-specific defence mechanisms. MBBS 1st Yr. Lecture. 2002.
21. Krause KH. Professional phagocytes : predators and prey of microorganisms. Schweiz Med Wochenschr. 2000; 130: 97-100.
22. Lesser CF, Miller SI. Salmonellosis. Harrison's, 15 th edition CD-rom. McGraw-Hill, 2001. URL: <http://www.harrisononline.com>
23. Hawley LB. Intisari mikrobiologi dan penyakit infeksi. Penerjemah Pendit BU. Jakarta; Hipokrates, 2003: 71-7.
24. Suartha IN, Tulung YLR, Hetharie H, Mahatmi H, Masrikat JAN, Saerang JP, Batan IW. Telur sebagai imunoterapi penyakit menular. Makalah pengantar falsafah sains program pasca sarjana IPB, Bogor. 2003. URL: http://rudycr.tripod.com/pps702_71034/71034_14.htm
25. CDC Traveler's Health. Typhoid fever. 2004. URL: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/typhoidfever_g.htm
26. Jones BD, Falkow S. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. Annu Rev Immunol. 1996; 14: 533-61.
27. Zirk NM, Hashmi SF, Ziegler HK. The polysaccharide portion of lipopolysaccharide regulates antigen-specific T-cell activation via effects on macrophage-mediated antigen processing. Infect. Immun. 1999; 67 (1): 319-26.

28. Gahring LC, Heffron F, Finlay BB, Falkow S. Invasion and replication of *Salmonella typhimurium* in animal cells. *Infect. Immun.* 1990;58 (2): 443-8.
29. Buchmeier NA, Heffron F. Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 1991; 59 (7): 2232-8.
30. Chen LM, Kaniga K, Galan JE. *Salmonella spp.* are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol Microbiol.* 1996; 21 (5): 1101-15.
31. Conlan JW, North RJ. Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis* and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. *Infect. Immun.* 1992; 60 (12): 5164-71.
32. Kirby AC, Yrlid U, Wick MJ. The innate immune response differs in primary and secondary *Salmonella* infection. *J Immunol.* 2002; 169: 4450-59.
33. Mastroeni P, Villarreal-Ramos B, Hormaeche CE. Role of T cells, TNF alpha and IFN gamma in recall of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in mice vaccinated with live attenuated aro-A *Salmonella* vaccines. *Microb Pathog.* 1992; 13 (6): 477-91.
34. Tite JP, Dougan G, Chatfield SN. The involvement of tumor necrosis factor in immunity to *Salmonella* infection. *J Immunol.* 1991; 147 (9):3161-64.
35. Nauciel C, Espinasse-Maes F. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *Infect. Immun.* 1992; 60 (2): 450-4.
36. Kagaya K, Watanabe K, Fukazawa Y. Capacity of recombinant gamma interferon to activate macrophages for *Salmonella*-killing activity. *Infect. Immun.* 1989; 57 (2): 609-15.
37. Muotiala A, Makela PH. The role of IFN-gamma in murine *Salmonella typhimurium* infection. *Microb Pathog.* 1990; 8 (2): 135-41.
38. Mastroeni P, Harrison S, Robinson JH, Clare S, Khan S, Maskell DJ, Dougan G, Hormaeche CE. Interleukin-12 is required for control of the growth of attenuated aromatic-compound-dependent *Salmonellae* in BALB/c mice : Role of gamma interferon and macrophage activation. 1998;66 (7): 4767-76.
39. Mastroeni P, Clare S, Khan S, Harrison JA, Hormaeche CE, Okumura H, Kurimoto M, Dougan G. Interleukin 18 contributes to host resistance and gamma interferon production in mice infected with virulent *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 1999; 67 (2): 478-83.
40. Imboden JB. T lymphocytes and natural killer cells. In Stites DP, Terr AI, Parslow TG. *Medical immunology* 9th ed. USA; Appleton & Lange, 1997: 130-45.

41. Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. Murine macrophages secrete Interferon γ upon combined stimulation with Interleukin (IL)-12 and IL-18 : A Novel pathway of autocrine macrophage activation. *J. Exp. Med.* 1998; 187 (12): 2103-8.
42. Trinchieri G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ). *Curr Opin Immunol.* 1997; 9 (1):17-23.
43. Musso T, Calosso L, Zucca M, Millesimo M, Puliti M, Paus SB, Merlino C, Savoia D, Cavallo R, Ponzi AN, Badolato R. Interleukin-15 activates proinflammatory and antimicrobial functions in polymorphonuclear cells. *Infect. Immun.* 1998; 66 (6): 2640-47.
44. Waldmann TA, Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol.* 1999;17: 19-49.
45. Weng N, Liu K, Catalfano M, Li Y, Henkart PA. IL-15 is a growth factor and an activator of CD8 memory T cells. *Ann. N.Y.Acad.Sci.* 2002; 975: 46-56.
46. Edwards CK, Ghiasuddin SM, Yungler LM, Lorence RM, Arkins S, Dantzer R, Kelley KW. In vivo administration of recombinant growth hormone or gamma interferon activates macrophages : Enhanced resistance to experimental *Salmonella typhimurium* infection is correlated with generation of reactive oxygen intermediates. 1992; 60 (6): 2514-21.
47. Uesugi M, Hayashi T, Jasin HE. Covalent cross-linking of immune complexes by oxygen radicals and nitrite. *J. Immunol.* 1998; 161: 1422-27.
48. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome : Oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. *Blood.* 1998; 92 (9): 3007-17.
49. Fang FC. Mechanism of Nitric Oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest.* 1997; 99 (12): 2818-25.
50. Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *PNAS.* 2000; 97 (16) : 8841- 48.
51. Francis KP, Gallagher MP. Light emission from a *Mudlux* transcriptional fusion in *Salmonella typhimurium* is stimulated by hydrogen peroxide and by interaction with the mouse macrophage cell line J774.2. *Infect. Immun.* 1993; 61 (2): 640-9.
52. Taylor PD, Inchley CJ, Gallagher MP. The *Salmonella typhimurium* ahpC polypeptide is not essential for virulence in BALB/c mice but is recognized as an antigen during infection. *Infect Immun.* 1998; 66 (7): 3208-17.

53. Buchmeier NA, Lipps CJ, So MY, Heffron F. Recombination-deficient mutants of *Salmonella typhimurium* are avirulent and sensitive to the oxidative burst of macrophages. *Mol Microbiol.* 1993; 7 (6): 933-6.
54. Michetti P, Mahan MJ, Slauch JM, Mekalanos JJ, Neutra MR. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. 1992; 60 (5): 1786-92.
55. Mittrucker HW, Raupach B, Kohler A, Kaufmann SHE. Role of B lymphocytes in protective immunity against *Salmonella typhimurium* infection. *J Immunol.* 2000; 164: 1648-52.
56. Mastroeni P, Simmons C, Fowler R, Hormaeche CE, Dougan G. Igh-6^{-/-} (B-cell-deficient) mice fail to mount solid acquired resistance to oral challenge with virulent *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and show impaired Th1 T-cell responses to *Salmonella* antigens. *Infect. Immun.* 2000; 68 (1): 46-53.
57. Mittrucker HW, Kohler A, Kaufmann HE. Characterization of the murine T-lymphocyte response to *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* infection. *Infect. Immun.* 2002; 70 (1): 199-203.
58. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12: 635-73.
59. Mastroeni P, Villareal-Ramos B, Hormaeche CE. Adoptive transfer of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in innately susceptible BALB/c mice requires both immune serum and T cells. *Infect. Immun.* 1993; 61 (9): 3981-84.
60. Mittrucker HW, Kohler A, Mak TW, Kaufmann SHE. Critical role of CD28 in protective immunity against *Salmonella typhimurium*. *J Immunol.* 1999; 163: 6769-76.
61. Yrlid U, Svensson M, Hakansson A, Chambers BJ, LjunggrenHG, Wick MJ. In vivo activation of dendritic cells and T cells during *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* infection. *Infect. Immun.* 2001; 69 (9): 5726-35.
62. Keuter M. Experimental studies on pathogenesis of *Salmonella* infection. Thesis. Katholiek Universiteit Nijmegen, 1998.
63. Haughton C. *Aloe vera* (L). 2003. URL: <http://www.purplesage.org.uk/profiles/aloevera.htm>
64. Atherton P. *Aloe vera* Myth or medicine?. URL: <http://www.1st-aloe-vera.com/aloe-vera-mythormedicine.htm>
65. Anonymous. *Aloe vera* –in stock. URL: <http://www.kcweb.com/herb/aloevera.htm>

66. Anonimous. About *Aloe vera*. URL: <http://www.absoluteslimming.com/about-aloevera.htm>
67. Alternative Health Therapies. Aloe. 1998. URL: <http://alternative-health.cde.com/specialt.htm>
68. Anonimous. *Aloe vera*-God's Gift to mankind. 1996. URL: <http://www.webspawner.com/users/aloevera/>
69. Anonimous. The principles of *Aloe vera* gel. URL: <http://www.absoluteslimming.com/about-aloevera-2.htm>
70. Hedendal BE. Whole-Leaf *Aloe vera*, almost a panacea. URL: <http://www.wholeleafaloe.com/aloevera/aloeverainfo/wholeleafaloevera.html>
71. Foster S. *Aloe vera*: The succulent with skin-soothing, cell-protecting properties. URL: <http://www.healthy.net/asp/templates/articles.asp?PageType=Article&ID=358>
72. Kemper KJ. *Aloe vera* clinical information summary. Longwood Herbal Task Force. 1999; 2. URL: <http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>
73. Klein AD, Penneys NS. *Aloe vera*. J Am Acad Dermatol. 1988; 18: 714-20.
74. Kablon JB. In vitro evaluation of the synergistic antiviral effect of acetylmannans in combination with azidothymidine and acyclovir. Mol. Biother. 1991;3 (1): 214-23.
75. McDaniel HR. CD4 dan CD8 lymphocyte levels in acetylmannans (ACM)-treated HIV-1 infected longer term survivor. Int. Conf. AIDS. 1993; 9 (1): 438.
76. McDaniel HR. An increase in circulating monocyte/macrophages (MM) is induced by oral acetylmannans (ACE-M) in HIV-1 patients. Am. J. Clin. Pathol. 1990;94: 519-17.
77. Ghannam N. The antidiabetic activity of aloes: Preliminary clinical and experimental observation. Hormone Res. 1986;24: 288-94.
78. Vasquez B, Avila G, Segura D, Escalante. Anti-inflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. J. Ethnopharmacol. 1996; 55 (1): 69-75.
79. Tizard I. Research reveals aloe's effect on inflammation. 1996. URL: <http://www.iasc.org/tizard.html>
80. Anonimous. The importance of harvesting and manufacturing premier *Aloe vera*. URL: http://altcanter.silvermedicine.org/docs/aloevera_harvesting.doc

81. Fogleman RW, Shellenberger TE, Balmer MF, Carpenter RH, McAnalley BH. Subchronic oral administration of acemannan in the rat and dog. *Vet. Hum. Toxicol.* 1992; 34 (2): 144-7.
82. Davis RH. Polysaccharide in *Aloe vera* the magic bullet. 2000. URL: <http://wholeleaf.com>
83. Pittman JC. Immune enhancing effects of whole leaf *Aloe vera*. URL: <http://www.wholeleafaloe.com/aloevera/aloeverainfo/aloeveraimmuneenhancingeffects.html>
84. Zhang L, Tizard IR. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: The major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel. *Immunopharmacology.* 1996; 35 (2): 119-28.
85. Danhof IE. Internal uses of *Aloe vera*. URL: <http://www.wholeleafaloe.com/aloevera/aloeverainfo/aloeverainterluse.html>
86. Lee JK, Lee MK, Yun YP, Kim Y, Kim JS, Kim YS, Kim K, Han SS, Lee CK. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *Int Immunopharmacol.* 2001; 1 (7): 1275-84.
87. Setiawan B. Rancangan percobaan. Dalam : Tjokronegoro A, Sudarsono S. *Metodologi Penelitian Bidang Kedokteran*, cetakan ke tiga. Jakarta : Balai Penerbit FKUI, 1999:39-57.
88. Sastroasmoro S. Pemilihan subyek penelitian. Dalam : Sastroasmoro S, Ismael S (eds). *Metodologi penelitian klinis*. Jakarta: Binarupa Aksara, 1995: 42-51.
89. Sugiarto, Siagian D, Sunaryanto LT, Oetomo DS. *Teknik sampling*. Jakarta : PT. Gramedia Pustaka Utama, 2001 : 46-61.
90. Hanafiah KA. Rancangan percobaan. *Teori & aplikasi*. Jakarta: Penerbit CV. Rajawali, 1991:1-8.
91. Tavec. Normal dosages for animals. 2001. URL: <http://www.natural-living.co.uk/howtouse/howtouse.html>
92. Laurence DR, Bacharach AL. Petunjuk praktikum toksikologi. Dalam: Donatus IA, Suhardjono D, Nurlaila, Sugiyanto, Hakim L, Wahyono D, Mulyono. Yogyakarta: Fakultas Farmasi UGM, 1992.
93. Mishell BB, Shiigi MS. *Selected methods in cellular immunology*. Freeman and Company. New York; 1980.
94. Supargiyono. Mononuclear phagocyte system (MPs). Makalah pada : *Kuliah defisiensi biologi molekuler dan immunologi*. Yogyakarta : Tim Pengelola Program Doktor FK UGM, 2000: 1-9.

95. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. Diagnostic microbiology, 9th eds. St Louis : Mosby-Year book. Inc. 1990: 284-95.
96. Sukmaningtyas H. Pengaruh pemberian L-arginin terhadap respon imunitas seluler mencit Balb/c yang diinokulasi *Salmonella typhimurium*. Tesis. Semarang . Magister Ilmu Biomedik Undip. 2003; 46.
97. Santoso S. SPSS Versi 10. Mengolah data statistik secara profesional. Jakarta : PT. Elex Media Komputindo, 2001; 261-84, 422-30.
98. Dawson B, Trapp RG. Basic & clinical biostatistics. Third edition. Boston : McGraw-Hill Higher Education. 2001 : 211-32.
99. Bellanti JA. Immunologi III. Penerjemah Wahab AS. Yogyakarta. Gajah Mada University Press. 1993.
100. Gasem MH. Thyphoid fever clinical and epidemiological studies in Indonesia. Semarang. Diponegoro University Press. 2001 : 6.
101. Davis RH, Maro NP. *Aloe vera* and gibberellin, anti-inflammatory activity in diabetes. J Am Podiatr Med Assoc. 1989 ; 79 (1) : 24-6.
102. Imanishi K. Aloactin A, an active substance of *Aloe arborescen* Miller as an imunomodulator. Phytother Res. 1993 ; 7 (special issue) : S20-S22. 15 ref.
103. Koike T, Beppu H, Kuzuya H, Maruta K, Shimpo K, Suzuki M, Titani K, Fujita K. A 35 kDa mannose-binding lectin with hemagglutinating & mitogenik activities from "Kidachi Aloe" (*Aloe arborescens* Miller Var Natalensis Berger). J Biochem. 1995 ; 118 (6) : 1205-10.
104. t'Hart LA, Nibbering PH, van der Barselaar MT, van Dijk H, van den Berg AJ, Labadie RP. Effects of low molecular constituents from *Aloe vera* gel on oxidative metabolism & cytotoxic & bactericidal activities of human neutrophils. Int J Immunopharmacol. 1990 ; 12 (4) : 427-34.