

**PENGARUH PEMBERIAN PHALERIA
MACROCARPA TERHADAP JUMLAH LIMFOSIT
DARAH TEPI DAN INDEKS APOPTOSIS LIEN
(STUDI PADA TIKUS SPRAGUE-DAWLEY YANG TERPAPAR
LIPOPOLISAKARIDA *E coli*)**

***THE EFFECT OF PHALERIA MACROCARPA ON
PERIPHERAL LYMPHOCYT COUNT
AND SPLEEN APOPTOTIC INDEX.
(STUDY ON SPRAGUE-DAWLEY RATS TO LIPOPOLYSACHARIDE
E coli)***



Tesis
untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Sarjana
S2 dan memperoleh keahlian dalam bidang Ilmu Bedah

Abdul Haris Malik

**PROGRAM PASCA SARJANA
MAGISTER ILMU BIOMEDIK
DAN
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I
ILMU BEDAH
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2007**

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi atau lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Nopember 2007

Penulis

RIWAYAT HIDUP SINGKAT

A. IDENTITAS

Nama : dr. Abdul Haris Malik
NIM Magister Biomedik : G4A002001
NIM PPDS I Bedah : G3A002001
Tempat / Tgl lahir : Jepara, 16 Agustus 1972
Agama : Islam
Jenis kelamin : Laki-laki

B. Riwayat Pendidikan

1. SD Negeri 4 Jepara Jawa Tengah : Lulus tahun 1985
2. MTs N Walisongo Jepara Jawa Tengah : Lulus tahun 1988
3. SMA Negeri 2 Jepara Jawa Tengah : Lulus tahun 1991
4. FK UNISSULA Semarang Jawa Tengah : Lulus tahun 1997
5. PPDS I Bedah FK UNDIP Semarang Jawa Tengah
6. Magister Ilmu Biomedik Pasca Sarjana UNDIP Semarang Jawa Tengah

KATA PENGANTAR

Puji syukur dipanjatkan kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan anugerahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul Pengaruh Pemberian Phaleria Macrocarpa terhadap Jumlah Limfosit Darah Tepi dan Indeks Apoptosis Lien (Studi Pada Tikus Sprague-Dawley yang Terpapar Endotoksin Lipopolisakarida).

Penelitian ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar derajat sarjana S2 Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana dan Program Pendidikan Dokter Spesialis I Bedah Universitas Diponegoro Semarang.

Penulis menyadari tugas ini tidak dapat terselesaikan dengan baik tanpa dukungan dari berbagai pihak. Kepada Prof. DR. dr. H.A.Faik Heyder, Sp.B, Sp.BTV dan Prof. dr. Edi Dharmana, MSc, PhD, Sp.ParK sebagai dosen pembimbing, yang selalu memberikan dukungan moral yang tak ternilai harganya, penulis mengucapkan terima kasih atas bimbingan, sumbangan pikiran, serta kesabarannya dalam proses penyelesaian tesis ini.

Dalam kesempatan ini penulis juga menghaturkan terima kasih kepada :

1. dr. Soejoto, SpKK(K), Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
2. Prof. dr. H. Soebowo, SpPA(K), Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang.

3. Prof. Dr. dr. Tjahjono, SpPA(K)FIAC, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran UNDIP / RS dr. Kariadi Semarang.
4. dr. Djoko Handojo, SpB, SpBOnk, Ketua Bagian Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP dr. Kariadi Semarang.
5. dr. Sidharta Darsojono, SpB, SpU, Ketua Program Studi PPDS I Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
6. Prof. DR.dr. Irwan Abdullah. Direktur Sekolah Pasca Sarjana FK UGM.
7. Tim penguji dan nara sumber yang telah dengan sabar berkenan memberi masukan, arahan dalam penelitian dan penulisan tesis ini.
8. dr. Najatullah, SpBP, yang telah memberikan dukungan moril yang sangat berarti.
9. dr. Selamat Budijitno, Msi.Med, SpB, yang memberikan waktu untuk memberikan inspirasi dan konsultasi.
10. Semua rekan sejawat Residen Ilmu Bedah FK UNDIP, pegawai laboratorium pusat studi pangan dan gizi Pasca Sarjana FK UGM Yogyakarta, dan semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu per satu.
11. Ucapan terima kasih khusus kepada kedua orang tua dan mertua saya yang telah memberikan dukungan moril dan materiil untuk keberhasilan studi saya.
12. Tesis ini kupersembahkan untuk istriku tercinta Wiwik Nugrawati, dan anak-anakku Ami, Ajin, dan Aik.

Penulis menyadari bahwa penelitian ini masih jauh dari sempurna. Kritik dan saran demi kesempurnaan penelitian ini akan diterima dengan senang hati. Penulis berharap penelitian ini dapat berguna bagi masyarakat serta memberi sumbangan bagi perkembangan ilmu kedokteran.

Semarang, Nopember 2007

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
BAB 1 Pendahuluan	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.5 Orisinalitas	5

BAB 2	Tinjauan Pustaka	7
2.1	Sepsis	7
2.1.1	Definisi	7
2.1.2	Patogenesis	10
2.1.3	Peran respon imun	12
2.1.4	Apoptosis limfosit	13
2.1.5	Peran biologik TNF, Interleukin-2.....	15
2.2	Anatomi, histologi, dan histofisiologi lien.....	16
2.3	Histofisiologi lien	19
2.4	Phaleria macrocarpa	19
BAB 3	Kerangka Teori, Kerangka Konsep dan Hipotesis	22
3.1	Kerangka Teori	22
3.2	Kerangka Konsep	23
3.3	Hipotesis Penelitian	23
BAB 4	Metode Penelitian	24
4.1	Rancangan Penelitian	24
4.2	Waktu dan Lokasi Penelitian	25
4.3	Sampel Penelitian	25
4.4	Variabel Penelitian	25
4.4.1.	Variabel Bebas	25
4.4.2.	Variabel Tergantung	25
4.4.3.	Definisi Operasional	26

4.5 Bahan dan Alat Penelitian	27
4.5.1 Bahan untuk perlakuan	27
4.5.2 Bahan untuk pemeriksaan limfosit	28
4.5.3 Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin	28
4.5.4 Alat untuk penyuntikan lps E coli.	29
4.5.5 Alat untuk pemeriksaan limfosit	29
4.5.6 Alat untuk pembuatan sediaan penelitian dengan pewarnaan H&E	29
4.6 Pelaksanaan penelitian	30
4.7 Alur Kerja	32
4.8 Analisis Data	33
BAB 5. Hasil	34
BAB 6. Pembahasan	42
BAB 7. Simpulan dan Saran	47
Daftar Pustaka	48
Daftar Lampiran	52

GAMBAR

	Halaman
Gambar-1. Diagram etiologi SIRS	9
Gambar-2. Jalur apoptosis melalui reseptor FAS	15
Gambar-3. Alur kerja	32
Gambar-4. Diagram skematik alur kerja dan hasil	36
Gambar-5. Diagram skematik CONSORT	39
Gambar-6. Sel yang mengalami apoptosis	41

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel-1. Hasil eksplorasi data	36
Tabel-2. Hasil uji ANOVA	38
Tabel-3. Hasil Levene's test	38
Tabel-4. Post Hoc Test	40

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran – lampiran	52
1. Ethical clearance.....	
2. PSPG.....	
3. Gambar Spyghmomanometer Kent tail.....	
4. Surat keterangan penelitian.....	

ABSTRAK

PENGARUH PEMBERIAN PHALERIA MACROCARPA TERHADAP JUMLAH LIMFOSIT DARAH TEPI DAN INDEKS APOPTOSIS LIEN (STUDI PADA TIKUS SPRAGUE-DAWLEY YANG TERPAPAR LIPOPOLISAKARIDA E coli)

Latar belakang : *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) diakibatkan paparan Lipopolisakarida (Lps) E coli yang mengakibatkan sekresi berlebih Tumor Necrosis Factor (TNF- α) sehingga terjadi apoptosis limfosit. *Phaleria macrocarpa* memiliki kandungan polyphenol dapat menurunkan TNF dan Interferon- γ (IFN- γ). Tujuan penelitian ini membuktikan pengaruh *Phaleria macrocarpa* terhadap jumlah limfosit darah tepi dan indeks apoptosis lien.

Metoda : Delapanbelas tikus Sprague-Dawley dengan desain *randomized post test only control group design*, dibagi 3 kelompok, kelompok 1 kontrol, kelompok 2: terpapar Lps E coli, kelompok 3: terpapar Lps E coli + *Phaleria macrocarpa* 0,0715 mg /hari (0,36 ml). Diberikan 3 hari, diperiksa *diff count* limfosit darah tepi serta indeks apoptosis lien. Analisa statistik jumlah limfosit darah tepi dan indeks apoptosis lien menggunakan ANOVA dilanjutkan dengan Bonferroni test.

Hasil : Jumlah limfosit darah tepi pada uji *One-way ANOVA* didapat perbedaan bermakna ($p < 0,001$) antara kelompok K (70,33 \pm 3,14), P1 (36,17 \pm 7,83), P2 (65,33 \pm 3,56) dan indeks apoptosis lien, terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,001$) antara Kelompok K (4,5 \pm 1,05), P1 (16,33 \pm 1,21), P2 (6,00 \pm 0,89). *Bonferroni test* jumlah limfosit darah tepi kelompok 1 dan 2 berbeda bermakna ($p < 0,001$), kelompok 2 dan 3 berbeda bermakna ($p < 0,001$), sedangkan kelompok 1 dan 3 tidak berbeda bermakna ($p = 0,367$). Indeks apoptosis lien kelompok 1 dan 2 berbeda bermakna ($p < 0,001$), kelompok 2 dan 3 berbeda bermakna ($p < 0,001$). Kelompok 1 dan 3 tidak berbeda bermakna ($p = 0,081$).

Simpulan : Terdapat perbedaan jumlah limfosit darah perifer dan indeks apoptosis lien pada tikus yang terpapar Lps E coli dan terpapar Lps E coli serta diberikan ekstrak *phaleria macrocarpa*.

Kata kunci : *Phaleria macrocarpa*, indeks apoptosis, limfositopenia, SIRS

ABSTRACT

THE INDUCE OF PHALERIA MACROCARPA TO PERIPHERAL LYMPHOCYT COUNT AND SPLEEN APOPTOTIC INDEX.

(STUDY ON SPRAGUE-DAWLEY MOUSE WHICH ARE EXPOSED
LIPOPOLYSACCHARIDE E coli)

Background: *Lipopolysaccharide* (lps) E coli exposure induce *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) which can cause over secretion of Tumor Necrosis Factor (TNF), finally cause lymphocyte apoptotic. Phaleria macrocarpa contains active polyphenols which restrict TNF and Interferon release. This study want to prove the induce of Phaleria macrocarpa to peripheral lymphocyt count and spleen apoptotic index.

Material and method: *Randomized post test only control group design* on 18 Sprague-Dawley mice into 3 treatment groups. Group 1 control, group 2 exposed by lps E coli, group 3 exposed by lps E coli and 0,0715 mg Phaleria macrocarpa/day. All group treated for 3 days. *A one way ANOVA* test is used as statistically analysis to peripheral lymphocyt count and spleen apoptotic index. *Bonferroni* test is used to analyze the difference between two groups.

Result: There is a significant difference ($p < 0,001$) on peripheral lymphocyt count K (70,33±3,14), P1 (36,17±7,83), P2 (65,33±3,56), and spleen apoptotic index K (4,5±1,05), P1 (16,33±1,21), P2 (6,00±0,89). The result of *Bonferroni* test on peripheral lymphocyt count is significant between group 1 and 2 ($p < 0,001$), significant between group 2 and 3 ($p = 0,001$), there is no significant between group 1 and 3 ($p = 0,367$). Spleen apoptotic index analysis result is statistically significant between group 1 and 2 ($p < 0,001$) significant between group 2 and 3 ($p < 0,001$), there is no significant between group 1 and 3 ($p = 0,081$)

Conclusion: There are significant different mice exposed by lps E coli and lps E coli with Phaleria macrocarpa on peripheral lymphocyte count and spleen apoptotic index.

Key words : Phaleria macrocarpa, apoptotic index, lymphocytopenia, SIRS

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sepsis dan *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) merupakan 10 besar penyebab utama kematian pada pasien dengan penyakit kritis di Amerika Serikat (AS).¹ Sepsis berkembang sebanyak 750.000 orang per tahun dan lebih dari 210.000 darinya akan meninggal.^{1,2}

Prevalensi SIRS meningkat dalam 15 th terakhir dan insidennya mencapai 300.000-400.000 kasus per tahun. Peningkatan insiden terjadi pada populasi usia lanjut, penyakit kronis, penderita AIDS. Sedangkan risiko sepsis meningkat pada penggunaan kateter, peralatan medis invasif, antibiotika tanpa indikasi yang tepat, pemberian glukokortikoid, pemakaian ventilasi mekanis dan luka bakar. Morbiditas dan mortalitas dari SIRS dan sepsis tetap tinggi walaupun upaya suportif dan terapi antimikroba telah dilakukan. Mortalitas bervariasi dari 40% untuk sepsis tanpa komplikasi sampai 80% pada sepsis dengan syok dan *Multiple Organ Dysfunction Syndrome* (MODS).^{2,3}

Teori kematian pada sepsis diakibatkan oleh paparan lps bakteri gram negatif seperti E coli terhadap sistem imun, yang berdasarkan penelitian pada hewan, dengan diberikannya dosis besar lps E coli dimana akan terjadi peningkatan sitokin seperti *Tumor Necrotizing Factor- α* (TNF α) dalam sirkulasi.¹ Pada keadaan sepsis akan terjadi mekanisme apoptosis yang merupakan kematian sel yang terprogram, peningkatan apoptosis berperan

dalam proses terjadinya sepsis. Telah dilakukan eksperimen pada hewan percobaan dan dilaporkan bahwa beberapa sel target : timus, lien, *patches peyer's*, hepar, ginjal, paru, usus dan otot rangka akan mengalami proses apoptosis. Diantara sel target tersebut limfosit terlihat menjadi sel target pre dominan terjadinya apoptosis selama berlangsungnya sepsis. Ini diakibatkan oleh menurunnya jumlah limfosit (limfositopenia) pada pulpa putih di lien.¹⁻¹¹

Pada keadaan sepsis limfosit mengalami aktivasi terutama oleh *Interleukin-2* (IL-2) yang berperan sebagai aktivator dan stimulator, tetapi pada konsentrasi berlebih justru akan berperan sebagai *feed back* regulator terhadap sel limfosit T dengan meningkatkan *T-Cell Reseptor* (TCR) yang mengaktifkan *Ligand death* [TNF α dan *Fas-Ligand (FasL)*] dan peningkatan *granzym*, sehingga limfosit yang mengalami aktivasi lebih mudah mengalami apoptosis dibandingkan limfosit dalam keadaan istirahat.¹² Apoptosis ini dapat diukur dengan suatu indeks yang dinamakan Indeks Apoptosis dengan metode Aihara.¹³

Peneliti di Jepang – yang meneliti efek kandungan polyphenol pada salah satu tanaman obat mengemukakan bahwa poliphenol akan menurunkan pelepasan TNF- α dan *Interferon- γ* (IFN- γ) oleh sel T-Helper (TH). Polyphenol dalam tanaman obat dilaporkan mempunyai kemampuan untuk menghambat aktivasi *Nuclear Factor Kappa B* (NF- κ B), suatu *transcription factor* yang berperan penting dalam regulasi molekul pembentukan sitokin. Pada penelitian yang dilakukan Tomita M dkk dari Ohio AS, dilaporkan

bahwa sifat immunosupresif polyphenol terhadap TH1 CD4 adalah hambatan dalam ekspresi gen IL-2 dan IFN- γ .^{14,15}

Phaleria macrocarpa (mahkota dewa) merupakan salah satu tanaman obat tradisional Indonesia yang masih belum memiliki acuan informasi yang lengkap baik dari segi farmakologi maupun fitokimia. Suatu penelitian awal terhadap ekstrak daging dan kulit biji *phaleria macrocarpa* menunjukkan adanya kandungan zat aktif berupa alkaloid, terpenoid, saponin, dan senyawa polyphenol. Pengujian terhadap kadar toksisitas ekstrak tanaman juga telah dilakukan terhadap larva udang *Artemia Salina* Leach setelah diinkubasi selama 24 jam.^{16,17}

Tanaman ini diharapkan akan mempunyai efek mengurangi reaksi inflamasi tubuh dengan penurunan ekspresi gen TNF- α dan IFN- γ oleh sel T-helper. Penurunan TNF- α diharapkan akan menurunkan apoptosis limfosit pada sepsis. Belum ditemukan studi *invivo* yang membuktikan efek ekstrak *Phaleria macrocarpa* pada respon imunologis terutama pada limfositopenia pada sepsis.

1.2 Perumusan masalah

Dengan latar belakang masalah di atas, rumusan masalah yang dapat diambil pada penelitian ini yaitu :

- Apakah akan terjadi perbedaan jumlah limfosit darah perifer pada tikus yang terpapar lps *E coli* dengan tikus yang terpapar lps *E coli* tetapi mendapat suplemen ekstrak *phaleria macrocarpa* ?

- Apakah akan terjadi perbedaan indeks apoptosis limfosit lien pada tikus yang terpapar lps E coli dengan tikus yang terpapar lps E coli tetapi mendapat suplemen ekstrak *phaleria macrocarpa* ?

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan umum :

Membuktikan pengaruh pemberian *phaleria macrocarpa* terhadap jumlah limfosit darah tepi dan indeks apoptosis lien

1.3.2 Tujuan khusus :

- Menganalisis perbedaan jumlah limfosit darah perifer pada tikus yang terpapar lps E coli dengan tikus yang terpapar lps E coli tetapi mendapat suplemen ekstrak *phaleria macrocarpa*
- Menganalisis perbedaan indeks apoptosis limfosit lien pada tikus yang terpapar lps E coli dengan tikus yang terpapar lps E coli tetapi mendapat suplemen ekstrak *phaleria macrocarpa*.

1.4 Manfaat penelitian

- a. Penelitian ini diharapkan dapat menambah khasanah ilmu pada sepsis yang disertai penurunan jumlah limfosit
- b. Bila diketahui *phaleria macrocarpa* mempunyai efek mengurangi limfositopenia, maka tanaman obat ini diharapkan dapat dijadikan *adjuvant* pada terapi sepsis.
- c. Penelitian ini diharapkan juga dapat dijadikan landasan penelitian selanjutnya.

1.5 Orisinalitas

Penulis	Judul / penerbit	Hasil
Weaver JG, Rouse MS, Steckelberg JM, Badley AD.	Improved survival in experimental sepsis with an orally administered inhibitor of apoptosis. <i>J Faseb</i> 2004;18:1185-90	<i>Protease Inhibitor</i> (PI) untuk mencegah apoptosis limfosit pada sepsis akibat paparan lps. Hasil yang didapatkan survival hewan coba pada 12 jam setelah paparan lps masih 100%, dan bahwa PI menurunkan apoptosis limfosit secara bermakna.
Mirochnitchenko O, Prokopenko O, Palnitkar U, Kister I, Powel WS, Inouye M.	Endotoxemia in transgenic mice overexpressing human glutathione peroxidases. <i>J Circ. Res</i> 2000;87:289-95.	<i>Glutathione Peroksidase</i> (GP) pada endotoksemia akibat paparan lps akan mengurangi permeabilitas vaskuler, produksi sitokin TNF dan <i>Nitric Oxide</i> (NO), efek asam arakhidonat, serta menghambat migrasi leukosit secara bermakna.
Copeland S, Warren HS, Lowrey SF, Calvano SE, Remick D.	Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. <i>J Clinical and Laboratory Immunology</i> 2005;12(1):60-7.	Respon fisiologis endotoksin pada manusia lebih cepat. Tetapi baik pada tikus maupun manusia mengalami limfositopenia pada 2-4 jam setelah terpapar lps
Lauw FN, Simpson AJ, Hack CE, Prins JM, Wolbink AM, Sander JH et al.	Soluble granzymes are released during human endotoxemia and in patients with severe infection due to gram-negative bacteria. <i>JID</i> 2000;182:206-13.	Granzym merupakan protein serin esterase yang dapat memicu apoptosis. Pemberian paparan lps akan meningkatkan kadar <i>granzyme</i> plasma, dan puncak kadar <i>granzym</i> terjadi pada jam ke-2 setelah paparan.
Gary W. Varilek, Fajun Yang, Eun Y. Lee et al.	Green Tea Polyphenol Extract Attenuates Inflammation in Interleukin-2-Deficient Mice, a Model of Autoimmunity. <i>Journal of Nutrition</i> . 2001;131 : 2034-9	Poliphenol pada tanaman obat akan menurunkan pelepasan TNF- α dan <i>Interferon-γ</i> (IFN- γ) oleh sel T-helper dan menghambat aktivasi <i>Nuclear Factor Kappa B</i> (NF- κ B), suatu <i>transcription factor</i> untuk pembentukan sitokin.
Tomita M, Irwin KI, Xie ZJ, Santoro TJ.	Tea Pigments Inhibit the Production of type 1 (T(H1)) and Type 2 (T(H2)) helper T cell cytokines in CD4(+) T Cells. Medical College of Ohio, Glendale avenue. Toledo; 2002 ; 16(1) : 36-42.	<i>Polyphenol</i> mempunyai sifat immunosupresif terhadap <i>T helper 1</i> (Th1) CD4 dalam hambatan ekspresi gen IL-2 dan IFN- γ .

Banyak penelitian tentang efek endotoksemia yang menyebabkan limfositopenia, tetapi peneliti – peneliti tersebut belum melakukan penelitian efek polifenol herbal medisn terutama *phaleria macrocarpa* yang berefek terhadap limfositopenia pada sepsis.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sepsis

2.1.1 Definisi

Sepsis adalah sindroma klinik yang dikarakteristikan dengan takipneu (*respiratory rate* >20x/mt) dengan PaCO₂ < 32 torr (4,3 Kpa), takikardia (Heart rate > 100x/mt), hipertermi / hipotermi (suhu rektal tubuh >101°F/38³ °C atau <96° F/35⁶ °C), leukositosis (>12.000/mm³), leukopeni (<4000/mm³) dengan atau tanpa adanya bakteri di dalam darah.^{1-11,22-23} Antara SIRS dan sepsis dapat diartikan berbeda sebab SIRS adalah spesifik untuk reaksi inflamasi tanpa adanya suatu infeksi. Sedangkan sepsis pada dasarnya adalah hasil produksi bakteri yang berupa toksin baik endotoksin maupun eksotoksin yang berperan sebagai super antigen, virus, parasit, kerusakan jaringan (faktor eksternal). Dengan faktor hospes yang disebut respon imun yang meliputi faktor pertahanan humoral dan seluler. Respon hospes terhadap sepsis bersifat sistemik sehingga disebut SIRS.²⁴

Untuk mencegah timbulnya kerancuan, perlu disepakati standarisasi terminologi. Pada tahun 1991 telah terjadi konsensus pada *American College*

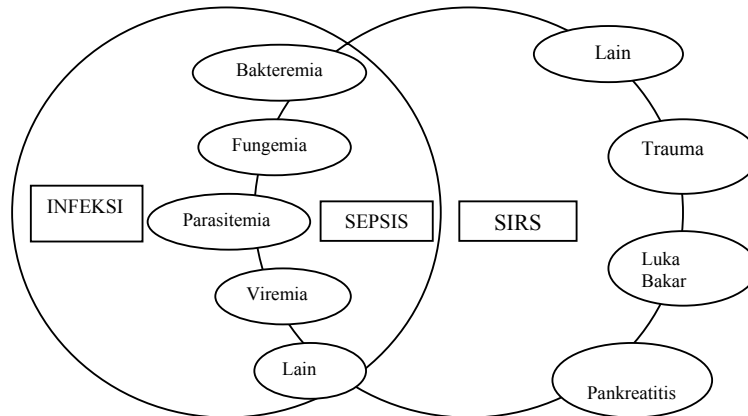
of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine memberikan kesepakatan pada beberapa pengertian : .

- a. Infeksi : respon inflamasi oleh adanya mikroorganisme yang secara normal pada jaringan tersebut yang seharusnya steril.
- b. Bakteremia : adanya bakteri hidup dalam darah.
- c. SIRS : merupakan inflamasi masif sebagai akibat dilepasnya berbagai mediator secara sistemik dan dapat mengakibatkan terjadinya disfungsi organ ganda yang dikenal sebagai *Multiple Organ Dysfunction (MOD)* dan gambaran klinisnya MODS. Manifestasi klinis dari SIRS jika terdapat 2 atau lebih tanda tersebut di bawah:
 - Suhu^o > 38 °C atau < 36 °C
 - Nadi > 90 x/mt
 - Frekuensi Napas > 20 x/mt atau P_aCO₂ < 32 torr (< 4,3 kpa)
 - Hitung lekosit > 12.000 sel /mm³ atau ditemukan > 10% sel imatur.
- d. Sepsis : SIRS yang disebabkan oleh infeksi
- e. Sepsis berat : Sepsis yang disertai dengan disfungsi organ, yaitu : kelainan hipoperfusi atau hipotensi. Hipoperfusi ini tidak hanya meliputi timbulnya asidosis laktat, oliguria atau perubahan akut status mental.
- f. Syok septik : Sepsis dengan hipotensi walaupun sudah dilakukan resusitasi cairan yang adekuat tetapi masih didapatkan gangguan perfusi jaringan atau sepanjang penderita menunjukkan perfusi yang abnormal.

- g. Hipotensi : Tekanan sistolik <90 mmHg atau terjadi penurunan >40 mmHg dari keadaan sebelumnya tanpa disertai penyebab dari penurunan tekanan darah yang lain.
- h. MODS : Adanya perubahan dari sistem organ pada penderita sakit akut, homeostatis tidak dapat dipertahankan tanpa melakukan intervensi.²³

Pada sepsis berat, reaksi inflamasi sistemik berlangsung lebih hebat dan diikuti MODS dengan manifestasi klinik berupa gagal ginjal akut (GGA), *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS), *Disseminated Intravascular Coagulation* (DIC) dan syok, manifestasi MODS berupa :

- Paru : penurunan awal PaO₂, ARDS, kebocoran kapiler pada alveoli, takipneu, hiperpneu.
- Ginjal : terjadi GGA, oliguria, anuria, azotemia, proteinuria.
- Lien : peningkatan keadaan serum bilirubin, fosfatase alkali, ikterus kolestatik.
- Gastrointestinal : neausea, muntah, diare, ileus.
- Kulit : ecthyma gangrenosum, petechia, erythroderma generalisata.
- Jantung : penurunan kontraksi miokard, takikardi.
- Otak : gelisah, bingung.
- Darah : diastesis, trombosis diikuti diastesis hemoragik.²⁵



Gambar-1. Diagram etiologi sepsis / SIRS

2.1.2 Patogenesis

Rangkaian reaksi imunologi menghasilkan respon sepsis, dapat disebabkan oleh kerusakan jaringan, iskemia *reperfusion injury*, organisme gram + / gram -, fungi dan kuman-kuman endotoksin. Respon sepsis dapat dominan dari fokus infeksi yang kemudian masuk ke dalam aliran darah.⁹⁻

11,26-8

Pada dasarnya reaksi tubuh terhadap stimulus merupakan bagian dari sistem pertahanan tubuh yang bertujuan untuk mencapai keadaan homeostatis akibat keseimbangan yang terjadi karena stimulus tersebut diatas. Reaksi tubuh terhadap stimulus baik yang ringan maupun yang berat kita kenal sebagai proses inflamasi. Stimulus yang ringan akan mengundang reaksi lokal pada tempat dimana trauma atau infeksi mengenai bagian tubuh yang bersangkutan, sedangkan stimulus yang berat, akan mengundang reaksi yang hebat berupa reaksi sistemik.

Jika stimulus yang terjadi secara berulang-ulang, reaksi inflamasi yang semula bertujuan untuk mencapai keadaan homeostatis, justru akan menimbulkan keadaan yang merugikan khususnya pada berbagai organ yakni menimbulkan gangguan fungsi organ yang bersangkutan dan gambaran kliniknya kita kenal sebagai MODS. Respon tubuh terhadap trauma atau infeksi diawali dengan dikeluarkan sitokin dari lingkungan lokal yang salah satu fungsinya membantu proses penyembuhan, juga sejumlah kecil akan dilepaskan ke dalam sirkulasi sehingga merangsang sistem imunitas tubuh.^{6,8}

Sitokin merupakan substansi yang dikeluarkan oleh sel imunokompeten setelah mendapat stimulasi dari toksin. Secara keseluruhan kerja sitokin adalah mempengaruhi aktivasi, pembelahan, apoptosis atau gerakan sel berdasarkan sifat autokrin (mempengaruhi diri sendiri), parakrin (mempengaruhi sel didekatnya), endokrin (mempengaruhi sel-sel di tempat yang jauh).²⁶⁻⁸

Sitokin yang diproduksi oleh lekosit dan mempengaruhi kerja lekosit yang lain disebut *Interleukin* (IL), sitokin yang bersifat mempengaruhi gerak sel imun (kemotaksis) disebut *chemoattractan*, sitokin yang merangsang differensiasi dan proliferasi sel asal (stem sel) disebut *Colony Stimulating Factor* (CSF) dan sitokin yang mempengaruhi replikasi virus disebut *interferron* (IFN).²⁶⁻³⁰

Sitokin akan meneruskan sinyal kepada sel imunokompeten yang lain sampai dengan limfosit B untuk menghasilkan antibodi yang akan menetralkan toksin tersebut.

Dalam keadaan normal sitokin berfungsi untuk menetralkan toksin yang masuk ke dalam tubuh berperan sebagai parakrin efek, tetapi bila reaksi yang terjadi berlebihan akan menyebabkan stress pada sel imunokompeten sehingga terjadi reaksi berlebihan dari respon imun (menyebabkan kelelahan) selanjutnya berperan sebagai endokrin efek dan sistemik, sehingga menyebabkan kerusakan dalam tubuh. Berdasarkan hal tersebut diatas maka sepsis lebih diartikan sebagai suatu respon inflamasi imunologis. Sesuai pendapat yang mengatakan bahwa sepsis adalah reaksi tubuh yang berlebihan (hiperaktivitas). Reaksi inflamasi dari tubuh akan mengekspresikan mediator inflamasi yang disebut respon imun.²⁶⁻³⁰

2.1.3 Peran respon Imun

Sepsis terjadi oleh karena adanya interaksi antar antigen dengan sistem imun dari hospes yang disebut respon imun meliputi faktor pertahanan humoral dan seluler. Respon host terhadap sepsis bersifat sistemik sehingga disebut SIRS.

Pada SIRS dikenal mediator pro inflamasi yaitu $TNF\alpha$, IL-2, IL-6, IL-8, mediator anti inflamasi yaitu : IL-4, IL-10, IL-1.²⁶⁻³⁰ Pada proses inflamasi apabila mediator pro inflamasi lebih dominan maka SIRS menjadi lebih berat dan cenderung menjadi syok septik. Apabila mediator anti inflamasi lebih dominan efeknya dari mediator pro inflamasi maka akan

terkompensasi dan terjadi keadaan yang disebut *Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome (CARS)*.^{23,25,26,30} Pada keadaan CARS dari hasil penelitian ternyata dapat menyebabkan reaksi imunologis yang menyebabkan perubahan dinding pada pembuluh darah sehingga terjadi syok. Apabila efek mediator pro inflamasi dan mediator anti inflamasi seimbang maka tubuh terjadi suatu keadaan homeostatis yang disebut *Mixed Antagonistic Response Syndrome (MARS)*. Yaitu membuat kondisi tubuh dalam keadaan homeostatis.²⁴

Sepsis dijabarkan sebagai suatu proses autodestruksi yang menyebabkan respon patofisiologi yang normal terhadap infeksi, yang melibatkan jaringan yang sebelumnya normal dan menghasilkan MODS. Kematian sel yang terjadi pada sepsis akibat nekrosis dan apoptosis. Selama proses apoptosis sel akan mengalami bunuh diri secara seluler non nekrotik yang berbeda dengan nekrosis yang tidak diakibatkan oleh hasil dari proses inflamasi dan kerusakan pada jaringan.^{12,26,31}

2.1.4 Apoptosis limfosit

Apoptosis adalah suatu kematian sel yang terprogram atau *programmed cell death*. Sekali terjadi aktivasi akan menyebabkan reaksi *enzymatik intraseluler*. Enzym, protein, dan DNA akan terurai, dan tidak ada komponen intraseluler yang terdispersi ke ekstraseluler. Sel yang mengalami apoptosis akan mengeluarkan signal ke ekstraseluler berupa phospholipid pada membran sel nya yang dapat dikenali oleh sel-sel imun, terutama makrofag.

Ada banyak stimulasi yang dapat menginduksi apoptosis. Stimulasi utama adalah ligand TNF pada FAS (TNF-R1) reseptor, ultraviolet/radiasi, panas, *osmotic imbalance*, dan *Nitric Oxide* (NO). Menurut jenis triger dan tipe selnya, ada banyak jalur signal untuk mengaktifasi apoptosis. Yang akan kami sebutkan disini adalah apoptosis yang diinduksi oleh ligand TNF pada FAS reseptor.

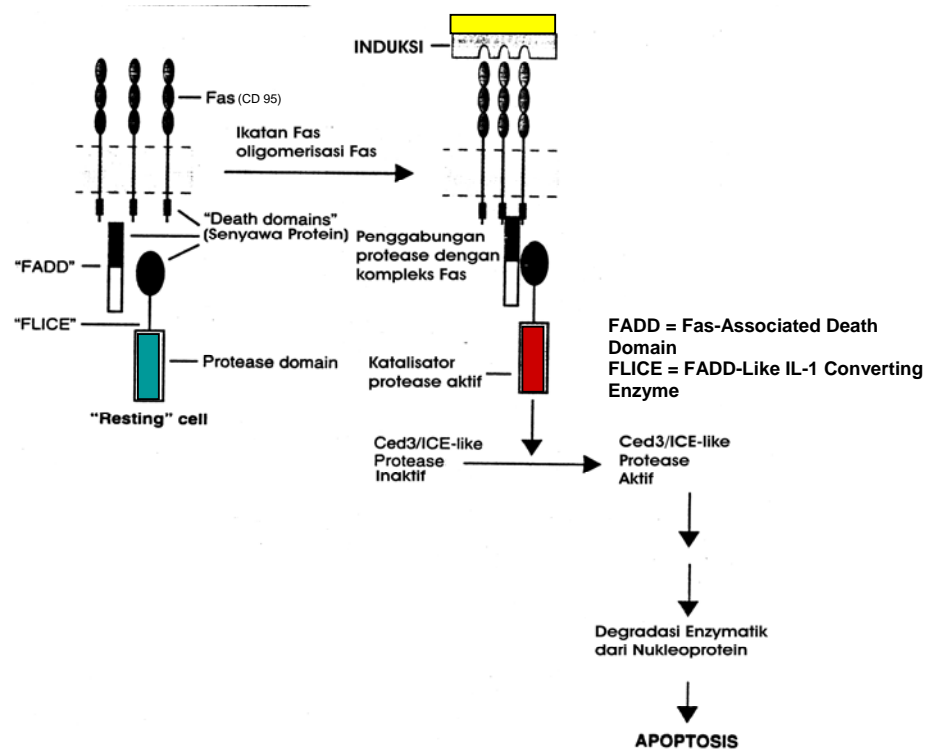
Pada SIRS terjadi peningkatan $TNF\alpha$, FasL, dan Glukokorticoide, peningkatan tersebut akan mengakibatkan meningkatnya apoptosis sel. Peningkatan sitokin-sitokin ini akan menginduksi sel menjadi apoptosis. Pada sel-sel limfosit juga akan mengalami apoptosis, hal ini terjadi karena adanya sitokin-sitokin ligan penyebab apoptosis (death cytokin), seperti FasL, dan $TNF-\alpha$. Pada sepsis, limfosit mengalami aktivasi terutama oleh IL-2, di mana limfosit yang sudah teraktifasi ini lebih mudah mengalami induksi apoptosis dibandingkan limfosit dalam keadaan istirahat (*resting cell*).

Peran IL-2 pada limfosit adalah sebagai stimulator proliferasi dan juga sebagai aktifator, tetapi pada konsentrasi yang berlebih, justru akan berperan sebagai *feedback regulator* sel limfosit-T, yaitu dengan meningkatnya *TCR-engaged* sel limfosit-T terhadap *death ligand*.^{26-9,31}

Pada populasi sel limfosit T CD8 aktivasi induksi apoptosis lebih banyak dilakukan oleh FasL melalui reseptor TNF-R1, dan pada populasi limfosit T CD4 aktivasi induksi apoptosis lebih banyak dilakukan oleh Fas (CD95) dan FasL.⁹ Di mana akan terjadi aktivasi kaspase inaktif menjadi kaspase aktif.^{24-7,31}

Kerusakan DNA dipicu oleh enzim caspase aktif, di mana caspase ini merupakan suatu molekul protein 10 dan 20 kD berupa *protease cysteine*. Saat ini sudah dikenal \pm 12 jenis caspase. Protein target dari caspase ini adalah protein *DNA repair system* [seperti *(ADP-ribose)-polymerase*], protein struktural/sitoskeletal (seperti *lamin, actin, cytokeratin, dll*), dan onkoprotein (terutama Rb protein). Yang terakhir diketahui, caspase juga akan mengaktifkan *DNase* yang menyebabkan kerusakan DNA selama apoptosis.

26-9,31,32



Gambar-2. Jalur apoptosis melalui reseptor FAS.

2.1.5 Peran biologik TNF dan Interleukin-2

TNF- α merupakan *nonglycosylated transmembran protein* dengan berat molekul 25 kD, dalam sirkulasi dalam bentuk homotrimer stabil dengan berat molekul 51 kD. Dalam kinerjanya dikaitkan dengan induksi apoptosis sel melalui reseptor TNF pada permukaan sel.

IL-2 merupakan glikoprotein dengan berat molekul berkisar antara 14 hingga 17 kD. Glikoprotein ini dikode oleh gen tunggal yang terletak pada kromosom nomor 4. Sitokin ini terutama dihasilkan oleh sel CD4⁺ bila teraktivasi oleh antigen, sedikit dihasilkan oleh sel CD8⁺. Fungsi utama IL-2 adalah mempengaruhi sel CD4⁺ dan CD8⁺ yang memproduksinya (autokrin) atau pada sel tetangganya (parakrin).

Efek yang ditimbulkan oleh IL-2 adalah memacu perkembangan sel T dari fase G1 ke fase sintesa, merangsang tahap sintesa IL-2 selanjutnya oleh sel T dalam waktu 24 jam setelah teraktivasi akan merangsang pembentukan sitokin lain yaitu IFN- γ dan limfotoksin, juga meningkatkan sintesa p55 yaitu reseptor IL-2 sendiri, meningkatkan pertumbuhan dan fungsi sitolitik sel *Natural Killer* (sel-NK) dan *Cytotoxic T-Lymphocyt* (CTL).

Pada limfosit, IL-2 berperan sebagai aktifator dan stimulator, tetapi pada konsentrasi berlebih justru akan berperan sebagai *feed back* regulator terhadap sel limfosit-T dengan meningkatkan TCR yang mengaktifkan *Ligand death* (TNF α dan FasL), sehingga limfosit yang mengalami aktivasi

lebih mudah mengalami apoptosis dibandingkan limfosit dalam keadaan istirahat.²⁶⁻⁹

2.2 Anatomi, histologi, dan histofisiologi lien

Anatomi lien

Lien terletak pada regio hypochondriaca sinistra, dalam cavum abdomen antara fundus ventriculi dan diaphragma. Lien mempunyai dua facies yaitu facies diaphragmatica dan fascies visceralis, dua kutub yaitu extremitas superior dan extremitas inferior, dan dua margo yaitu margo anterior (crenatus) dan margo posterior.

Histologi lien

Lien merupakan kumpulan jaringan limfoid terbesar dalam organisme.¹ Karena banyak mengandung sel fagositik maka lien merupakan alat pertahanan penting terhadap mikroorganisme yang masuk sirkulasi. Selain itu lien merupakan satu-satunya organ yang mempunyai kemampuan menyaring darah, sehingga lien memiliki fungsi sistem imun dan sistem hematopoetik.³³

Fungsi dalam sistem imun antara lain sebagai tempat produksi limfosit, produksi antibodi, dan pemindahan antigen dari darah. Sedangkan fungsi sistem hematopoetik yaitu pembentukan sel darah fetus, destruksi eritrosit dan platelet yang sudah tua, rusak, dan abnormal dalam sinus venosus pulpa merah, serta sebagai tempat penyimpanan eritrosit (*reservoir*) yang elastis dan

terkendali yang mampu mengeluarkan sel darah ke dalam sirkulasi serta menyesuaikan volume sirkulasi.³³

Lien berwarna merah keunguan karena banyak menyimpan darah, lunak, dan mudah ruptur. Lien dibungkus oleh sebuah simpai jaringan ikat padat yang menjulurkan trabekula yang membagi parenkim atau pulpa lien menjadi kompartemen-kompartemen.³⁴ Lien juga mengandung banyak limfosit dan kaya akan suplai makrofag yang memonitor darah. Strukturnya terdiri atas serat, sel *reticular meshwork*, serta kapsul fibrosa dan trabekula yang mengandung myofibroblast, yang bersifat kontraktile.³³

Parenkim lien terdiri atas :

a. Pulpa Merah

Pulpa merah terdiri atas bangunan memanjang yaitu *korda Bilioth* yang terdapat diantara sinusoid. Pulpa merah mengandung sel plasma, makrofag, trombosit, granulosit, dan limfosit. Trombosit dan eritrosit tua, rusak, atau abnormal dihancurkan (*hemocatheresis*). Eritrosit dihancurkan oleh sel fagositik dan besi yang berasal dari hemoglobin disimpan dalam sel. Besi akan dikeluarkan bila diperlukan untuk pembentukan hemoglobin baru.³⁴

b. Pulpa Putih

Pulpa putih tersusun atas jaringan limfoid yang menyelubungi arteri sentralis yang disebut *periarteriole lymphoid sheath (PALS)* dan nodulus limfatikus yang ditambahkan pada selubung.^{33,34} Sel limfosit

T ditemukan disekitar arteri sentralis, sedang sel limfosit B terdapat pada nodulus limfatikus. ³⁴ Bila terdapat benda asing dalam darah maka akan merangsang limfosit T dan limfosit B untuk menghasilkan zat anti. ³³

Daerah perbatasan pulpa merah dan pulpa putih disebut Zona Marginalis yang terdiri atas banyak sinus dan jaringan ikat longgar. ³⁴

2.3 Histofisiologi lien

a) Pembentukan Limfosit

Pulpa putih lien membentuk limfosit yang bermigrasi ke pulpa merah dan mencapai lumen sinusoid. ³⁴

b) Destruksi Eritrosit

Makrofag dari korda Billoth mencerna eritrosit. Hemoglobin dirombak menjadi protein, globin, dan heme. Protein dan globin dihidrolisis menjadi asam amino yang digunakan lagi untuk sintesis protein. Besi dibebaskan dari heme dan diangkut melalui darah, bergabung dengan transferin, ke sumsum tulang untuk dipakai lagi dalam eritropoesis. Heme bebas besi dimetabolisme menjadi bilirubin yang dikeluarkan dalam empedu. ³⁴

c) Pertahanan Organisme

Sel fagositik lien paling aktif dalam memfagosit partikel hidup (bakteri dan virus) yang lambat ditemukan dalam perjalanan sel tersebut ke dalam darah.³⁴

2.4 *Phaleria macrocarpa*

Phaleria macrocarpa merupakan *nomenclature binomial* dari mahkota dewa dan termasuk dalam familia Thymelaeaceae. Umurnya dapat mencapai puluhan tahun dengan masa produktif 10-20 tahun. Tanaman ini dapat dijumpai tumbuh liar di daerah hutan pada ketinggian 10-1200 meter di atas permukaan laut dengan curah hujan sekitar 1000-2500 mm/tahun.

Phaleria macrocarpa merupakan tumbuhan perdu dan dapat mencapai ketinggian 1-1,5 meter. Daunnya termasuk daun tunggal yang saling berhadapan, warna hijau, dengan panjang 7-10 cm dan lebar 3-5mm. Bunga berwarna putih, tergolong bunga majemuk tersusun dalam kelompok 2-4 bunga. Buah terdiri dari kulit, daging, cangkang, dan biji. Ketebalan kulit buah 0,5-1,0 mm, tebal daging bervariasi. Cangkang berwarna putih dengan ketebalan mencapai 2 mm. Biji berbentuk lonjong dengan garis tengah 1 cm. Akar termasuk akar tunggang, batang bentuk bulat.^{16,17}

Ekstrak terhadap daging buah dan kulit biji *phaleria macrocarpa* menunjukkan adanya zat aktif polyphenol, alkaloid, terpenoid, dan saponin. Pengujian terhadap toksisitas ekstrak tanaman dilakukan dengan melihat tingkat mortalitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach setelah diinkubasi selama 24 jam. Hasilnya toksisitas sangat tinggi, dengan nilai konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% larva udang (LC50) berkisar antara 0,1615 –

11,8351 $\mu\text{g/ml}$ (semakin kecil nilai LC50, semakin toksik tanaman tersebut dan semakin berpotensi untuk memiliki aktifitas biologi / efek farmakologi), dengan batas aktifitas biologi tanaman adalah $\text{LC50} < 1000 \mu\text{g/ml}$.^{16,17}

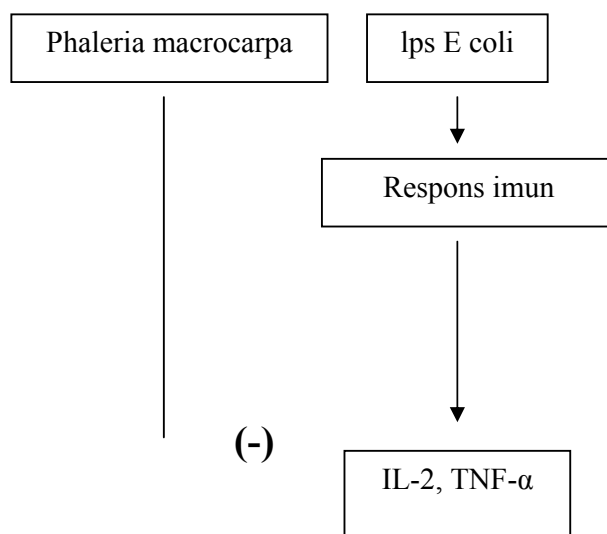
Polyphenol dalam Tanaman obat dilaporkan mempunyai kemampuan untuk menghambat aktivasi NF- κ B, suatu *transcription factor* yang berperan penting dalam regulasi molekul pembentukan sitokin.^{24,29} Pada penelitian yang dilakukan Tomita M dkk dari Ohio USA, dilaporkan bahwa sifat immunosupresif polyphenol terhadap TH1 CD4 adalah hambatan dalam ekspresi gen IL-2 dan IFN- γ .^{14,15}

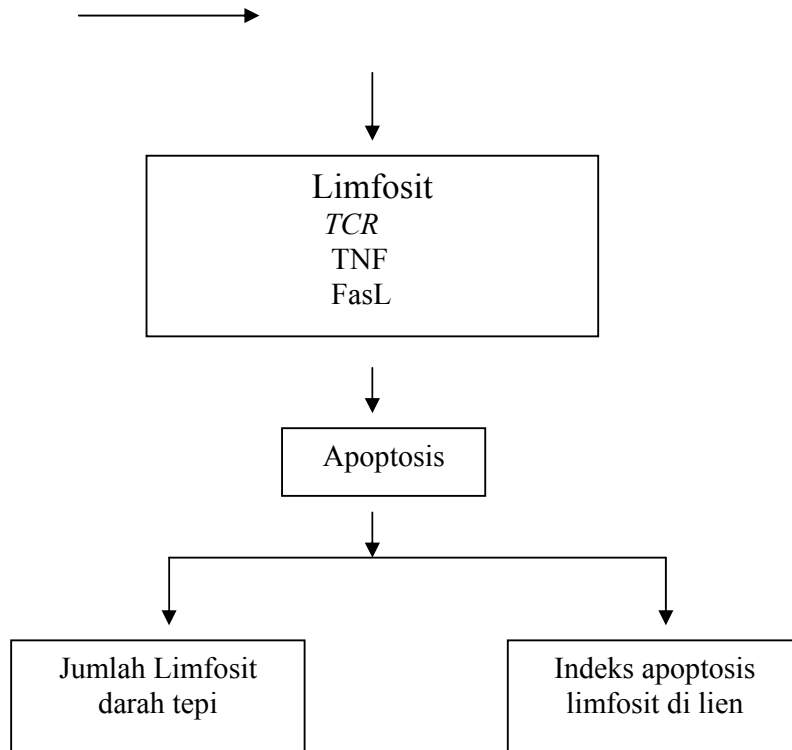
Penelitian lain di Jepang, yang meneliti efek kandungan *polyphenol* dalam tanaman obat (*tea polyphenols*) dikemukakan bahwa *polyphenol* akan menurunkan pelepasan TNF- α dan IFN- γ oleh sel *T-helper*.^{11,12} TNF- α ini mempunyai peran penting dalam apoptosis sel.^{14,15}

BAB 3

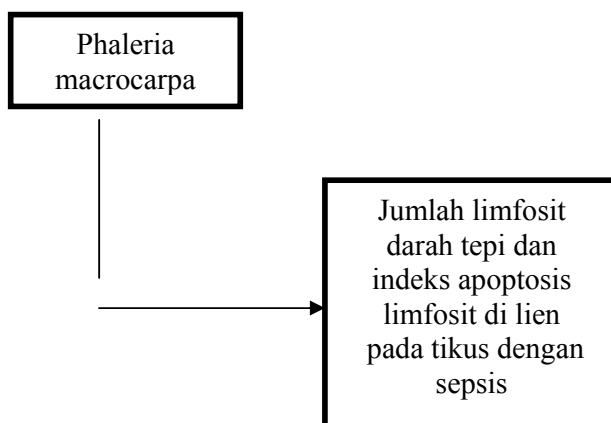
KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka teori





3.2 Kerangka Konsep



3.3 Hipotesis Penelitian

- Terjadi penurunan jumlah limfosit darah tepi pada tikus yang terpapar lps E coli dengan tikus yang terpapar lps E coli tetapi mendapat suplemen ekstrak *phaleria macrocarpa*.
- Terjadi kenaikan indeks apoptosis limfosit lien pada tikus yang terpapar lps E coli dengan tikus yang terpapar lps E coli tetapi mendapat suplemen ekstrak *phaleria macrocarpa*.

BAB 4

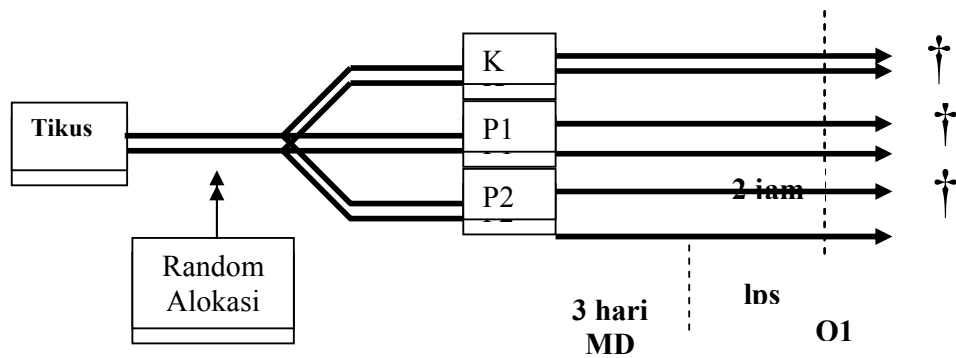
METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain "*Post test only control group design*". Kelompok penelitian dibagi menjadi 3 yaitu kelompok kontrol (K), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2). Adapun pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

- K : Kelompok kontrol, tikus yang tidak diberikan lps E coli 10^5 /cc sebanyak 2 cc.
- P1 : Kelompok perlakuan 1, tikus yang diberikan lps E coli 10^5 /cc sebanyak 2 cc intraperitoneal.
- P2 : Kelompok perlakuan 2, tikus yang diberikan lps E coli 10^5 /cc sebanyak 2 cc intraperitoneal dan mendapat *phaleria macrocarpa* 0,0715 mg /hari (0,36 mL /hari) selama 3 hari.

Skema penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:



O1 = pengamatan terhadap hitung limfosit darah tepi dan Indeks apoptosis lien.

4.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 18 hari. Perlakuan pada tikus Sprague-Dawley dan proses pengambilan jaringan dilakukan di Laboratorium uji hewan coba Universitas Gajah Mada / RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta.

4.3 Sampel Penelitian

Hewan coba adalah tikus Sprague-Dawley berusia 2 - 2,5 bulan dengan berat badan 200-350 gram dan tidak ada abnormalitas anatomis. Dilakukan aklimatisasi selama 1 minggu.³⁵⁻³⁶ Tikus ini diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Sebelum perlakuan tidak didapatkan tikus yang sakit. Besar sampel menurut WHO tiap kelompok minimal 5 ekor, dengan cadangan 1 ekor.³⁷ Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok 6 ekor tikus. Dari 18 tikus yang memenuhi kriteria, dilakukan random alokasi menjadi 3 kelompok perlakuan, yaitu :

Kelompok K : 6 tikus

Kelompok P1 : 6 tikus

Kelompok P2 : 6 tikus

4.4 Variabel Penelitian

4.4 Variabel bebas

Sebagai variabel bebas adalah pemberian ekstrak *phaleria macrocarpa*.

4.4.2 Variabel tergantung

Sebagai variabel tergantung adalah :

Jumlah limfosit darah tepi.

Indeks apoptosis limfosit di lien.

4.4.3 Definisi operasional

1. Kelompok kontrol (K) adalah tikus yang tidak mendapat perlakuan.
2. Kelompok perlakuan 1 (P1) adalah tikus yang diberikan lps E coli 10^5 /cc sebanyak 2 cc intraperitoneal.
3. Kelompok perlakuan 2 (P2) adalah tikus yang diberikan lps E coli 10^5 /cc sebanyak 2cc intraperitoneal dan mendapat *phaleria macrocarpa* 0,0715mg / hari (0,36 mL / hari) selama 3 hari.
4. lps E coli atau endotoksin adalah suatu komponen membran luar dari bakteri gram negatif E coli. Cara pemberiannya dengan menyuntikkan 10^5 kuman/cc sebanyak 2 cc intraperitoneal.³⁸
5. Sepsis pada tikus adalah suatu keadaan di mana terdapat 2 atau lebih dari keadaan sebagai berikut : terjadi peningkatan heart rate > 20%, peningkatan frekuensi napas > 20%, dan penurunan tensi > 20%. Pengukuran menggunakan alat sphyghnornanometer *Kent tail blood pressure system*.¹⁹
6. Ekstrak *phaleria macrocarpa* adalah ekstrak yang berasal dari daging buah kering, yang diekstraksi dengan pelarut etanol dengan menggunakan metoda sokletasi, dengan konsentrasi larutan hasil ekstrak 0,2mg/mL, diberikan dengan dosis 0,0715 mg/hari.^{16,17,40}

Skala variabel : rasio

7. Hitung limfosit darah tepi dilakukan dengan cara *diff count* dengan cara setetes darah dari sample darah tepi diletakan pada sisi kanan obyek glass selanjutnya dorong dengan speader ke arah kiri dengan sudut 45°, keringkan kemudian fiksasi dengan methanol 90% selama 10 menit lalu cuci dengan air mengalir, selanjutnya dilakukan pengecatan giemsa. Di periksa dengan pembesaran 40x dengan gambaran : Rasio sitoplasma : inti lebih kecil, inti tunggal besar, sitoplasma biru tak bergranula, inti bulat kromatin rata dan menyebar.³⁹

Skala variabel : interval

8. Indeks apoptosis dihitung sesuai dengan metoda yang digunakan oleh Aihara M et al, di mana sel yang mengalami apoptosis dihitung per 100 sel limfosit dengan pembesaran 400x, pada 10 lapangan pandang dari tiap preparat jaringan lien yang dicat dengan Hematoxyline-Eosin (HE), dalam satu blok parafin. Kemudian diambil rata-rata hasilnya. Lapangan pandang dimulai dari kiri ke kanan, kemudian ke bawah dimulai dari kiri lagi. Bila ada daerah nekrosis dihindari.¹³

Skala variabel : interval.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan untuk perlakuan

Hewan coba adalah tikus Sprague-Dawley dengan umur 2-2,5 bulan, dan berat 200 - 350 gram. *Phaleria macrocarpa* yang digunakan adalah ekstrak *phaleria macrocarpa*, diperoleh dengan cara :

- 1 kg daging buah *phaleria macrocarpa* yang telah dikeringkan ditumbuk halus, kemudian serbuk dimasukkan ke dalam alat soklet (kapasitas 50g) dan dilakukan ekstraksi dengan cara sokletasi menggunakan pelarut etanol dengan siklus 8 – 10 kali.
- Hasil ekstrak dimasukkan dalam labu rotary evaporator dan dilakukan destilasi vakum hingga menjadi pekat (suhu 40°C).
- Ekstrak dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C selama 1 jam untuk menguapkan etanol.
- Didapatkan hasil 5,5mg ekstrak pada setiap 1 kg bahan (0,55%), dan hasil ekstrak diencerkan dengan aquabidest sampai tercapai konsentrasi 0,2mg/mL .

Dosis yang digunakan adalah disetarakan dengan dosis yang telah digunakan pada manusia yaitu dari serbuk daging buah 5 gram 1 x sehari dikalikan konstanta uji terapi pada hewan coba (tikus) yaitu 0,0026 dikalikan konstanta hasil ekstrak 0,0055, sehingga dosis yang diberikan adalah $5000 \times 0,0026 \times 0,0055 = 0,0715$ mg/hari (0,36 mL).^{16,17,40}

4.5.2 Bahan untuk pemeriksaan limfosit

1. Darah vena
2. Larutan Giemsa
3. Larutan buffer dengan pH 6,4
4. Metanol

4.5.3 Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin

- a. Phospat buffer formalin 10%
- b. Alkohol 70%, 80%, 96%, absolute
- c. Xylol
- d. Parafin cair (Histoplast)
- e. Albumin dan Poly-L-Lysine
- f. Bahan pengecatan Hematoksilin-Eosin (HE)
- g. Canada balsam dan Entelan

4.5.4 *Alat untuk penyuntikan lps E coli.*

1. Kapas Alkohol 70%
2. Spuit 3 ml

4.5.5 *Alat untuk pemeriksaan limfosit*

1. Pipa hematokrit
2. Object glass
3. Kaca penutup (deck glass)
4. Mikroskop cahaya

4.5.6 *Alat untuk pembuatan sediaan penelitian dengan pewarnaan H&E*

- a. *Digital Tissue Processor Leica^R*
- b. *Tissue Blocking Leica^R EG-1160*
- c. Inkubator suhu 56⁰ C *Memmert^R*
- d. Mikrotom *Leica^R RM-2135*
- e. *Auto Stainer Leica-XL^R*
- f. Kaca obyek dan kaca penutup

4.6 Pelaksanaan Penelitian

Cara perlakuan

Delapan belas ekor Tikus Sprague-Dawley diadaptasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standar selama 1 minggu secara ad libitum.

Delapan belas ekor tikus tersebut dikelompokkan ke dalam 3 kelompok perlakuan, pada kelompok K dan P1 tidak diberikan perlakuan apa-apa selama 3 hari. Pada Kelompok P2 diberikan Ekstrak *phaleria macrocarpa* selama 3 hari. Pada hari ketiga tikus kelompok P1 dan P2 disuntik ips E coli intraperitoneal , diamati terjadinya sepsis. Setelah 2 jam tikus dianestesi dan diambil darah tepi tikus melalui vena retrobulbar dengan menggunakan pipa hematokrit untuk dilakukan pembuatan preparat darah hapus dengan pengecatan Giemsa, selanjutnya dibunuh dengan dislokasi vertebra cervical setelah dilakukan anestesi, kemudian diambil jaringan liennya untuk dilakukan pemeriksaan indeks apoptosisnya.¹⁹

Prosedur pembuatan preparat histopatologi

a. Fiksasi

Jaringan lien dimasukkan dalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam buffer Natrium Phospat sampai mencapai pH 7,0). Setelah

fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan aquadest selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.

b. Dehidrasi

Jaringan lien dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat. Jaringan menjadi lebih jernih dan transparan. Jaringan kemudian dimasukkan dalam larutan alkohol-xylol selama 1 jam dan kemudian larutan xylol murni selama 2 x 2jam.

c. Impregnasi

Jaringan dimasukkan dalam paraffin cair selama 2x2 jam.

d. Embedding .

Jaringan ditanam dalam paraffin padat yang mempunyai titik lebur 56-58⁰C, ditunggu sampai paraffin padat. Jaringan dalam paraffin dipotong setebal 4 mikron dengan mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca obyek yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyek dipanaskan dalam incubator suhu 56-58⁰C sampai paraffin mencair.

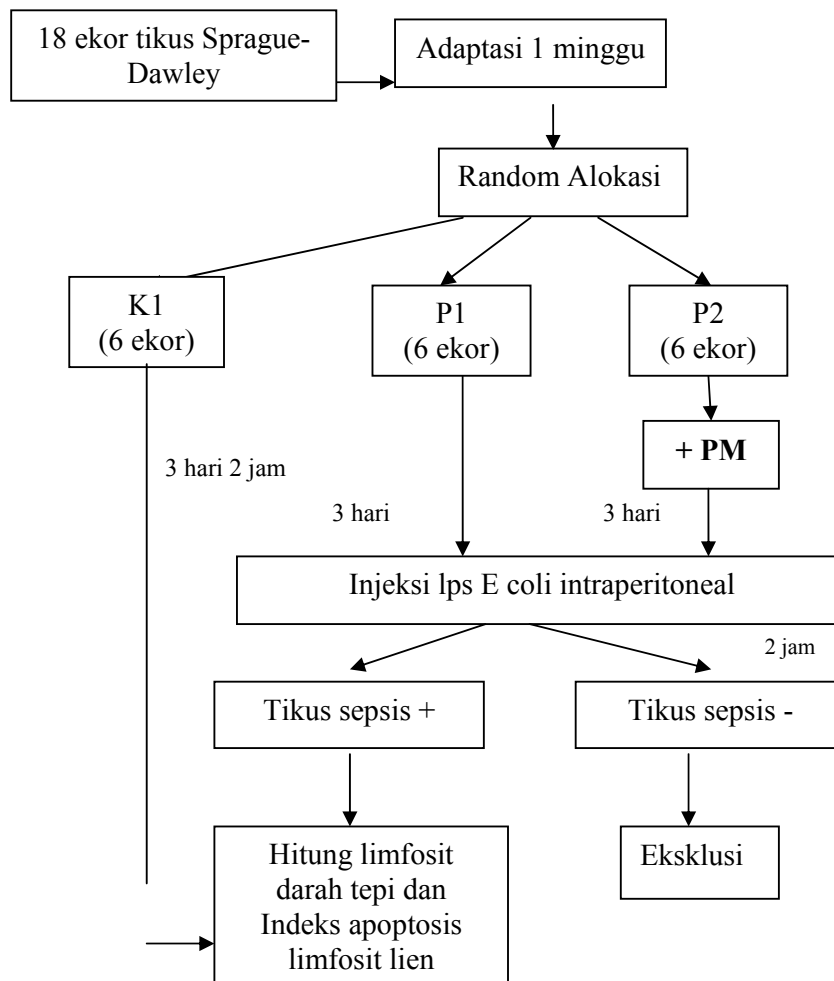
e. Pewarnaan jaringan dengan H&E

Secara berurutan jaringan pada kaca obyek dimasukkan dalam:

1. Xylol	1 menit	11. Air	15 detik
2. Xylol	2 menit	12. Alkohol 80%	15 detik
3. Xylol	2 menit	13. Alkohol 96%	30 detik
4. Alkohol 100%	2 menit	14. Alkohol 100%	45 detik
5. Alkohol 96%	2 menit	15. Xylol	1 menit

- | | | | |
|--------------------------------------|-----------|-----------|---------|
| 6. Alkohol 70% | 1 menit | 16. Xylol | 1 menit |
| 7. Air | 1 menit | | |
| 8. Mayer HE | 7,5 menit | | |
| 9. Air | 7,5 menit | | |
| 10. Eosin (0,5%)–alkohol–asam asetat | 1 menit | | |

4.7 Alur kerja



Gambar-3. Alur kerja.

4.8 Analisis data

Setelah data terkumpul dilakukan *data cleaning, coding* dan tabulasi. Analisa data meliputi uji hipotesis dan analisis deskriptif. Pada analisa deskriptif jumlah limfosit, disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD, median dan grafik box plot. Kemudian dilakukan uji normalitas data dengan uji *Kolmogorov-Smirnov*.

Uji normalitas dengan Shapiro-Wilk pada variabel jumlah limfosit darah tepi dan Indeks apoptosis limfosit lien adalah normal, data dianalisis dengan uji parametrik *ANOVA*. Post Hoc test dilakukan dengan Bonferroni test. Batas derajat kemaknaan adalah apabila $P \leq 0,05$. Analisa data dilakukan dengan *software* SPSS Ver. 10.0 for Windows. ⁴¹⁻⁶

BAB 5

Hasil

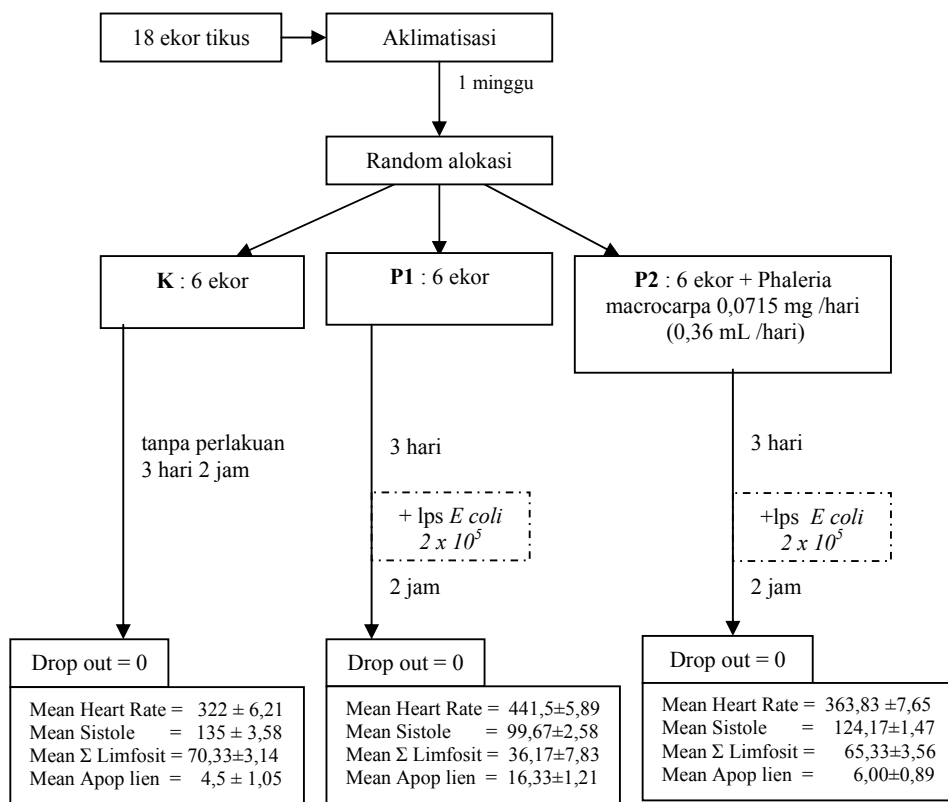
Penelitian dilakukan pada 18 ekor tikus Sprague-Dawley berusia 2 - 2,5 bulan dengan berat badan 200-350 gram. Kemudian dilakukan aklimatisasi selama 1 minggu, dan diberikan pakan standar. Setelah itu dibagi menjadi tiga kelompok secara random dengan jumlah masing masing kelompok 6 ekor tikus.

Pada kelompok 1 (kontrol), jumlah tikus 6 ekor dan tidak dilakukan perlakuan, pada akhir penelitian tidak didapatkan tikus yang mati atau masuk dalam kriteria eksklusi, sehingga jumlah tikus tetap 6 ekor sampai akhir penelitian. Hasil yang didapatkan setelah dilakukan pengukuran tekanan darah dan nadi dengan alat ukur *Kent Tail Blood Pressure* pada kelompok 1 ini jumlah rata-rata (mean) tekanan darah systole ($135\pm 3,58$) mmHg. Sedangkan jumlah rata-rata nadi adalah ($322\pm 6,21$) mmHg. Hasil perhitungan limfosit darah perifer rata-rata pada keenam ekor tikus tersebut adalah ($70,33\pm 3,14$), dan perhitungan indeks apoptosis lien rata-rata pada keenam sampel tersebut adalah ($4,5\pm 1,05$).

Pada kelompok 2 (Perlakuan 1), jumlah tikus 6 ekor dan dilakukan paparan lps *E coli* 10^5 kuman/cc sebanyak 2 cc, pada akhir penelitian tidak

didapatkan tikus yang mati atau masuk dalam kriteria eksklusi, sehingga jumlah tikus tetap 6 ekor sampai akhir penelitian. Hasil yang didapatkan setelah dilakukan pengukuran tekanan darah dan nadi dengan alat ukur *Kent Tail Blood Pressure* pada kelompok 2 ini jumlah rata-rata (mean) tekanan darah sistole (99,67±2,58) mmHg. Sedangkan jumlah rata-rata nadi adalah (441,5±5,89) mmHg. Hasil perhitungan limfosit darah perifer rata-rata pada keenam ekor tikus tersebut adalah (36,17±7,83), dan perhitungan indeks apoptosis lien rata-rata pada keenam sampel tersebut adalah (16,33±1,21).

Pada kelompok 3 (Perlakuan 2), jumlah tikus 6 ekor dan dilakukan paparan *E coli* 10⁵ kuman/cc sebanyak 2 cc dan mendapat *phaleria macrocarpa* 0,0715 mg /hari (0,36 mL /hari) selama 3 hari, pada akhir penelitian tidak didapatkan tikus yang mati atau masuk dalam kriteria eksklusi, sehingga jumlah tikus tetap 6 ekor sampai akhir penelitian. Hasil yang didapatkan setelah dilakukan pengukuran tekanan darah dan nadi dengan alat ukur *Kent Tail Blood Pressure* pada kelompok 3 ini jumlah rata-rata (mean) tekanan darah systole (124,17±1,47) mmHg. Sedangkan jumlah rata-rata nadi adalah (363,83,5±7,65) mmHg. Hasil perhitungan limfosit darah perifer rata-rata pada keenam ekor tikus tersebut adalah (65,33±3,56), dan perhitungan indeks apoptosis lien rata-rata pada keenam sampel tersebut adalah (6,00±0,89).



Gambar-4. Diagram skematik alur kerja dan hasil

Hasil ekplorasi data dari tiap variabel pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada tabel – 1.

Tabel-1. Hasil Eksplorasi data

Variabel	Kelompok	Mean	Uji normalitas Shapiro-Wilk
Nadi	Kontrol	322 ± 6,21	<i>p=0,594</i>
	Perlakuan 1	441,5 ± 5,89	<i>p=0,873</i>
	Perlakuan 2	363,83 ± 7,65	<i>p=0,773</i>
Sistole	Kontrol	135 ± 3,58	<i>p=0,920</i>
	Perlakuan 1	99,67 ± 2,58	<i>p=0,875</i>
	Perlakuan 2	124,17 ± 1,47	<i>p=0,714</i>
Jumlah limfosit perifer	Kontrol	70,33 ± 3,14	<i>p=0,507</i>
	Perlakuan 1	36,17 ± 7,83	<i>p=0,567</i>
	Perlakuan 2	65,33 ± 3,56	<i>p=0,984</i>
Indeks Apoptosis Lien	Kontrol	4,5 ± 1,05	<i>p=0,790</i>
	Perlakuan 1	16,33 ± 1,21	<i>p=0,366</i>
	Perlakuan 2	6,00 ± 0,89	<i>p=0,128</i>

Dari hasil uji normalitas data dengan uji shapiro-wilk pada variabel jumlah limfosit perifer dan indeks apoptosis di lien didapatkan bahwa distribusi datanya normal untuk masing-masing kelompok yaitu jumlah limfosit perifer kelompok kontrol (70,33 ± 3,14; *p=0,507*), jumlah limfosit perifer kelompok P1 (36,17 ± 7,83; *p=0,567*), jumlah limfosit perifer kelompok P2 (65,33 ± 3,56; *p=0,984*), sedangkan indeks apoptosis lien kelompok kontrol (4,5 ± 1,05; *p=0,790*), indeks apoptosis lien kelompok P1 (16,33 ± 1,21; *p=0,366*), indeks apoptosis lien kelompok P2 (6,50 ± 1,05; *p=0,790*).

Pada tabel-x juga dapat dilihat rerata jumlah nadi per menit pada setiap kelompok percobaan. Rerata jumlah nadi pada kelompok kontrol ($322 \pm 6,21$), kelompok P1 ($441,5 \pm 5,89$), kelompok P2 ($363,83 \pm 7,65$). Nilai normal jumlah nadi/menit pada tikus adalah 310-340 x/menit.

Tekanan darah sistole pada setiap kelompok percobaan juga dapat dilihat pada tabel-x. Rerata sistole pada kelompok kontrol ($135 \pm 3,58$), kelompok P1 ($99,67 \pm 2,58$), kelompok P2 ($124,17 \pm 1,47$). Nilai normal sistole pada tikus adalah 133-160 mmHg.

Analisis statistik yaitu uji beda dilakukan terhadap variabel jumlah limfosit perifer dan indeks apoptosis di lien. Oleh karena skala variabel independen maupun dependennya numerik dan distribusi datanya normal, maka analisis statistik untuk uji beda semua kelompoknya menggunakan *One way ANOVA*. Uji beda untuk masing-masing kelompok menggunakan *Bonferoni test*.

Hasil uji ANOVA dapat dilihat pada tabel-2.

Tabel-2. Hasil uji ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Limfosit Perifer	Between groups	4086.111	2	2043.056	73.053	.000
	Within groups	419.500	15	27.967		
	Total	4505.611	17			
Indeks Apoptosis Lien	Between groups	498.111	2	249.056	221.931	.000
	Within groups	16.833	15	1.122		
	Total	514.944	17			

Sedangkan uji homogenitasnya dapat dilihat pada tabel-3

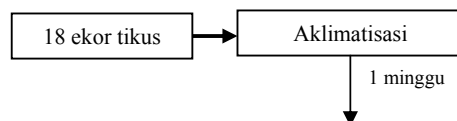
Tabel-3. Hasil Levene test

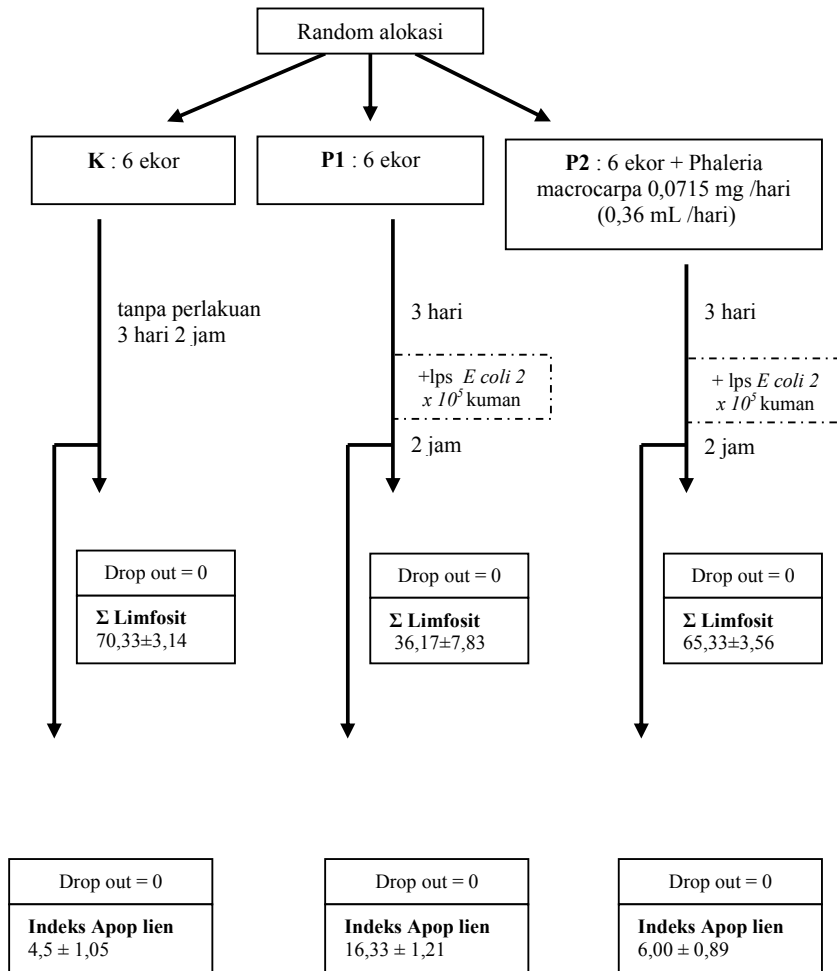
Test of Homogeneity of Variances				
	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Limfosit Perifer	3.467	2	15	.058
Indeks Apoptosis Lien	.625	2	15	.549

Hasil uji ANOVA didapatkan bahwa keseluruhan kelompok dari variabel jumlah limfosit perifer mempunyai perbedaan yang bermakna ($p < 0,001$). Variabel Indeks apoptosis lien pada uji tersebut juga menunjukkan perbedaan yang adalah sangat bermakna secara statistik ($p < 0,001$).

Dari tabel tersebut diketahui bahwa data pada variabel jumlah limfosit perifer ($p = 0,058$) dan Indeks apoptosis ($p = 0,549$) adalah homogen. Sehingga post hoc test untuk variabel-variabel tersebut adalah dengan menggunakan uji Bonferoni.

Post Hoc test pada variabel jumlah limfosit perifer menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol (K) dan perlakuan 1 (P1) ($p < 0,001$), dan antara kelompok perlakuan 1 (P1) dan perlakuan 2 (P2) ($p < 0,001$). Sedangkan antara kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan 2 (P2) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p = 0,367$).





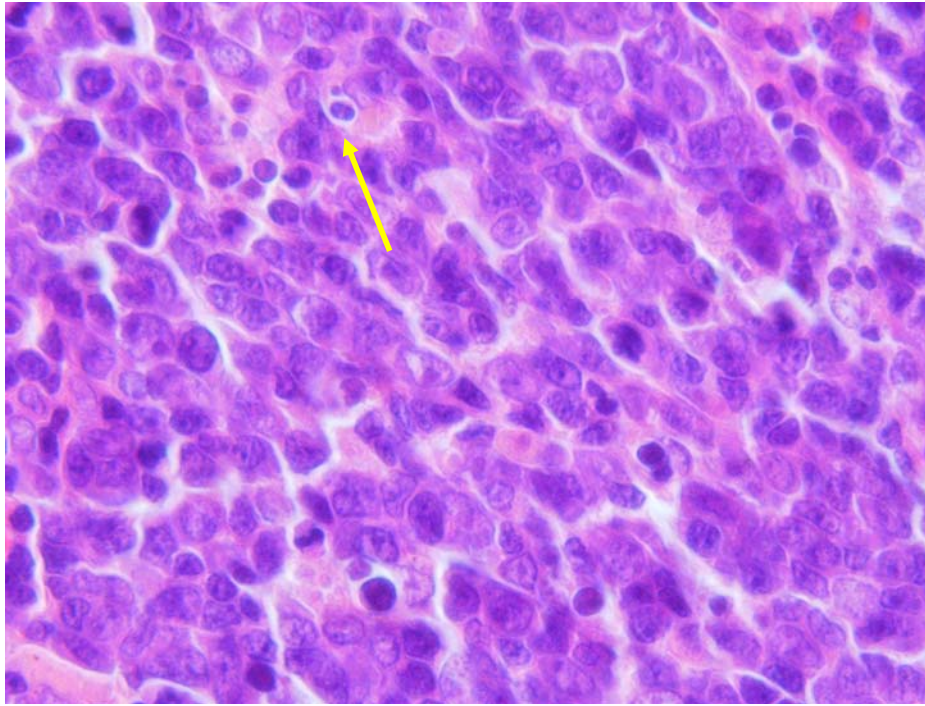
Gambar-5. Diagram skematik CONSORT (Consolidated State of Report)

Sedangkan *Post Hoc test* pada variabel indeks apoptosis lien menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol (K) dan perlakuan 1 (P1) ($p < 0,001$), dan antara kelompok perlakuan 1 (P1) dan perlakuan 2 (P2) ($p < 0,001$). Sedangkan antara kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan 2 (P2) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p = 0,081$).

Tabel-4. Hasil Post Hoc test

		Multiple Comparisons						
Dependent Variable		(I) Kelompok perlakuan	(J) Kelompok perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
							Lower Bound	Upper Bound
Limfosit perifer	Bonferroni	kontrol	lps	34.17*	3.05	.000	25.94	42.39
			lps+md	5.00	3.05	.367	-3.22	13.22
		lps	kontrol	-34.17*	3.05	.000	-42.39	-25.94
			lps+md	-29.17*	3.05	.000	-37.39	-20.94
		lps+md	kontrol	-5.00	3.05	.367	-13.22	3.22
			lps	29.17*	3.05	.000	20.94	37.39
	Tamhane	kontrol	lps	34.17*	3.05	.000	23.22	45.11
			lps+md	5.00	3.05	.081	-.56	10.56
		lps	kontrol	-34.17*	3.05	.000	-45.11	-23.22
			lps+md	-29.17*	3.05	.000	-40.12	-18.21
		lps+md	kontrol	-5.00	3.05	.081	-10.56	.56
			lps	29.17*	3.05	.000	18.21	40.12
Indeks apoptosis lien	Bonferroni	kontrol	lps	-11.83*	.61	.000	-13.48	-10.19
			lps+md	-1.50	.61	.081	-3.15	.15
		lps	kontrol	11.83*	.61	.000	10.19	13.48
			lps+md	10.33*	.61	.000	8.69	11.98
		lps+md	kontrol	1.50	.61	.081	-.15	3.15
			lps	-10.33*	.61	.000	-11.98	-8.69
	Tamhane	kontrol	lps	-11.83*	.61	.000	-13.71	-9.96
			lps+md	-1.50	.61	.071	-3.12	.12
		lps	kontrol	11.83*	.61	.000	9.96	13.71
			lps+md	10.33*	.61	.000	8.55	12.12
		lps+md	kontrol	1.50	.61	.071	-.12	3.12
			lps	-10.33*	.61	.000	-12.12	-8.55

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



Gambar-6. Sel yang mengalami apoptosis

BAB 6

Pembahasan

Dari 18 ekor tikus dalam penelitian, ternyata tidak ada satu pun dari ketiga kelompok perlakuan yang mengalami drop out. Pada kelompok 1 (kontrol) terlihat bahwa tekanan darah sistole dari tikus Spague-Dawley adalah sekitar $135 \pm 3,58$ mmHg, hal ini masih dalam range normal sekitar 133-160 mmHg. Jumlah rata-rata nadi pada kelompok kontrol tersebut sekitar $322 \pm 6,21$, di mana range normalnya sekitar 310-340 kali/menit. Jadi pada kelompok kontrol dapat dilihat bahwa tekanan darah sistole dan jumlah nadi per menit dari tikus-tikus tersebut masih dalam batas normal.

Pada kelompok 2 (perlakuan 1) terlihat bahwa tekanan darah sistole rata-ratanya $99,67 \pm 2,58$ mmHg, rata-rata ini 23,7% lebih rendah dari nilai rata-rata pada kelompok kontrol yaitu $135 \pm 3,58$. Jumlah rata-rata nadi per menit pada kelompok 2 (perlakuan 1) adalah $441,5 \pm 5,89$, di mana rata-rata ini 29,85% lebih tinggi dari nilai range maksimal nadi yaitu 340 kali/menit. Pada kelompok ini tekanan darah sistolenya mengalami penurunan 23,7% (lebih dari 20%) dan nadinya mengalami peningkatan 29,85%, hal ini masuk dalam kriteria sepsis pada hewan coba, di mana terjadi peningkatan rata-rata nadi $> 20\%$, dan penurunan tensi $> 20\%$. Pemberian stimulasi endotoksin dari 2×10^5 lps E coli pada kelompok ini sudah dapat menyebabkan terjadinya sepsis pada hewan coba.

Pada kelompok 3 (perlakuan 2) terlihat bahwa tekanan darah sistole rata-ratanya $124,17 \pm 1,47$ mmHg, rata-rata ini 8,02% lebih rendah dari nilai rata-rata

pada kelompok kontrol yaitu $135 \pm 3,58$. Jumlah rata-rata nadi per menit pada kelompok 3 (perlakuan 2) adalah $363,83 \pm 7,65$, di mana rata-rata ini 7,01% lebih tinggi dari nilai range maksimal nadi yaitu 340 kali/menit. Pada kelompok ini tekanan darah sistolenya mengalami penurunan 8,02% (kurang dari 20%) dan nadinya mengalami peningkatan 7,01%, hal ini berarti bahwa kelompok 3 tidak masuk dalam kriteria sepsis pada hewan coba, di mana sepsis terjadi bila peningkatan rata-rata nadi $> 20\%$, dan penurunan tensi $> 20\%$. Pada kelompok ini, tikus tidak mengalami sepsis. Hal ini dimungkinkan karena pada kelompok ini diberikan *phaleria macrocarpa* 0,0715 mg/hari selama 3 hari, sedangkan *phaleria macrocarpa* sendiri memiliki efek antiinflamasi, sesuai penelitian di Jepang, bahwa kandungan polyphenol dalam tanaman obat (*tea polyphenols*) akan menurunkan pelepasan TNF- α dan IFN- γ oleh sel T-helper.^{11,12} TNF- α ini mempunyai peran penting dalam apoptosis sel.^{14,15}

Jumlah limfosit darah tepi rata-rata pada kelompok 1 sekitar $70,33 \pm 3,14 \%$, sedangkan nilai normalnya 63-75%. Hal ini berarti bahwa jumlah limfosit darah tepi pada kelompok 1 masih dalam batas normal, karena belum mendapat paparan lps E coli. Sedangkan indeks apoptosis lien pada kelompok ini adalah $4,5 \pm 1,05$.

Lain halnya pada kelompok 2, jumlah limfosit darah tepinya sekitar $36,17 \pm 7,83$, hal ini berarti bahwa bila dibandingkan dengan nilai rata-rata jumlah limfosit darah tepi pada kelompok kontrol ($70,33 \pm 3,14 \%$), kelompok ini mengalami penurunan jumlah limfosit. Indeks apoptosis lien pada kelompok ini adalah $16,33 \pm 1,21$, dan bila dibandingkan dengan nilai rata-rata indeks apoptosis pada kelompok kontrol ($4,5 \pm 1,05$) terjadi kenaikan indeks apoptosis lien. Hal ini

membuktikan adanya peningkatan apoptosis limfosit. Apoptosis ini dapat terjadi karena pada SIRS akan terjadi peningkatan $TNF\alpha$, FasL, dan Glukokortikoid, peningkatan tersebut akan mengakibatkan meningkatnya apoptosis sel. Pada sel-sel limfosit juga akan mengalami apoptosis, hal ini terjadi karena adanya sitokin-sitokin ligan penyebab apoptosis (*death cytokin*), seperti FasL, dan $TNF-\alpha$. Pada populasi sel limfosit T CD8 aktivasi induksi apoptosis lebih banyak dilakukan oleh FasL melalui reseptor TNF-R1, dan pada populasi limfosit T CD4 aktivasi induksi apoptosis lebih banyak dilakukan oleh Fas (CD95) dan FasL⁹. Di mana akan terjadi aktivasi kaspase inaktif menjadi kaspase aktif^{24-7,31}. Kerusakan DNA dipicu oleh enzim kaspase aktif, di mana kaspase ini merupakan suatu molekul protein 10 dan 20 kD berupa *protease cystein*. Saat ini sudah dikenal \pm 12 jenis kaspase. Protein target dari kaspase ini adalah protein struktural/sitoskeletal (seperti lamin, actin, cytokeratin, dll), dan protein *DNA repair system* [seperti (*ADP-ribose*)-*polymerase*], onkoprotein (terutama Rb protein). Yang terakhir diketahui, kaspase juga akan mengaktifkan *DNase* yang menyebabkan kerusakan DNA selama apoptosis.^{26-9,31,32} Pada sepsis, juga akan terjadi aktivasi limfosit terutama oleh IL-2, di mana limfosit yang sudah teraktifasi ini lebih mudah mengalami induksi apoptosis dibandingkan limfosit dalam keadaan istirahat (*resting cell*).^{26-9,31}.

Pada kelompok 3, jumlah limfosit darah tepi sekitar $65,33\pm 3,56$, hal ini berarti bahwa bila dibandingkan dengan nilai rata-rata jumlah limfosit darah tepi pada kelompok kontrol ($70,33\pm 3,14$ %), kelompok ini tetap mengalami penurunan jumlah limfosit, tetapi tidak berbeda bermakna secara statistik ($p=0,367$). Indeks

apoptosis lien pada kelompok ini adalah $6,00 \pm 0,89$, dan bila dibandingkan dengan nilai rata-rata indeks apoptosis pada kelompok kontrol ($4,5 \pm 1,05$), pada kelompok ini tetap terjadi kenaikan indeks apoptosis lien tetapi tidak berbeda bermakna secara statistik ($p=0,081$). Dari kedua fenomena di atas membuktikan bahwa pada studi ini *phaleria macrocarpa* dapat menghambat terjadinya limfositopenia dan menekan indeks apoptosis lien. Hal ini sesuai dengan studi yang dilakukan di Jepang terhadap kandungan poliphenol pada tanaman obat yang akan dapat menurunkan pelepasan TNF- α dan IFN- γ oleh sel T-helper.^{11,12} Di mana TNF- α ini mempunyai peran penting dalam apoptosis sel, termasuk sel-sel limfosit.^{14,15}

Uji beda pada variabel jumlah limfosit perifer dan indeks apoptosis lien antar dua kelompok, diketahui bahwa pada kelompok perlakuan 1 (kontrol) dan kelompok perlakuan 2 (yang terpapar lps E coli) terjadi perbedaan jumlah limfosit darah tepi dan indeks apoptosis lien yang sangat bermakna. Hal ini sesuai dengan teori bahwa individu yang mengalami paparan lps E coli yang berlebih akan terjadi pelepasan sitokin-sitokin terutama TNF, yang akan berakibat terjadinya apoptosis sel.

Perbedaan antara kelompok 2 dan kelompok 3 juga sangat signifikan, hal ini membuktikan bahwa pemberian *phaleria macrocarpa* dapat menurunkan apoptosis sel dan mengurangi limfositopenia pada tikus yang terpapar lps E coli. Perbedaan antara kelompok 1 dan kelompok 3 tidak berbeda bermakna, yang berarti bahwa dengan pemberian *phaleria macrocarpa* maka limfositopenia ($p=0,367$) dan apoptosis jaringan lien ($p=0,081$) dapat dikurangi sampai

mendekati keadaan normal. Peneliti tidak melakukan pengukuran terhadap kadar IL-2/TNF, sehingga belum mengetahui seberapa tinggi kadar IL-2/TNF yang dapat menyebabkan terjadinya apoptosis.

BAB 7

Simpulan dan Saran

7.1 Simpulan

- Terdapat perbedaan jumlah limfosit darah perifer pada tikus yang terpapar lps E coli dengan yang tidak.
- Terjadi peningkatan indeks apoptosis limfosit lien pada tikus yang terpapar lps E coli dengan tikus yang terpapar lps E coli tetapi mendapat suplemen ekstrak *phaleria macrocarpa*.

7.2 Saran

- Untuk membuktikan bahwa apoptosis yang terjadi pada paparan lps E coli adalah akibat dari produksi IL-2/TNF yang berlebih, maka perlu dilakukan penelitian pada kadar IL-2/TNF dari tikus yang terpapar lps E coli atau yang lebih baik mempergunakan Knock Out mice.
- Karena *phaleria macrocarpa* mempunyai efek yang baik terhadap pencegahan terjadinya apoptosis pada tikus yang terpapar lipopolisakarida, maka perlu dipikirkan pengembangan untuk kelanjutan penelitian terhadap manusia.

DAFTAR PUSTAKA

1. The Wikipedia free encyclopedia. Sepsis. Adelaide: Wikimedia Foundation Inc; 2007. p. 1-4.
2. Mitchell M, Levy. Sepsis. The Institute for Healthcare Improvement (IHI): Cambridge, Massachusetts. Available from: URL: <http://www.ihl.org/IHI/Topics/CriticalCare/Sepsis/>
3. Vincent JL, Abraham E, Annane D, Bernard G, Rivers E, Greet v B. **Reducing mortality in sepsis: new directions**. Critical Care 2005;6(3):S1-S18.
4. Filbin MR, Stapczynski JS. Shock, Septic. In: Dire D J, Talavera F, Weiss EL, Halamka J, Pollack CV editors. [Infectious Diseases](#). February 2006. Available from: URL: <http://www.emedicine.com/EMERG/topic533.htm>
5. Jill S. Lasker. Sepsis. Gale Encyclopedia of Medicine Available from: URL: <http://www.healthatoz.com/healthatoz/Atoz/common/standard/transform.jsp?requestURI=/healthatoz/Atoz/ency/sepsis.jsp>
6. Cunha, Burke A., MD. "Sepsis, Bacterial." Talavera F, Weiss EL editors. [Infectious Diseases](#). September 2004. Available from: URL: <http://www.emedicine.com/med/topic3163.htm>.
7. Sharma S. Multisystem Organ Failure of Sepsis. Talavera F, editors June 2006 Available from: URL: <http://www.emedicine.com/med/topic3372.htm>
8. Eschun G. Excerpt from multisystem organ failure of sepsis. Franklin C, Talavera F, editors. June 26, 2006 Available from: URL: <http://www.emedicine.com/med/byname/multisystem-organ-failure-of-sepsis.htm>
9. Sepsis Article Last Updated: May 2, 2007 Available from: URL: <http://www.emedicine.com/ped/topic3033.htm>
10. Systemic inflammatory response syndrome. Adelaide: Wikimedia Foundation Inc; 2007. p. 1-3.
11. Systemic inflammatory response syndrome – SIRS_and Multiple organ dysfunction syndrome – MODS MUDr. Jan Janota Praha, 4 Available from: URL: http://patf.lf1.cuni.cz/stumat_en/sirs_mods_en.pdf

12. Oberholzer C, Obertholzer A, Clare MS, et al. Apoptosis in Sepsis : A New Target for Therapeutic Exploration. Departements of Surgery and Pathalogy, Immunology and Laboratory Medical. University of Florida College of Medicine, Gainesville, Florida 32610, USA. 2003: 1-3.
13. Aihara M, Scardinon PT, Truong LD, Wheeler TM, Goad JR, Yang G. The frequency of apoptosis corellates with the prognosis of gleason grade 3 adenocarcinoma of the prostate. J Cancer 1995;75(2):523-9.
14. Gary W. Varilek, Fajun Yang, Eun Y. Lee et al. Green Tea Polyphenol Extract Attenuates Inflammation in Interleukin-2-Deficient Mice, a Model of Autoimmunity. Journal of Nutrition. 2001;131 : 2034-9.
15. Tomita M, Irwin KI, Xie ZJ, Santoro TJ. Tea Pigments Inhibit the Production of type 1 (T(H1)) and Type 2 (T(H2)) helper T cell cytokines in CD4(+) T Cells. Medical College of Ohio ,Glendale avenue.Toledo;2002 ; 16(1) : 36–42.
16. Lisdawati V. Mahkota Dewa, toksisitas, efek anti oksidan, dan efek anti-kanker berdasarkan uji penapisan farmakologi. Jakarta (INA): PT Phaleria macrocarpa; 2002. Available from:
URL: <http://www.indonetwork.phalerindofarma/34716.htm>.
17. Sumastuti R, Sonlimar M. Efek sitotoksik ekstrak buah dan daun Mahkota Dewa terhadap sel hela. Yogyakarta: Farmakologi FK UGM; 2003: 1-12.
18. Weaver JG, Rouse MS, Steckelberg JM, Badley AD. Improved survival in experimental sepsis with an orally administered inhibitor of apoptosis. J Faseb 2004;18:1185-90.
19. Mirochnitchenko O, Prokopenko O, Palnitkar U, Kister I, Powel WS, Inouye M. Endotoxemia in transgenic mice overexpressing human glutathione peroxidases. J Circ. Res 2000;87:289-95.
20. Copeland S, Warren HS, Lowrey SF, Calvano SE, Remick D. Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. J Clinical and Diagnosis Laboratory Immunology 2005;12(1):60-7.
21. Lauw FN, Simpson AJ, Hack CE, Prins JM, Wolbink AM, Sander JH et al. Soluble granzymes are release during human endotoxemia and in patients with severe infection due to gram-negative bacteria. JID 2000;182:206-13.
22. Hotchkiss RS, Harl IE. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis; Review Article Medical Progress. January 9, 2003: 138-50.
23. Putro MD, Yoga RW, Garajito W. SIRS dan MODS. Folia Chirurgica Indonesiana Journal of Surgery Laboratorium ilmu bedah FK UNAIR Januari – Maret 2002: 33-9.

24. Guntur AH. The Role Cytokine of the Pathogenesis of SIRS – Sepsis. Perspektif Masa Depan Immunologi Infeksi. International Journal on Immunorehabilitation 2003 ; 4 : 23-0.
25. Hardono K, Kusworini H. Basic Sciene in Septicaemia. Trigonum plus XVI Malang, 9-11 April 2004: 1 - 40.
26. Abbas A, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders; 2005: 4-15,22-3,65-80,81-103,182-7,247-53,258-9,266,268-9,279-80,290-5.
27. Kresno SB. Aspek imunologi pada kanker. Nelwan editor. Simposium ke-4 Jakarta Antimicrobial Update 2003. Jakarta: Sub Bagian Penyakit Tropik dan Infeksi Bagian Ilmu penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Rumah Sakit Umum Pusat Nasional Dr Cipto Mangunkusumo; 2003: 59 – 77.
28. Roitt IM. Immunology, 8th ed. Barcelona: Times Miror International; 1994: 21-8
29. Kresno SB. Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium, edisi ke 3. Penerbit FK UI Jakarta 96. 2002 : 72-7.
30. Guntur AH. Peran Respon Imun pada Sepsis dan Penatalaksanaannya. Kumpulan makalah Sepsis di bidang pembedahan RSDK Semarang, 13 Oktober 2001: 1-9.
31. Ladish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky S, Lawrence, Matsudaira P, Darnell J. Molecular Cell Biology. 3rd ed. New York: Scientific American Books; 1996: 886–98,1247–70.
32. Lieberman J. The ABCS of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. Nat Rev Immunol 2003;5(3):361-70.
33. Junqueira LC, Arneiro j, Kelley RO. Basic Histology. 8th ed. Prentice Hall International inc London.1995 : 423-46.
34. Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. Buku Ajar Histologi. Edisi 5. Jakarta : EGC; 1996: 291-303.
35. Kotanidou A, Choi AM, Winchurch RA, Otterbain L. Urethan anesthesia protects rats against lethal endotoxemia and reduces TNF- α release. J Appl Physiol 1996;81:2304-11.

36. Suliburk JW, Helmer KS, Kennison SD, Mercer DW, Robinson EK. Time-dependent aggravation or attenuation of lipopolisaccharide-induced gastric injury by nitric oxide synthase inhibition. *JSR* 2005;129(2):265-71.
37. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. New York: World Health Organization; 1993: 44.
38. Crisckshark R. Medical microbiology. Ecopler; 1965: 997-1022.
39. Purwanto AP, Pengantar Praktikum Patologi klinik I, 2: Bagian Patologi Klinik FK-UNDIP; 2005 : 20-3.
40. Imono AD. Obat tradisional dan fitoterapi (uji toksikologi). Yogyakarta: Universitas Gajah Mada; 1986. p. 3-21.
41. Singgih S. Statistik Deskriptif. Mengolah Data Statistik Secara Professional. SPSS (Statistical Product and Service Solution). Jakarta : PT. Elex Media Komputindo, 1999 : 68-145.
42. Tim Penelitian dan Pengembangan WAHANA KOMPUTER Semarang. Analisis statistic Non Parametrik dengan SPSS 7.5 for Windows 95. Semarang : Wahana Komputer & Andi Offset, 1997 : 109-24.
43. Singgih S. Statistik Non Parametrik. Mengolah Data Statistik Secara Professional. SPSS (*Statistical Product and Service Solution*). Jakarta : PT. Elex Media Komputindo, 1999 : 300-71.
44. Chandra B. Pengantar Statistik Kesehatan. Jakarta : EGC, 1995 : 1-96.
45. Santoso S. SPSS (*Statistical Product and Service Solution*). Jakarta : PT. Elex Media Komputindo, 1999 : 300-8.
46. Tim Penelitian dan Pengembangan WAHANA KOMPUTER Semarang. Panduan Lengkap : SPSS 6.0 for Window. Semarang : Wahana Komputer & Andi Offset, 1997 : 123-88, 380-85.

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

5. Ethical clearance.....
6. PSPG.....
7. Gambar Spyghmomanometer Kent tail.....
8. Surat keterangan penelitian.....



KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO
DAN RS dr KARIADI SEMARANG
Sekretariat : Kantor PD IV, Dekanat FK Undip
Jl. Dr. Sutomo 18, Semarang
Telp/Fax. 024-8446905



ETHICAL CLEARANCE
No.52 /EC/FK/RSDK/2007

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/
RS. Dr. Kariadi Semarang, setelah membaca dan menelaah USULAN Penelitian
dengan judul :

**PENGARUH PEMBERIAN PHALERIA MACROCARPA (MAHKOTA DEWA)
TERHADAP JUMLAH LIMFOSIT DARAH TEPI DAN
INDEKS APOPTOSIS LIEN
(Studi pada mencit balb-C yang terpapar endotoksin lipopolisakarida)**

Peneliti Utama : dr. Abdul Haris Malik
Pembimbing : 1. Prof.Dr.dr.H.A.Faik Heyder,Sp.B,Sp.E-TKV
2. Prof.dr.Edi Dharmana,M.Sc.Ph.D,Sp.Park
Penelitian : Dilaksanakan di Laboratorium Biokimia
FK UNDIP

Setuju untuk dilaksanakan, dengan memperhatikan prinsip-prinsip yang
dinyatakan dalam Deklarasi Helsinki 1975, dan Pedoman Nasional Etik
Penelitian Kesehatan (PNEPK) Departemen Kesehatan RI 2004

Pada laporan akhir peneliti harus melampirkan cara pemeliharaan & dekapitasi
hewan coba.

Semarang, 20 Agustus 2007

Menyetujui
Fakultas Kedokteran Undip
Dekan



dr. Soejoto, PAK, Sp KK(K)
NIP. 130 368 078

Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Fakultas Kedokteran Undip/RS.Dr.Kariadi
Ketua



Prof. Dr. dr. Tjahjono, Sp PA(K)FIAC
NIP. 130 368 076

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (K E P K)
FK UNDIP / R.S. Dr. KARIADI

S E M A R A N G

Sekretariat : Kantor PD IV-Dekanat FK Undip

Telp/Fax : 024-8446905

FORMULIR PENGAJUAN ETIK PENELITIAN
PEMANFAATAN HEWAN PERCOBAAN UNTUK PENELITIAN

1. Ketua Pelaksana penelitian : dr. Abdul Haris Malik

2. Alamat Kantor dan No. Tel/Fax/e-mail :

Bagian Bedah FK UNDIP / RSDK, e-mail : oed_maz@yahoo.com

3. Judul Proyek :

Pengaruh Pemberian Phaleria Macrocarpa Terhadap Jumlah Limfosit Darah Tepi dan Indeks Apoptosis Lien (Studi pada Mencit Balb-C yang Terpapar Endotoksin Lipopolisakarida)

No. Proyek / Protokol : oleh petugas)

Tipe Proyek (*beri tanda v*) :

Proyek Baru Proyek perubahan

Proyek Lanjutan

Apabila proyek perubahan dan lanjutan, sebutkan No. Proyek / Protokol sebelumnya :

4. Data hewan yang akan digunakan :

Spesies Hewan : Mencit strain Balb-C	Umur : 2 – 2,5 bulan
Jenis Kelamin : Betina	Jumlah : 18 ekor
Asal Hewan : Laboratorium Patologi Anatomi FKUI / RS Cipto Mangunkusumo Jakarta	

5. Keterangan mengenai prosedur yang akan dilakukan terhadap hewan :

a. Tujuan Proyek :

Tujuan umum

Ingin mengetahui efek pemberian Mahkota Dewa terhadap terjadinya limfositopenia pada sepsis.

Tujuan khusus

- Menilai perbedaan jumlah limfosit darah perifer pada individu yang terpapar lipopolisakarida (LPS) dengan yang tidak.
- Mengetahui perbedaan indeks apoptosis limfosit lien dan darah perifer pada individu yang terpapar lipopolisakarida (LPS) dengan individu yang terpapar lipopolisakarida (LPS) tetapi mendapat suplemen ekstrak Mahkota Dewa.

b. Alasan menggunakan hewan dalam kajian penelitian ini : Ekstrak Mahkota

Dewa sebagai antikanker secara Ilmiah belum pernah dicobakan pada manusia.

c. Prosedur yang akan dilakukan :

Delapanbelas ekor mencit strain Balb-C diadaptasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standard selama 1 minggu secara ad libitum.

Delapanbelas ekor mencit tersebut dikelompokkan ke dalam 3 kelompok perlakuan, pada kelompok K dan P1 tidak diberikan perlakuan apa-apa selama 3 hari. Pada Kelompok P2 diberikan Ekstrak Mahkota Dewa selama 3 hari. Pada hari ketiga semua mencit disuntik LPS intraperitoneal, diamati terjadinya sepsis. Bila tidak masuk dalam kriteria sepsis dieksklusi. Bila masuk dalam kriteria, maka setelah 6 jam diambil darah tepi mencit, dan mencit dianestesi dengan aether, selanjutnya dibunuh dengan dislokasi vertebra cervical, kemudian diambil jaringan liennya.

Perhitungan dosis Mahkota Dewa yang telah digunakan pada manusia yaitu 5 gram 1 x sehari, dikalikan konstanta uji terapi pada hewan coba (mencit) yaitu 0,0026 dikalikan konstanta hasil ekstrak 0,0055, sehingga

dosis yang diberikan adalah $5000 \times 0,0026 \times 0,0055 = 0,0715$ mg/hari (0,36 mL).

d. Lama penelitian : 18 hari, dimulai sejak *Ethical Clearance* ini disetujui.

e. Apakah ada hewan yang akan dimusnahkan setelah penelitian selesai

Ya

tidak

Dimusnahkan karena pengambilan sampel dilakukan dengan cara membunuh hewan coba.

f. Hewan dimusnahkan dengan cara dibakar.

6. Peralatan dan obat-obatan / anestesi yang akan digunakan terhadap hewan.

a. Peralatan : Beker glass besar, kapas, penutup.

b. Obat yang dipergunakan untuk anestesi adalah ether

7. Klasifikasi proyek adalah kategori B, yaitu penelitian pada hewan percobaan vertebrata yang diharapkan sedikit sekali atau sama sekali tidak menimbulkan rasa ketidaknyamanan.

8. Lokasi hewan akan ditempatkan adalah di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran UNDIP.

9. Apakah proyek ini telah dibahas dengan Penanggung jawab / Ahli hewan percobaan / Komisi Penggunaan dan Pemeliharaan Hewan Percobaan (KPPH)

Ya

Tidak

10. Apakah ada rekomendasi KPPH tentang penelitian yang diajukan (harap dilampirkan)

Ya

Tidak

Semarang, 23 – 07 – 2007
Ketua Pelaksana Penelitian



dr. Abdul Haris Malik

KOMITE "CLEARENCE" ETIKA MEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO
DAN RS. DR. KARIADI SEMARANG
Sekretariat : Kantor PD IV – Dekanat FK Undip
Telp/Fax. 024-8446905

1. *Nama Peneliti Utama* : dr. Abdul Haris Malik
Anggota Peneliti : -
Multisenter : Tidak
2. *Judul Penelitian* :
Pengaruh Pemberian Phaleria Macrocarpa Terhadap Jumlah Limfosit Darah Tepi dan Indeks Apoptosis Lien (Studi pada Mencit Balb-C yang Terpapar Endotoksin Lipopolisakarida)
3. *Subyek* : Binatang (Mencit strain Balb-C)
4. *Perkiraan waktu yang akan digunakan menyelesaikan satu subyek* :
18 hari
5. *Ringkasan usulan penelitian* :

Latar Belakang

Sepsis dan *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) merupakan 10 besar penyebab utama kematian pada pasien dengan penyakit kritis. Teori kematian pada sepsis diakibatkan oleh *overstimulasi* dari Lipopolisakarida (LPS) terhadap sistem imun, yang berdasarkan penelitian pada hewan, dengan diberikannya dosis besar LPS atau bakteri dimana akan terjadi peningkatan sitokin seperti TNF α dalam sirkulasi. Pada keadaan sepsis akan terjadi mekanisme apoptosis yang merupakan kematian sel yang terprogram, peningkatan apoptosis berperan dalam proses terjadinya sepsis. Telah dilakukan eksperimen pada hewan percobaan dan dilaporkan bahwa beberapa sel target : timus, lien, plakspeyer, hepar, ginjal, paru, usus dan otot rangka akan mengalami proses apoptosis. Diantara sel target tersebut limfosit terlihat menjadi sel target pre dominan terjadinya apoptosis selama berlangsungnya sepsis. Ini diakibatkan oleh menurunnya jumlah limfosit (limfositopenia) pada pulpa putih di lien .

Pada keadaan sepsis limfosit mengalami aktivasi terutama oleh Interleukin-2 (IL-2) yang berperan sebagai aktifator dan stimulator, tetapi pada konsentrasi berlebih justru akan berperan sebagai *feed back* regulator terhadap sel limfosit T dengan meningkatkan *T Cell Reseptor* (TCR) yang mengaktifkan *Ligand death* (TNF α dan FasL), sehingga limfosit yang mengalami aktivasi lebih mudah mengalami apoptosis dibandingkan limfosit dalam keadaan istirahat .

Peneliti di Jepang – yang meneliti efek kandungan polyphenol pada salah satu tanaman obat mengemukakan bahwa poliphenol akan menurunkan

pelepasan Tumor Necrosis Factor (TNF- α) dan Interferon- γ (IFN- γ) oleh sel T-Helper. Polyphenol dalam Tanaman obat dilaporkan mempunyai kemampuan untuk menghambat aktivasi *Nuclear Factor Kappa B* (NF- κ B), suatu *transcription factor* yang berperan penting dalam regulasi molekul pembentukan sitokin. Pada penelitian yang dilakukan Tomita M dkk dari Ohio USA, dilaporkan bahwa sifat immunosupresif polyphenol terhadap TH1 CD4 adalah hambatan dalam ekspresi gen IL-2 dan IFN- γ .

Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) merupakan salah satu tanaman obat tradisional Indonesia yang masih belum memiliki acuan informasi yang lengkap baik dari segi farmakologi maupun fitokimia. Suatu penelitian awal terhadap ekstrak daging dan kulit biji *Phaleria macrocarpa* menunjukkan adanya kandungan zat aktif berupa alkaloid, terpenoid, saponin, dan senyawa polyphenol. Pengujian terhadap kadar toksisitas ekstrak tanaman juga telah dilakukan terhadap larva udang *Artemia Salina* Leach setelah diinkubasi selama 24 jam. Tanaman ini mempunyai efek mengurangi reaksi inflamasi tubuh dengan penurunan ekspresi gen TNF- α dan IFN- γ oleh sel T-Helper. Belum ditemukan studi *in vivo* yang membuktikan efek ekstrak *Phaleria macrocarpa* pada respon imunologis terutama pada sepsis.

Dengan latar belakang tersebut di atas kami ingin membuktikan bahwa pada keadaan sepsis akan terjadi limfositopenia dan Mahkota dewa, salah satu tanaman obat, dapat mengurangi penurunan jumlah limfosit.

Perumusan Masalah

- Apakah akan terjadi perbedaan jumlah limfosit darah perifer pada individu yang terpapar lipopolisakarida (LPS) dengan yang tidak ?
- Apakah akan terjadi perbedaan indeks apoptosis limfosit lien dan darah perifer pada individu yang terpapar lipopolisakarida (LPS) dengan individu yang terpapar lipopolisakarida (LPS) tetapi mendapat suplemen ekstrak Mahkota Dewa ?

Tujuan Penelitian

Tujuan umum

Ingin mengetahui efek pemberian Mahkota Dewa terhadap terjadinya limfositopenia pada sepsis.

Tujuan khusus

- Menilai perbedaan jumlah limfosit darah perifer pada individu yang terpapar lipopolisakarida (LPS) dengan yang tidak.
- Mengetahui perbedaan indeks apoptosis limfosit lien dan darah perifer pada individu yang terpapar lipopolisakarida (LPS) dengan individu yang terpapar lipopolisakarida (LPS) tetapi mendapat suplemen ekstrak Mahkota Dewa.

pelepasan Tumor Necrosis Factor (TNF- α) dan Interferon- γ (IFN- γ) oleh sel T-Helper. Polyphenol dalam Tanaman obat dilaporkan mempunyai kemampuan untuk menghambat aktivasi *Nuclear Factor Kappa B* (NF- κ B), suatu *transcription factor* yang berperan penting dalam regulasi molekul pembentukan sitokin. Pada penelitian yang dilakukan Tomita M dkk dari Ohio USA, dilaporkan bahwa sifat immunosupresif polyphenol terhadap TH1 CD4 adalah hambatan dalam ekspresi gen IL-2 dan IFN- γ .

Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) merupakan salah satu tanaman obat tradisional Indonesia yang masih belum memiliki acuan informasi yang lengkap baik dari segi farmakologi maupun fitokimia. Suatu penelitian awal terhadap ekstrak daging dan kulit biji *Phaleria macrocarpa* menunjukkan adanya kandungan zat aktif berupa alkaloid, terpenoid, saponin, dan senyawa polyphenol. Pengujian terhadap kadar toksisitas ekstrak tanaman juga telah dilakukan terhadap larva udang *Artemia Salina* Leach setelah diinkubasi selama 24 jam. Tanaman ini mempunyai efek mengurangi reaksi inflamasi tubuh dengan penurunan ekspresi gen TNF- α dan IFN- γ oleh sel T-Helper. Belum ditemukan studi *in vivo* yang membuktikan efek ekstrak *Phaleria macrocarpa* pada respon imunologis terutama pada sepsis.

Dengan latar belakang tersebut di atas kami ingin membuktikan bahwa pada keadaan sepsis akan terjadi limfositopenia dan Mahkota dewa, salah satu tanaman obat, dapat mengurangi penurunan jumlah limfosit.

Perumusan Masalah

- Apakah akan terjadi perbedaan jumlah limfosit darah perifer pada individu yang terpapar lipopolisakarida (LPS) dengan yang tidak ?
- Apakah akan terjadi perbedaan indeks apoptosis limfosit lien dan darah perifer pada individu yang terpapar lipopolisakarida (LPS) dengan individu yang terpapar lipopolisakarida (LPS) tetapi mendapat suplemen ekstrak Mahkota Dewa ?

Tujuan Penelitian

Tujuan umum

Ingin mengetahui efek pemberian Mahkota Dewa terhadap terjadinya limfositopenia pada sepsis.

Tujuan khusus

- Menilai perbedaan jumlah limfosit darah perifer pada individu yang terpapar lipopolisakarida (LPS) dengan yang tidak.
- Mengetahui perbedaan indeks apoptosis limfosit lien dan darah perifer pada individu yang terpapar lipopolisakarida (LPS) dengan individu yang terpapar lipopolisakarida (LPS) tetapi mendapat suplemen ekstrak Mahkota Dewa.

Manfaat penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menambah khasanah ilmu pada sepsis yang disertai penurunan jumlah limfosit

Bila diketahui Mahkota Dewa mempunyai efek mengurangi limfositopenia, maka tanaman obat ini diharapkan dapat dijadikan adjuvant pada terapi sepsis.

Penelitian ini diharapkan juga dapat dijadikan landasan penelitian selanjutnya.

6. *Masalah etika penelitian yang mungkin timbul* : masalah pemberian pakan dan cara pembunuhan hewan coba.
7. Penelitian ini dilakukan pada hewan coba
8. *Prosedur perlakuan* :
Delapanbelas ekor mencit strain Balb-C diadaptasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standard selama 1 minggu secara ad libitum.
Delapanbelas ekor mencit tersebut dikelompokkan ke dalam 3 kelompok perlakuan, pada kelompok K dan P1 tidak diberikan perlakuan apa-apa selama 3 hari. Pada Kelompok P2 diberikan Ekstrak Mahkota Dewa selama 3 hari. Pada hari ketiga semua mencit disuntik LPS intraperitoneal, diamati terjadinya sepsis. Bila tidak masuk dalam kriteria sepsis dieksklusi. Bila masuk dalam kriteria, maka setelah 6 jam diambil darah tepi mencit, dan mencit dianestesi dengan aether, selanjutnya dibunuh dengan dislokasi vertebra cervical, kemudian diambil jaringan liennya.
Perhitungan dosis Mahkota Dewa yang telah digunakan pada manusia yaitu 5 gram 1 x sehari, dikalikan konstanta uji terapi pada hewan coba (mencit) yaitu 0,0026 dikalikan konstanta hasil ekstrak 0,0055, sehingga dosis yang diberikan adalah $5000 \times 0,0026 \times 0,0055 = 0,0715 \text{ mg/hari}$ (0,36 mL).
9. Bahaya yang mungkin timbul adalah intoksikasi pada mencit, cara mengatasinya dengan penghentian pemberian dosis perlakuan.
10. *Pengalaman formal (peneliti sendiri atau orang lain) mengenai perlakuan yang akan dilakukan* :
Pengalaman dari PT. Mahkota Dewa, dengan dosis empirik yang sesuai dengan dosis di atas, yang diberikan kepada manusia, masih bisa diberikan.
11. *Bila penelitian ini dilakukan pada penderita, tunjukkan keuntungan-keuntungannya* :
-
12. *Bagaimana cara memilih penderita atau sukarelawan sehat* ?
-
13. *Bila penelitian ini dikerjakan pada manusia, jelaskan hubungan antara responden dan peneliti* :
-

14. *Bila penelitian ini dikerjakan pada penderita jelaskan cara diagnosis dan nama dokter yang bertanggungjawab mengobati :*
-
15. *Jelaskan registrasi yang dilakukan selama studi, termasuk penilaian efek samping dan komplikasi yang mungkin terjadi :*
-
16. *Bila penelitian dilakukan pada manusia jelaskan bagaimana cara menjelaskan dan mengajak untuk berpartisipasi :*
-
17. *Bila penelitian dilakukan pada manusia, berapa banyak efek samping yang mungkin dan cara mengatasinya :*
-
18. *Bila penelitian dilakukan pada manusia, apakah subyek diasuransikan?*
- Ya - Tidak
19. *Bentuk insentif bagi responden :*
Seharga ± : Rp

Semarang, 23 Juli 2007
Peneliti Utama,



dr. Abdul Hâris Malik

Telah diperiksa dan setuju untuk dilakukan penelitian

Reviewer

Komisi Etik Penelitian Kesehatan
FK Undip/RS.Dr. Kariadi
Ketua,

.....

.....



Gambar Sphygmomanometer Kent tail



UNIVERSITAS GADJAH MADA
PUSAT STUDI PANGAN DAN GIZI

SURAT KETERANGAN

Yang bertanda tangan di bawah ini menerangkan bahwa :

Nama : Dr. Abdul Haris Malik
Instansi : Bagian Bedah, Fakultas Kedokteran
Universitas Diponegoro
Semarang

Pada tanggal 20 September 2007 telah melakukan penelitian dengan menggunakan alat Kent Tail Spighmomanometer di Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 19 November 2007
Bagian Publik Servis,



Ratna Handayani
