

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL DAUN KETEPENG CINA (*Cassia alata*  
L.) TERHADAP JUMLAH LEUKOSIT DAN TITER ANTIBODI MENCIT  
(*Mus musculus*) YANG DIINFEKSI *Salmonella typhimurium***

**SKRIPSI**

Oleh:  
**RIADUN NI'MAH**  
NIM. 12620110



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2019**

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL DAUN KETEPENG CINA (*Cassia alata*  
L.) TERHADAP JUMLAH LEUKOSIT DAN TITER ANTIBODI MENCIT  
(*Mus musculus*) YANG DIINFEKSI *Salmonella typhimurium***

**SKRIPSI**

Oleh:  
**RIADUN NI'MAH**  
**NIM. 12620110**

diajukan Kepada:  
**Fakultas Sains dan Teknologi**  
**Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang**  
**untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam**  
**Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**JURUSAN BIOLOGI**  
**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**  
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM**  
**MALANG**  
**2019**

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL KETEPENG CINA (*Cassia alata* L.)  
TERHADAP JUMLAH LEUKOSIT DAN TITER ANTIBODI MENCIT  
(*Mus musculus*) YANG DIINFEKSI *Salmonella typhimurium***

SKRIPSI

Oleh:  
**RIADUN NI'MAH**  
NIM. 12620110

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:  
Tanggal: 04 Januari 2019

Pembimbing I



Kholifah Holil, M.Si  
NIP. 197511062009122002

Pembimbing II



Umaiyatus Svarifah, MA  
NIP. 19820925200912005

Mengetahui  
Ketua Jurusan Biologi

  
Romaidi, M.Si., D. Sc  
NIP.198102012009011019

PENGARUH EKSTRAK ETANOL DAUN KETEPENG CINA (*Cassia alata* L.) TERHADAP JUMLAH LEUKOSIT DAN TITER ANTIBODI MENCIT (*Mus musculus*) YANG DIINFEKSI *Salmonella thymiparium*

SKRIPSI

Oleh:  
RIADUN NI'MAH  
NIM. 12620110

telah dipertahankan  
di depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan diterima sebagai  
salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 4 Januari 2019

Penguji Utama	: Dr. drh. Hj. Bayyinatul M., M. Si (.....)	
Ketua Penguji	: Dr. Retno Susilowati, M. Si (.....)	
Sekretaris Penguji	: Kholifah Holil, M. Si (.....)	
Anggota Penguji	: Umayyatus Syarifah, MA (.....)	

Mengesahkan,  
Ketua Jurusan Biologi



Romaidi, M.Si., D. Sc  
NIP.198162012009011019

## HALAMAN PERSEMBAHAN

Karya sederhana ini saya persembahkan kepada:

1. Ayah Ach. Bisri dan Ibu Siti Rohmah selaku orang tua yang selalu mendoakan dan mendukung penulis demi kelancaran studi.
2. Seluruh Bapak Ibu guru yang pernah memberikan pengetahuan kepada penulis sehingga sampai pada titik ini.
3. Teman seperjuangan Biologi 2012 yang selalu mendoakan dan memberikan bantuan demi terselesaikannya penulisan karya tulis ini



## MOTTO

المُحَافَظَةُ عَلَى الْقَدِيمِ الصَّالِحِ وَالْأَخْذُ بِالْجَدِيدِ الْأَصْلَحِ

*“Memelihara khazanah lama yang baik dan mengambil pembaharuan yang lebih baik.”*



**PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Riadun Ni'mah  
 NIM : 12620110  
 Jurusan : Biologi  
 Fakultas : Sains dan Teknologi  
 Judul Penelitian : Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) terhadap Jumlah Leukosit dan Titer Antibodi Mencit (*Mus musculus*) yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 28 Desember 2018  
 Yang membuat pernyataan,



Riadun Ni'mah  
 NIM. 12620110

## PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

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



**Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) terhadap Jumlah Leukosit dan Titer Antibodi Mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *Salmonella typhimurium***

Riadun Ni'mah, Kholifah Holil, Umai'yatus Syarifah

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina terhadap jumlah leukosit dan titer antibodi mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Jenis penelitian ini adalah eksperimental yang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 4 ulangan. Hewan coba yang digunakan adalah mencit jantan galur *Balb/C* yang berumur 8-12 bulan dengan berat 20-30 gram. Penelitian ini dibagi menjadi 6 kelompok yakni kelompok normal (tanpa perlakuan), kontrol – (infeksi bakteri tanpa ekstrak), kontrol + (infeksi + antibiotik), kelompok D1 (infeksi + ekstrak dosis 42 mg/20g BB), kelompok D2 (infeksi + ekstrak dosis 84 mg/20g BB), kelompok D3 (infeksi + ekstrak dosis 168 mg/20g BB) selama 14 hari setelah dilakukan infeksi bakteri. Parameter dalam penelitian ini meliputi jumlah leukosit dengan metode apusan per 100 sel dan titer antibodi dengan metode Hemaglutinasi. Data yang memenuhi asumsi parametrik dianalisis dengan *One Way Anova* dan untuk hasil yang signifikan dilanjutkan ke uji BNJ  $\alpha = 5\%$  (leukosit) dan Duncan dengan  $\alpha = 5\%$  (titer antibodi). Hasil analisis *One Way Anova* menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun ketepeng cina berpengaruh terhadap peningkatan jumlah leukosit dan titer antibodi. Pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina dengan dosis 84 mg/20g BB merupakan dosis yang efektif dalam meningkatkan jumlah leukosit dan titer antibodi mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Kata kunci: *Salmonella typhimurium*, leukosit, titer antibodi, ketepeng cina

**Effect of Ethanol Extract of Ketepeng China Leaves (*Cassia alata* L.) on Leukocyte Amount and Antibody Titers of Mice (*Mus musculus*) infected with *Salmonella typhimurium***

Riadun Ni'mah, Kholifah Holil, Umayyatus Syarifah

**ABSTRACT**

This study aims to determine the effect of giving ethanol extract of ketepeng china leaves to the number of leukocytes and mice antibody titers infected with *Salmonella typhimurium*. This type of research was experimental using a completely randomized design (CRD) with 6 treatments and 4 replications. The experimental animals used were male strain Balb / C mice aged 8-12 weeks and weigh 20-30 grams. The study was divided into 6 groups: normal group (without treatment), control - (bacterial infection without extract), control + (infection + antibiotics), group D1 (infection + extract dose 42 mg / 20g BB), group D2 (infection + extract dose 84 mg / 20 g BB), group D3 (infection + extract dose 168 mg / 20 g BB) for 14 days after bacterial infection was carried out. The parameters in this study included the number of leukocytes with the smear method per 100 cells and antibody titers using the Hemagglutination method. Data that met parametric assumptions were analyzed by One Way Anova and for significant results continued to BNJ test  $\alpha = 5\%$  (leukocytes) and Duncan with  $\alpha = 5\%$  (antibody titers). The One Way Anova analysis results showed that the ethanol extract of ketepeng china leaves had an effect on the increase in the number of leukocytes and antibody titers. The administration of ethanol extract of ketepeng china leaves with a dose of 84 mg / 20 g BB is an effective dose in increasing the number of leukocytes and mice antibody titers infected with *Salmonella typhimurium*.

Keywords: *Salmonella typhimurium*, leukocyte, antibody titer, ketepeng china

تأثير استخراج أوراق الكاتيبينج الصينية (*Cassia alata L.*) على كمية الكريات البيضاء ومستويات الأجسام المضادة  
للفئران (*Mus musculus*) المصابة بـ *Salmonella typhimurium*

رياض النعمة ، خليفة خليل ، أمية الشريفة

### ملخص البحث

هدف هذا البحث هو معرفة إلى تأثير مستخرجات الإيثانول من أوراق الكاتيبينج الصينية على كمية الكريات البيضاء ومستويات الأجسام المضادة للفئران المصابة بـ *Salmonella typhimurium*. ونوع هذا البحث هو البحث التجريبي باستخدام تصميم عشوائي تمامًا (RAL) بـ ٦ معالجات و ٤ مكررات. والحيوانات التجريبية المستخدمة هي من ذكور فئران سلالة Balb/C التي أعمارهم ٨-١٢ شهرا وأوزانهم ٢٠-٣٠ غراما. وينقسم هذا البحث إلى ٦ مجموعات: المجموعة الطبيعية (بدون معالجة)، السيطرة - (العدوى البكتيرية بدون استخراج)، السيطرة + (العدوى + المضادات الحيوية)، مجموعة D1 (العدوى + جرعة مستخرجات ٤٢ مجم / ٢٠ جم BB)، مجموعة D2 (العدوى + جرعة مستخرجات ٨٤ مجم / ٢٠ جم BB)، مجموعة D3 (العدوى + جرعة مستخرجات ١٦٨ مجم / ٢٠ جم BB) لمدة ١٤ يوما بعد إجراء العدوى البكتيرية. ومعلمة هذا البحث تغطي كمية الكريات البيضاء باستخدام طريقة اللطاخة لكل ١٠٠ خلية ومستويات الأجسام المضادة باستخدام طريقة التراص الدموي. وتحليل البيانات التي يوتي افتراضات المعلمة بواسطة *One Way Anova* والحصول على النتائج الهامة بمواصلة تجريب  $\alpha = 5\%$  BNJ (الكريات البيضاء) و  $\alpha = 5\%$  Duncan (مستويات الأجسام المضادة). وأظهرت نتائج تحليل *Anova One Way* أن مستخرجات الإيثانول من أوراق الكاتيبينج الصينية كان لها تأثير على الزيادة في كمية الكريات البيضاء وفي مستويات الأجسام المضادة. وأظهرت أن إعطاء مستخرجات الإيثانول من أوراق الكاتيبينج الصينية بجرعة ٨٤ مجم / ٢٠ جم BB هو جرعة فعالة في زيادة كمية الكريات البيضاء ومستويات الأجسام المضادة للفئران بـ *Salmonella typhimurium*.

الكلمات المفتاحية: *Salmonella typhimurium*، الكريات البيضاء، مستويات الأجسام المضادة، الكاتيبينج الصيني

## KATA PENGANTAR

*Assalamualaikum Wr. Wb*

Puji syukur Alhamdulillah ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat, taufiq, dan hidayah-Nya sehingga kami dapat menyelesaikan penulisan skripsi. Judul penelitian ini “ Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) terhadap Jumlah Leukosit dan Titer Antibodi Mencit (*Mus musculus*) yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana (S.Si). Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan sahabat-sahabatnya yang telah mengawali upaya menegakkan cita-cita islam di muka bumi ini.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini telah mendapatkan banyak bantuan dan dorongan semangat dari berbagai pihak, oleh karena itu dengan segala kerendahan hati, penulis ingin mengucapkan banyak terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag selaku Rektor Universitas Islam Negeri(UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Romaidi, M.Si, D.Sc selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang.
4. Kholifah Holil, M.Si selaku dosen pembimbing jurusan biologi dan dosen wali yang telah memberikan bimbingan, arahan, saran ,memberikan waktu untuk membimbing penulis dan banyak memberikan saran dan motivasi selama perkuliahan sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
5. Umayyatus Syarifah, M.A, sebagai dosen pembimbing integrasi sains dan perspektif islam sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
6. Dr. Drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si dan Dr. Retno Susilowati, M.Si sebagai dosen penguji yang telah memberikan saran dan kritikan terbaiknya.

7. Segenap Dosen Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
8. Ayah Ach. Bisri dan Ibu Siti Rohmah yang telah memberikan kasihnya yang melimpah , mendidik penulis dengan luar biasa dengan ketulusan dan kesabaran. Semoga berkah dan rahmat Allah selalu menaungi mereka.
9. Teman-teman Biologi angkatan 2012 Biologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
10. Semua pihak yang telah banyak membantu penulis sehingga dapat terselesaikan dengan baik yang tidak dapat disebutkan satu-persatu.

Semoga Allah SWT memberikan balasan atas segala bantuan yang diberikan kepada penulis. Penulis berharap skripsi ini bisa memberikan manfaat bagi penulis khususnya dan bagi pembaca pada umumnya serta menambah khazanah ilmu pengetahuan. *Amin Ya Rabbal Alamin*  
*Wassalamu'alaikum Wr.Wb.*

Malang, 27 Desember 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERSETUJUAN .....	Error! Bookmark not defined.
HALAMAN PENGESAHAN .....	Error! Bookmark not defined.
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iv
MOTTO .....	v
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN .....	Error! Bookmark not defined.
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI .....	vi
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT .....	ix
ملخص البحث.....	x
KATA PENGANTAR .....	xi
DAFTAR ISI .....	xiii
DAFTAR TABEL .....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	<b>xvii</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	7
1.3 Tujuan Penelitian .....	7
1.4 Hipotesis .....	8
1.5 Manfaat Penelitian .....	8
1.6 Batasan Masalah .....	9
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>10</b>
2.1 Salmonella typhimurium.....	10
2.1.1 Klasifikasi .....	10
2.1.2 Morfologi .....	10
2.1.3 Patogenesis.....	11
2.2 Ketepeng Cina ( <i>Cassia alata</i> L.).....	16
2.2.1 Klasifikasi .....	16
2.2.2 Morfologi .....	17

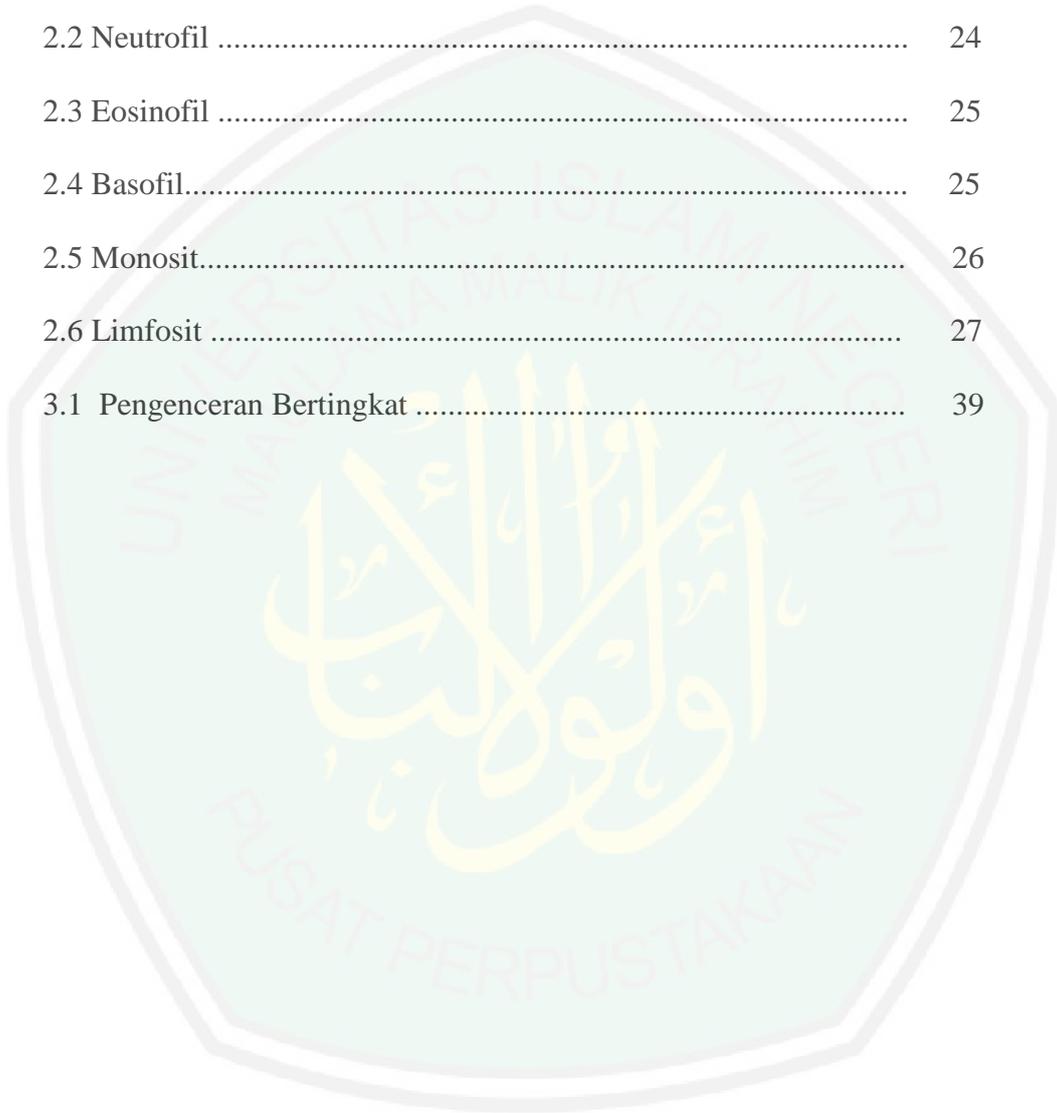
2.2.3 Kandungan .....	18
2.2.4 Kegunaan.....	21
2.3 Sel Darah Putih .....	23
2.4 Antibodi .....	27
2.5 Uji Hemaglutinasi .....	30
<b>BAB III. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>32</b>
3.1 Rancangan Penelitian.....	32
3.2 Waktu dan Tempat.....	32
3.3 Variabel Penelitian.....	32
3.4 Alat dan Bahan.....	33
3.5 Kegiatan penelitian .....	34
3.5.1 Ekstraksi sampel.....	34
3.5.2 Pembuatan suspensi Na CMC 0,5%.....	34
3.5.3 Penyiapan suspensi levamisol .....	35
3.5.4 Perhitungan dosis .....	35
3.5.5 Pemilihan dan Penyiapan Hewan Uji.....	35
3.5.6 Pembuatan suspensi antigen <i>Salmonella typhimurium</i> .....	36
3.5.7 Pembuatan suspensi Sel Darah Merah (SDM).....	36
3.5.8 Pengambilan Sampel Darah .....	37
3.5.9 Uji Hemaglutinasi .....	38
3.6 Analisa Hasil .....	39
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>41</b>
4.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina ( <i>Cassia alata</i> L.) terhadap Persentase Jumlah Leukosit Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) yang Diinfeksi <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> .....	41
4.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina ( <i>Cassia alata</i> L.) terhadap Titer Antibodi Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) yang Diinfeksi <i>Salmonella typhimurium</i> .....	49
<b>BAB V. PENUTUP</b> .....	<b>55</b>
5.1 Kesimpulan .....	55
5.2 Saran.....	55
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>56</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>61</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Pengaruh ekstrak etanol daun ketepeng cina ( <i>Cassia alata</i> L.) terhadap jumlah leukosit mencit ( <i>Mus musculus</i> ) yang diinfeksi <i>Salmonella typhimurium</i> .....	42
4.2 Hasil Uji <i>One Way Anova</i> pengaruh ekstrak etanol daun ketepeng cina ( <i>Cassia alata</i> L.) terhadap jumlah leukosit mencit ( <i>Mus musculus</i> ) yang diinfeksi <i>Salmonella typhimurium</i> .....	43
4.3 Hasil Uji Duncan dan BNJ 5% pengaruh ekstrak etanol daun ketepeng cina ( <i>Cassia alata</i> L.) terhadap jumlah leukosit mencit ( <i>Mus musculus</i> ) jantan yang diinfeksi <i>Saslmonella typhimurium</i> .....	44
4.4 Hasil uji <i>One Way ANOVA</i> 5% pengaruh ekstrak etanol daun ketepeng cina ( <i>Cassia alata</i> L.) terhadap titer antibodi mencit ( <i>Mus musculus</i> ) yang diinfeksi <i>Salmonella typhimurium</i> .....	51
4.5 Hasil uji Duncan 5% pengaruh ekstrak etanol daun ketepeng cina ( <i>Cassia alata</i> L.) berpengaruh terhadap titer antibodi mencit ( <i>Mus musculus</i> ) yang diinfeksi <i>S. typhimurium</i> .....	52

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Ketepeng Cina.....	17
2.2 Neutrofil .....	24
2.3 Eosinofil .....	25
2.4 Basofil.....	25
2.5 Monosit.....	26
2.6 Limfosit .....	27
3.1 Pengenceran Bertingkat .....	39



## DAFTAR LAMPIRAN

1. Alur Penelitian .....	61
2. Penentuan dan Perhitungan Dosis .....	62
3. Data Hasil Penelitian .....	63
4. Hasil Analisis SPSS .....	64
5. Gambar Penelitian .....	68



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara yang endemik penyakit demam tifoid. Rosinta (2014) mendata tingkat kematian yang disebabkan oleh demam tifoid tanpa menggunakan pengobatan mencapai 30% sedangkan tingkat kematian menurun hingga 0,5% dengan pemberian terapi. Sedangkan menurut Purba (2016) telah terjadi peningkatan jumlah kasus demam tifoid dari tahun ke tahun, dengan rata-rata mencapai 500 penderita per 100.000 penduduk setiap tahunnya dan diperkirakan mempunyai tingkat kematian 0,6-5%.

Spesies *Salmonella enterica serovar typhimurium* terdiri dari sekelompok bakteri gram negatif yang merupakan patogen penting bagi manusia dan hewan (Eisenstein, 1999). Sejumlah kecil serovar *Salmonella* dapat menyebabkan infeksi sistemik dan demam enterik. Demam tifoid pada manusia disebabkan oleh *S. typhi* dimana prototipe penyakit ini merupakan ancaman kesehatan bagi manusia (Pang, 1999). Bahkan Zaki dan Karande (2011) meninjau bahwa saat ini bakteri *S. typhi* ini mampu beradaptasi dengan *host* yang diinfeksi sehingga menjadi resisten terhadap berbagai jenis antibiotik yang biasa digunakan untuk mengobati penyakit ini. Hal ini menyebabkan terjadinya kegagalan terapi dan sakit yang parah. Dan dikatakan pula dua dekade terakhir telah terjadi *Multi Drug Resistant Typhoid Fever* (MDRTF).

Sunarno (2007) Bakteri *S. typhi* tidak menyebabkan efek patologik demam tifoid pada mencit sebagaimana pada manusia (*S. Typhimurium* pada mencit).

Penelitian ini menggunakan *S. typhimurium* sebagai antigen karena infeksi dari bakteri ini secara luas telah diterima sebagai model eksperimental untuk demam tifoid pada manusia.

Fase awal bakteri ini menginfeksi sistem pencernaan selanjutnya menyebar ke aliran darah (stadium bakterimia I dan II) (Handojo, 2003). Gambaran laboratorium pada demam tifoid yaitu pada pemeriksaan darah putih (leukosit) total terdapat gambaran leukopenia atau kekurangan leukosit. Selain itu dapat terjadi leukositosis atau keadaan jumlah leukosit normal dan limfositosis relatif dimana jumlah limfosit yang melimpah dalam darah. Kemudian eosinofilia, monositosis dan terjadinya trombositopenia yang ringan (Behrman, 2015). Leukopenia bisa terjadi karena depresi sumsum tulang oleh endotoksin dan mediator endogen yang ada dalam tubuh (Rosinta, 2014). Sedangkan leukositosis bisa terjadi walaupun tanpa disertai infeksi sekunder (Setiati, 2014).

Fase penyebaran ke aliran darah diikuti oleh fase beberapa hari dimana terjadi multiplikasi bakteri intraseluler dan peningkatan titer antibodi di limpa dan hati (Makela, 1997). Disebutkan oleh Richter (1997) yang perlu diketahui bahwa *S.typhimurium* dapat masuk dan bertahan hidup di sel fagositik dan nonfagositik. Pertumbuhan intraseluler sangat penting selama infeksi karena mutan yang gagal bertahan hidup di dalam sel inang sangat mudah untuk dimusnahkan secara in vivo. Mencit yang diinjeksi bakteri sekitar  $10^8$  tampaknya menjadi beban kritis untuk bertahan hidup dan tidak lagi mampu menahan infeksi sebagai akibatnya

mencit mengalami bakteremia sekunder, syok endotoksik dan kematian cepat terjadi.

Meskipun mekanisme bawaan sistem kekebalan sangat efektif dalam membatasi pertumbuhan awal *S.typhimurium* selama beberapa hari setelah infeksi, mekanisme ini bisa gagal untuk mencapai eliminasi bakteri secara steril dari inang. Hensel (1998) menyatakan bahwa lebih dari kegagalan tersebut, setelah penetasi dari usus ke jaringan yang lebih dalam bakteri ini berhasil beradaptasi dengan tekanan besar sistem imun bawaan. Adaptasi tersebut dengan cara mengekspresikan berbagai faktor virulensi yang meningkatkan ketahanannya terhadap mekanisme bakterisida inang. Kondisi ini akan mengganggu keseimbangan sistem dalam tubuh. Pada akhirnya hanya sistem respon limfosit spesifik yang memungkinkan mampu memberantas bakteri yang efektif dan memberikan peningkatan perlindungan terhadap pertemuan berikutnya dengan patogen ini.

Imunomodulator adalah senyawa tertentu yang dapat memberikan keseimbangan pada mekanisme pertahanan tubuh baik secara nonspesifik maupun spesifik (Mun'im dan Hanani, 2011). Pemakaian imunomodulator dilakukan dalam rangka untuk merangsang sistem imun (imunostimulator) agar memperbaiki fungsi sistem imun yang terganggu. Hal ini dimaksudkan untuk menekan atau mengurangi infeksi virus atau bakteri intraseluler dan mengatasi imunodefisiensi atau sebagai perangsang pertumbuhan sel-sel pertahanan tubuh dalam sistem imunitas (Block dan Mead, 2003). Tizard (2000) dalam bukunya

menyatakan bahwa bahan yang dapat menstimulasi sistem imun berperan dalam mengendalikan sistem imun baik pada sistem imunitas seluler maupun humoral.

Senyawa yang mampu membatu menstabilkan sistem imun dapat diperoleh dari tanaman. Pemanfaatan tanaman ini telah disebutkan oleh Allah SWT. dalam Al-Qur'an surat Qaaf ayat 7 sebagai berikut.

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَا فِيهَا رِوَاسِيَ وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ بَهِيجٍ (٧)

Artinya: "Dan Kami hamparkan bumi itu dan Kami letakkan padanya gunung-gunung yang kokoh dan Kami tumbuhkan padanya segala macam tanaman yang indah dipandang mata.

Shihab (2002) menjelaskan dalam kitabnya bahwa kata *bahij* berasal dari kata *bahaja* yang mengandung arti sesuatu yang indah warnanya dan menyenangkan. Selain aneka tumbuhan tersebut indah dipandang mata kata tersebut juga mengandung arti bermanfaat. Manfaat yang dimaksud bisa bermacam-macam, diantaranya yang terkait dengan metabolit sekunder yang dikandung. Pada tanaman ada berbagai metabolit sekunder yang bisa dimanfaatkan, salah satunya adalah sebagai imunomodulator. Oleh karena itu penyebutan kata *bahij* dalam ayat ini lebih membuktikan kuasa-Nya, sehingga mampu meningkatkan ketakwaan dan rasa syukur manusia kepada Sang Pencipta.

Tanaman yang berpotensi sebagai imunomodulator salah satunya adalah ketepeng cina (*Cassia alata* L.). Tanaman ini masih jarang digunakan untuk penelitian terkait imunomodulator. Penggunaan daun ketepeng cina dalam penelitian ini didasarkan pada potensi kandungan nutrisi dan bahan aktif yang dikandungnya. Secara teoritis ekstrak daun ketepeng cina mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, antrakinon (Kusmardi, 2007), terpen dan steroid (Sule,

2010). Kusmardi (2007) dalam penelitiannya menyatakan bahwa flavonoid dalam ekstrak daun ketepeng cina termasuk dalam senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai imunomodulator.

Beberapa penelitian telah dilakukan mengenai efek imunomodulator ekstrak daun ketepeng cina. Salah satunya adalah penelitian Chatterjee (2012) yang melaporkan jumlah makrofag peritoneal sebelum injeksi  $8 \pm 0.11$  per mm kubik darah meningkat menjadi  $25.0 \pm 0.10$  per mm kubik darah setelah 21 hari injeksi ekstrak daun ketepeng cina. Kusmardi (2007) memberikan ekstrak daun ketepeng cina per oral dengan dosis tinggi 168 mg kepada mencit yang diinfeksi suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* (SA). Hasilnya mampu meningkatkan aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag yaitu sebesar  $94,75\% \pm 1,26\%$ .

Selain itu Sagnia (2014) juga melakukan penelitian menggunakan tanaman ketepeng cina ini. Penelitiannya menunjukkan bahwa ketepeng cina berkhasiat sebagai antioksidan tertinggi dibandingkan dengan pepaya, ciplukan, dan belulang. Penelitian Jayasree (2016) menghasilkan kesimpulan bahwa petal ketepeng cina mempunyai beberapa aktivitas biologi seperti antitumor, anti inflamatori, analgesik, hipoglisemik dan antibakteri. Dan hasil investigasi, ketepeng cina juga berpotensi sebagai imunostimulan dari tanaman yang umum digunakan secara etnomedis.

Hasil uji secara *in vitro* dari flavonoid golongan flavon dan flavonol telah menunjukkan adanya respon imun (Hollman, 1996). Senyawa imunomodulator seperti flavonoid tersebut mampu menimbulkan induksi spesifik baik mekanisme pertahanan selular dan humoral. Hasil induksi hanya sedikit sekali atau bahkan

tidak ada kerja antigennya, namun sebagian besar bekerja sebagai mitogen (Arjana, 2016). Mitogen ini berperan memacu proliferasi limfosit secara nonspesifik. Awalnya makrofag teraktivasi oleh senyawa imunomodulator, dimana makrofag tersebut berfungsi menangkap, memakan, dan mencerna antigen eksogen, seluruh mikroorganisme, partikel tidak larut dan bahan endogen seperti sel pejamu yang cedera atau mati. Aktivasi makrofag selanjutnya dapat dipacu oleh sitokin yang dilepas oleh sel T pembantu (Th) seperti interleukin 4 (IL-4), IL-5, IL-6, IL-2 dan IFN- $\gamma$  yang semuanya memberikan kontribusi dalam pertahanan nonspesifik dan spesifik (Baratawidjaja, 2010).

Diagnosis demam tifoid dapat ditunjang dengan analisis keadaan leukosit pada sampel yang terinfeksi demam tersebut. Penelitian Lestarini (2008) menunjukkan jumlah leukosit mencit yang diinfeksi bakteri *S. typhimurium* mengalami leukositosis. Mencit yang diberi ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dengan dosis 250  $\mu\text{g/hr}$  mampu mengembalikan jumlah leukosit kembali normal. Berbeda dengan hasil penelitian Sunarno (2007) yang menunjukkan adanya penurunan jumlah neutrofil setelah diinfeksi bakteri *S. typhimurium*.

Selain pemeriksaan leukosit, diagnosis demam tifoid juga dengan adanya bakteri *S. typhimurium*. Hal ini dapat diketahui melalui antibodi spesifik bakteri dengan metode pengujian hemaglutinasi. Metode ini menggunakan pengenceran bertingkat untuk melihat adanya reaksi ikatan antigen *Salmonella typhimurium* dan antibodi dari serum mencit. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Yanti (2018) menunjukkan bahwa tikus yang diinfeksi *Salmonella typhi* mempunyai titer antibodi yang tinggi yang mengindikasikan demam tifoid akut. Kemudian

tikus diberi tarapi perlakuan menggunakan minyak atsiri temu putih (*Curcuma zedoria* Rosc.) selama 14 hari. Hasilnya adalah titer antibodi tikus menjadi turun sehingga berubah negatif demam tifoid.

Berdasarkan uraian diatas, peneliti beranggapan bahwa mencit yang terinfeksi *S. typhimurium* dapat mengganggu sistem imun mencit. Salah satu gangguan yang disebabkan infeksi tersebut adalah ketidakseimbangan jumlah leukosit dan titer antibodi. Pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) dapat berperan sebagai imunomodulator dalam mengembalikan jumlah leukosit dan titer antibodi mencit yang diinfeksi *S. typhimurium* menjadi seimbang atau sehat.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah ada pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap jumlah leukosit mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*?
2. Apakah ada pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap titer antibodi mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap jumlah leukosit mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap titer antibodi mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

#### 1.4 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini yakni sebagai berikut:

1. Ada pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap jumlah leukosit mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*
2. Ada pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap titer antibodi mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat diadakannya penelitian ini adalah sebagai berikut

1. Manfaat secara informatif dari penelitian ini diharapkan mampu menambah informasi tentang pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) sebagai alternatif terapi pada penyakit demam tifoid sehingga dapat digunakan sebagai dasar bagi peneliti selanjutnya yang ingin melakukan penelitian yang relevan.
2. Manfaat aplikatif dari penelitian ini diharapkan mampu digunakan sebagai bukti ilmiah bagi masyarakat tentang pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap penyakit demam tifoid.

## 1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit jantan *Balb/C* berumur 8-12 minggu dengan berat 20-30 gram
2. Antigen yang digunakan yaitu bakteri *Samonella typhimurium* yang diperoleh dari fakultas Mikrobiologi Brawijaya Malang dengan dosis  $10^7$  cfu sebanyak 100  $\mu$ l pada hari ke 8 setelah aklimatisasi.
3. Tanaman yang digunakan adalah ekstrak daun ketepeng cina (*Cassia alat* L.). Serbuk simplisia daun ketepeng cina didapat dari Materia Medika Batu yang diekstrak dengan menggunakan pelarut etanol 70% dengan metode maserasi.
4. Pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina diberikan secara sonde sebanyak 1 ml dengan dosis berikut ini:
  - a. Dosis I 63 mg/30g BB
  - b. Dosis II 126 mg/30g BB
  - c. Dosis III 252 mg/30g BB
5. Pemberian terapi dilakukan selama 14 hari
6. Parameter yang diamati adalah jumlah leukosit meliputi neutrofil, limfosit, eosinofil dan monosit serta titer antibodi
7. Penghitungan persentase jumlah leukosit menggunakan metode apusan darah per 100 sel leukosit
8. Titer antibodi diamati dengan menggunakan metode uji hemaglutinasi dimana masih terdapat suspensi pada pengenceran tertinggi

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Salmonella typhimurium*

#### 2.1.1 Klasifikasi

Menurut Tindall (2005) dalam *The National Center of Biotechnology International*, *Salmonella typhimurium* diklasifikasikan sebagai berikut ini:

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gamma Proteobacteria
Order	: Enterobacteriales
Family	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Salmonella</i>
Species	: <i>Salmonella typhimurium</i>

#### 2.1.2 Morfologi

*Salmonella* merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang yang termasuk dalam familia Enterobacteriaceae, genus Salmonellae. *Salmonella* bersifat motil dan patogenik dengan karakteristik pertumbuhan menghasilkan fermentasi glukosa, mereduksi nitrat menjadi nitrit, negatif oksidase, positif katalase, tidak membentuk spora, dan fakultatif aerobik (Irmawati, 2005).

*Salmonella typhimurium* memiliki gambaran mikroskopis yang sama seperti *Salmonella typhi*, yaitu bakteri basil gram negatif. Dosis infeksi bagi *S. typhi* adalah  $10^2$  hingga  $10^3$  sedangkan *S. typhimurium* membutuhkan dosis yang lebih besar yaitu lebih dari  $10^6$ . *Salmonella typhimurium* tumbuh pada

suasana erob dan fakultatif anaerob, pada suhu 15-410 °C dengan suhu pertumbuhan optimum 37,50 °C dan pH pertumbuhan 6-8. *Salmonella typhimurium* dapat tumbuh pada suhu optimum antara 35-430 °C (Kayser, 2005).

*Salmonella* dibagi menjadi 3 serovar berdasarkan antigen utama yang dimiliki, yaitu O (somatic), Vi (*capsular/surface*) dan H (flagellar). Membran sel tersusun atas kompleks molekul glikolipid yang dikenal dengan nama lipopolisakarida (LPS) atau endotoksin. Endotoksin terdiri dari 3 lapisan, yaitu *O-specific polysaccharide* di bagian luar, *core-polysaccharide* di bagian tengah dan lipid A di bagian dalam. Dengan struktur LPS yang demikian lengkap menjadikannya lebih resisten terhadap enzim yang memproses antigen, yaitu dengan cara memperlambat pemrosesan dan menghambat aktivasi epitop tertentu. Hal ini juga dapat merintangi aktivasi sel T, khususnya CD4 karena pada umumnya mereka lebih mengenali epitop peptida daripada polisakarida. Strain yang memiliki LPS lengkap juga resisten terhadap lisis komplemen jalur *membrane attack complex* (MAC) (Irmawati, 2005).

### 2.1.3 Patogenesis

*Salmonella typhimurium* merupakan bakteri yang menyebabkan penyakit demam tifoid pada hewan, akan tetapi menimbulkan efek patologik yang serupa dengan demam tifoid pada manusia (Sunarno, 2007). Pintu masuk utama *S.typhimurium* adalah sel M pada *peyer's patches*, bakteri akan bermigrasi menuju limfonodus mesenterikus dan bereplikasi disana. Selanjutnya dari *peyer's patches*, bakteri bergerak ke sirkulasi darah dan menimbulkan infeksi sistemik

(bakterimia transien). Saat terjadi bakterimia transier, patogen difagosit oleh makrofag, namun bakteri tidak dapat didegradasi oleh makrofag (Irmawati, 2005).

Menurut Irmawati (2005) perjalanan infeksi sistemik *Salmonella* ini dapat digambarkan dalam beberapa fase. Fase I terjadi sekitar 1 jam setelah diinfeksi secara intravena atau intraperitoneal. Lebih dari 90% kuman yang diinokulasi ditangkap dan dirusak oleh fagosit residen. Fase II dimulai sejak hari I infeksi yang disebut tahap pertumbuhan eksponensial. Kuman masuk ke dalam sirkulasi melalui pembuluh limfe melakukan invasi ke hepar dan limpa untuk selanjutnya melakukan multiplikasi. Neutrofil sangat penting pada fase ini sebagai pertahanan inang dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Fase III terjadi setelah 3-7 hari, pertumbuhan bakteri pesat di hati dan limpa serta menjadi pertumbuhan yang menetap. Makrofag yang teraktivasi memproduksi sitokin proinflamasi. Makrofag teraktivasi bukan untuk membunuh akan tetapi untuk meningkatkan killing sel NK dengan produksi sitokinnya. Fase pembersihan terjadi setelah minggu ketiga infeksi yang melibatkan imun adaptif khususnya sel T.

Beratnya infeksi pada demam tifoid sangat ditentukan oleh hubungan antara host dan mikroba. Tubuh mempunyai sistem imunitas, baik alamiah maupun adaptif, dalam mengatasi antigen asing yang masuk, seperti *S. typhimurium*. Peran fagosit dalam respon imunitas alamiah terhadap bakteri intraseluler kurang efektif, karena bakteri ini resisten terhadap enzim-enzim lisosom fagosit dan mempunyai kemampuan untuk menghindari dari proses killing fagosit, seperti mencegah fusi fagosom dan lisosom. Imunitas seluler

mempunyai peranan dalam pertahanan melawan penyakit infeksi terutama yang disebabkan oleh bakteri patogen intra seluler, jamur, virus dan protozoa (Abbas, 2003).

Proliferasi sel kupffer, limfosit, dan neutrofil muncul diantara sel-sel hepatosit yang disertai pembentukan fokal nodul typhoid. Infeksi Salmonella melibatkan limpa sehingga organ tersebut mengalami hiperplasia dan hipertropi, lunak dan membengkak akibat proliferasi limfosit di pulpa merah serta infiltrasi neutrofil dan makrofag ke dalam limpa. Aktivasi limfosit limpa disebabkan oleh respon imun dan peran makrofag serta sel NK dengan dikeluarkannya sitokin seperti  $IFN\gamma$  dan  $TNF\alpha$  (Irmawati, 2005).

Berbagai tahap infeksi *S. typhimurium* tercermin dalam berbagai mekanisme imun bawaan dan adaptif yang berkontribusi terhadap respon terhadap bakteri ini. Selama tahap awal, fagosit merupakan pusat pengendalian infeksi *Salmonella* dan kedua makrofag serta granulosit neutrofilik sangat penting untuk kelangsungan hidupmencit yang terinfeksi (Mosser, 1994). Fagositosis makrofag terhadap *S. typhimurium* ini ditingkatkan oleh serapan mediasi reseptor setelah opsonisasi *Salmonella* dengan antibodi atau komplemen. Namun, serapan bakteri bukanlah proses satu arah sederhana yang diarahkan oleh makrofag saja. Melalui sistem sekresi khusus (sistem sekresi tipe III), protein bakteri disuntikkan ke sel inang, memungkinkan *S. typhimurium* untuk mengganggu mesin pemberi sinyal (Richter, 1997). Interaksi ini dapat memaksa penyerapan *S. typhimurium* ke makrofag, meningkatkan kelangsungan hidup intraseluler patogen atau menyebabkan apoptosis makrofag. Mekanisme yang di satu sisi

memungkinkan kelangsungan hidup *S. typhimurium* di makrofag dan di sisi lain memungkinkan makrofag untuk menghancurkan patogen belum sepenuhnya sempurna.

Aktivasi makrofag oleh sitokin seperti interferon-g (IFN-g) atau tumor necrosis factor a (TNF-a) tampaknya merupakan prasyarat untuk penghancuran *S. typhimurium*. Kedua sitokin penting selama tahap awal infeksi *Salmonella* karena mereka terlibat dalam induksi mekanisme bakterisida di makrofag (Gulig, 1997). Mekanisme ini termasuk tidak hanya produksi oksigen reaktif dan intermediet nitrogen tetapi juga meningkatkan penanganan fagosom yang mengandung bakteri, membuat bakteri dapat diakses oleh molekul efektor litik dari lisosom. Faktor yang menentukan potensi makrofag untuk membunuh *S. typhimurium* adalah ekspresi molekul Nramp1 fungsional. Nramp1 adalah protein transmembran yang diekspresikan dalam makrofag dan secara struktural terkait dengan saluran kation. Kehadiran protein Nramp1 nonfungsional dalam galur mencit tertentu secara nyata mengurangi kemanjuran makrofag mereka untuk membunuh *S. typhimurium* yang mengakibatkan kerentanan tinggi terhadap infeksi (Govoni, 1999).

Bakteri *S. typhimurium* ini mempunyai peranan menguntungkan juga merugikan. Meskipun demikian Allah membahasnya dalam kitab suci Al-Qur'an. Allah telah berfirman mengenai penciptaan makhluk-makhluk kecil yang secara implisit dapat diartikan bahwa bakteri termasuk didalamnya, sebagaimana dijelaskan dalam surat Al-Baqarah (2) ayat 26 yang berbunyi:

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا فَأَمَّا الَّذِينَ آمَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ  
الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا وَيَهْدِي بِهِ كَثِيرًا وَمَا  
يُضِلُّ بِهِ إِلَّا الْفَاسِقِينَ (٢٦)

Artinya: “*Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka, tetapi mereka yang kafir mengatakan: "Apakah maksud Allah menjadikan ini untuk perumpamaan?". Dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah, dan dengan perumpamaan itu (pula) banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. Dan tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik*” (QS. Al-Baqarah: 26).

Menurut Shihab (2006) makna dari yang lebih kecil dibandingkan nyamuk adalah sesuatu yang lebih kecil bentuknya dibandingkan nyamuk. Seperti halnya bakteri, yang tidak bisa dilihat dengan mata telanjang dan hanya dengan bantuan mikroskop. Terkait perumpamaan tersebut, *S. typhimurium* merupakan bakteri patogen yang dapat menyebabkan penyakit meskipun ukurannya sangat kecil. Tampaknya ayat di atas sebagai jawaban terhadap orang yang mengingkari perumpamaan yang dibuat Allah Ta'ala menggunakan makhluk-makhluk yang kecil seperti nyamuk, padahal bukan pada tempatnya membantah hal tersebut, ia merupakan pengajaran Allah kepada hamba-hamba-Nya sekaligus sebagai rahmat-Nya yang seharusnya diterima dan disyukuri. Bagi orang-orang yang beriman, ketika mereka mengetahui hikmahnya bertambahlah ilmu dan iman mereka, kalau pun samar hikmahnya bagi mereka, mereka mengetahui bahwa perumpamaan itu adalah hak (benar), isinya hak meskipun secara rincinya mereka tidak mengetahui, karena mereka yakin bahwa Allah tidaklah membuat perumpamaan main-main, bahkan karena ada hikmah yang dalam di balik itu.

Mereka mengetahui hikmah Allah Ta'ala membuat perumpamaan dengan makhluk-Nya yang kecil maupun yang besar.

## 2.2 Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.)

### 2.2.1 Klasifikasi

Klasifikasi ketepeng cina (*Cassia alata* L.) berdasarkan *The National Center of Biotechnology Information* (2018) sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Fabales
Famili	: Fabaceae
Genus	: Senna
Spesies	: <i>Senna alata</i> L.

Ketepeng cina (*Cassia alata* L.) berasal dari daerah tropik Amerika Tengah, terutama daerah kepulauan Karibia, dengan nama *candle bush* karena bunganya. Tanaman ini disebut juga *ring worm tree* karena digunakan sebagai obat tradisional (Faruq, 2010). Jumlah tumbuhan ketepeng cina (*Cassia alata* L.) masih sekitar 600 spesies. Beberapa tersebar luas, terutama di negara-negara tropis seperti India. *Cassia alata*, *C. tora*, *C. siamea*, dan *C. fistula* adalah beberapa spesies yang sering diteliti (Sugita, 2014). Ketepeng cina (*Cassia alata* L.)arempunyai sebutan yang berbeda-beda di Indonesia, seperti ketepeng kebo (Jawa), ketepeng badak (Sunda), acon-aconan (Madura), sajamera (Halmahera),

kupang-kupang (Ternate), tabankun (Tidore), daun kupang, daun kurapan dan gelinggang gajah (Sumatra) (Hujjatusnaini, 2006).



Gambar 2.1 Tumbuhan ketepeng cina (Hujjatusnaini, 2006)

### 2.2.2 Morfologi

Ketepeng cina (*Cassia alata* L.) tumbuh pada daerah yang cerah dan lembab dan biasanya hidup pada dataran rendah sampai pegunungan dengan ketinggian 1.400 meter di atas permukaan laut. Ketepeng cina (*Cassia alata* L.) termasuk tumbuhan dikotilyang mempunyai sistem perakaran tunggang sistem perakaran tunggang ini umumnya berfungsi untuk memperluas bidang penyerapan dan memperkuat tegaknya batang (Hujjatusnaini, 2006).

Daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) berwarna hijau muda, lebar, jumlah pertangkai 5-14 pasang dan bagian pucuk merupakan bagian terbesar. Daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) berbentuk jorong sampai bulat telur sungsang, merupakan daun majemuk menyirip genap yang berpasang-pasangan sebanyak 5-12 baris, mempunyai anak daun yang kaku dengan panjang 5-15 cm, lebar 2,5-9 cm, ujung daunnya tumpul dengan pangkal daun runcing serta tepi daun rata. Pertulangan daunnya menyirip dengan tangkai anak daun yang pendek dengan panjang  $\pm 2$  cm dan berwarna hijau (Hujjatusnaini, 2006).

Bunga ketepeng cina (*Cassia alata* L.) merupakan bunga majemuk yang tersusun dalam tandan bertangkai panjang dan tegak yang terletak di ujung-ujung cabangnya dengan mahkota bunganya yang berwarna kuning terang. Buah ketepeng cina (*Cassia alata* L.) berupa polong-polongan yang gepeng panjang persegi empat dengan panjang  $\pm 18$  cm dan lebar  $\pm 2,5$  cm berwarna hitam. Buah ketepeng cina (*Cassia alata* L.) mempunyai sayap pada kedua sisinya dengan panjang 10-20 mm dan lebar 12-15 mm. Jika buah tersebut masak, maka pada kedua sisinya akan membuka atau pecah sehingga biji yang terdapat di dalam polong akan terlempar keluar. Biji yang dimiliki ketepeng cina berbentuk segitiga lancip dan berbentuk pipih yang berjumlah 50-70 biji pada setiap polongnya (Hujjatusnaini, 2006).

### 2.2.3 Kandungan

Daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) mempunyai kandungan penting seperti fenol, tanin, saponin, alkaloid, steroid, flavonoid, antarkuinon, *ellagitannin*, *phenolic acid*, *xanthone*, dan *purin* (Faruq, 2010). Sugita (2014) melakukan penelitian terhadap ekstrak metanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) yang diperoleh dari Tangerang, Indonesia. Senyawa kimia teridentifikasi adalah fenol, flavonoid, steroid atau triterpenoid, saponin, dan alkaloid. Dua komponen yang berhasil dikarakterisasi adalah senyawa fenol (methyl *p*-hydroxybenzoate) dan flavonoid yang dianggap sebagai pelargonidin 3-(feruloyl) diglucoside-5-(malonyl) glucoside.

Berdasarkan hasil skrining flavonoid yang dilakukan oleh Lumbessy (2013) menunjukkan bahwa dalam 1 g serbuk daun ketepeng cina positif

mengandung flavonoid. Hal ini diindikasikan dengan perubahan warna dari yang semula daun berwarna hijau muda menjadi merah. Kandungan total flavonoid dari hasil skrining tersebut dengan konsentrasi 50% adalah sebesar 26.8633 mg/mL. Sedangkan berdasarkan hasil analisis spektra dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS  $\lambda = 200-400$  nm dalam 200 ppm menunjukkan bahwa daun ketepeng cina mempunyai gelombang maksimum 205 nm. Hasil tersebut dapat dilihat pada pita I 330 nm dan pita II 276 nm positif mengandung flavonoid.

Istilah flavonoid diberikan pada suatu golongan besar yang berasal dari kelompok senyawa yang paling umum, yaitu senyawa flavon. Senyawa tersebut merupakan suatu jembatan oksigen terdapat diantara cincin A dalam kedudukan orto dan atom karbon benzil yang terletak disebelah cincin B. senyawa heterosoklik ini pada tingkat oksidasi yang berbeda terdapat dalam kebanyakan tumbuhan. Flavon adalah bentuk yang mempunyai cincin C dengan tingkat oksidasi paling rendah dan dianggap sebagai struktur induk dalam nomenklatur kelompok senyawa-senyawa ini (Manitto, 1981).

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa phenolik dengan struktur kimia  $C_6-C_3-C_6$ . Kerangka flavonoid terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen dan bentuk teroksidasi (Cheeke, 1989).

Sejumlah tanaman obat, termasuk berbagai tumbuhan yang digunakan pada pengobatan alamiah, menggunakan kandungan flavonoidnya. Dalam buku "Pharmazeutische Biologie"(Sneider) dikatakan bahwa setengah dari obat-obatan yang digunakan dalam pengobatan tradisional dan berhasil menyembuhkan adalah yang mengandung flavonoid. Sedangkan dalam "Drogenanalyse" terdapat daftar tumbuhan yang mengandung flavonoid yang telah digunakan secara terapeutik (Manitto, 1981). Studi mengenai struktur flavonoid telah menunjukkan bahwa satu jenis flavonoid dapat memberikan lebih dari satu respon, tergantung pada titik tangkap enzimnya, sehingga dengan adanya penyebaran efek tersebut, dapat mendukung flavonoid sebagai zat terapeutik baru untuk pengobatan penyakit (Manitto, 1981).

Cheeke (1989) menyatakan bahwa flavonoid merupakan senyawa golongan polifenol yang terdistribusi luas pada tumbuhan dalam bentuk glikosida yang berikatan dengan suatu gula, karena itu flavonoid termasuk senyawa yang bersifat polar. Pengambilan senyawa aktif seperti flavonoid ini dapat dilakukan dengan ekstraksi pelarut. Pemilihan pelarut yang digunakan harus sesuai dengan tingkat kepolaran. Pelarut polar yang biasa digunakan untuk ekstraksi flavonoid adalah metanol, aseton, etanol, air dan isopropanol. Penelitian ini menggunakan pelarut etanol 70%. Aldi (2013) menyatakan bahwa pelarut etanol merupakan pelarut yang mempunyai nilai toksisitas rendah dari pada pelarut lainnya. Etanol mampu melarutkan hampir semua zat (pelarut universal).

Flavonoid berpotensi bekerja terhadap limfokin yang dihasilkan oleh sel T sehingga akan merangsang sel-sel fagosit untuk melakukan respon fagositosis

(Kusmardi, 2007). Penelitian membuktikan bahwa secara laboratoris senyawa flavonoid dapat meningkatkan produksi IL-2 dan meningkatkan proliferasi dan diferensiasi limfosit sel T, sel B dan sel NK. Proliferasi limfosit yang terjadi akan mempengaruhi sel CD4, kemudian sel Th1 teraktivasi (Baratawidjaja, 2010).

#### 2.2.4 Kegunaan

Ketepeng cina telah lama digunakan sebagai obat tradisional, antara lain sebagai antiparasit, obat *laxative*, mengobati kurap, kudis, panu, eksem, malaria, sembelit, radang kulit bertukak, sifilis, herpes, influenza, *bronchitis* (Kusmardi, 2007). Daun ketepeng cina juga diakui sebagai obat untuk penyakit sembelit, hernia, intestinal parasitosis, blennorrhagia, sipilis, dan diabetes. Biji ketepeng cina digunakan sebagai antihelmintik (*anticacing*), akarnya digunakan untuk menyerang penyakit uterus, dan daun yang sudah hancur digunakan untuk mengobati infeksi kulit (Hujjatusnaini, 2006).

Masyarakat menggunakan daun ketepeng cina secara tradisional dengan cara digosokkan pada kulit yang sakit atau ditumbuk sampai lumat lalu ditempelkan pada kulit yang sakit (Hujjatusnaini, 2006). Ketepeng cina mempunyai aktivitas anti bakteri terhadap bakteri *bacillus* gram positif dan negatif, bakteri *cocci* gram positif seperti *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Methicilin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* dan *Streptococcus pyogenes* serta aktivitas antifungi pada *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* dan *Trichophyton rubrum* (Faruq, 2007).

Senyawa imunomodulator seperti flavonoid tersebut mampu menimbulkan induksi spesifik baik mekanisme pertahanan selular dan humoral. Hasil induksi hanya sedikit sekali atau bahkan tidak ada kerja antigennya, namun sebagian besar bekerja sebagai mitogen (Arjana, 2016). Mitogen ini berperan memacu proliferasi limfosit secara nonspesifik. Awalnya makrofag teraktivasi oleh senyawa imunomodulator, dimana makrofag tersebut berfungsi menangkap, memakan, dan mencerna antigen eksogen, seluruh mikroorganisme, partikel tidak larut dan bahan endogen seperti sel pejamu yang cedera atau mati. Aktivasi makrofag selanjutnya dapat dipacu oleh sitokin yang dilepas oleh sel T pembantu (Th) seperti interleukin 4 (IL-4), IL-5, IL-6, IL-2 dan IFN- $\gamma$  yang semuanya memberikan kontribusi dalam pertahanan nonspesifik dan spesifik (Baratawidjaja, 2010). Selain itu senyawa imunomodulator tersebut juga terbukti dari hasil penelitian Linda (2011) mampu meningkatkan produksi sitokin khususnya IL-2. Secara kalkulatif, otomatis kadar jumlah IL-2 bertambah. IL-2 ini mempunyai kepentingan dalam meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel B (Baratawidjaja, 2010).

Imunomodulator adalah zat yang dapat mengembalikan dan memperbaiki sistem imun yang fungsinya terganggu atau berlebihan. Imunomodulator membantu tubuh untuk mengoptimalkan fungsi sistem imun (Suhirman, 2013). Imunomodulator ini mempunyai beberapa fungsi seperti imunostimulator, imunorestorator dan imunosupresor. Imunostimulator yaitu sesuatu yang memperbaiki sistem imun dengan bahan yang meningkatkan fungsi dan aktivitas sistem imun (Block dan Mead, 2003). *Biological Response Modifiers* (BRMs)

adalah bahan-bahan yang dapat mestimulasi sistem imun berperan mengendalikan respon imun baik pada sistem imunitas seluler maupun humoral (Tizard, 2000).

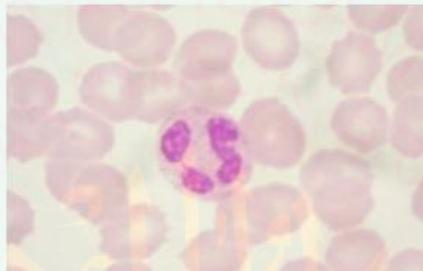
Imunorestorasi yaitu mengembalikan sistem imun yang terganggu dengan mengganti komponen sistem imun yang terganggu. Komponen-komponen yang digunakan dapat berupa ISG (*Imune Serum Globulin*) dan HSG (*Hyperimmune Serum Globulin*). Imunosupresi (*down regulation*) yaitu suatu tindakan untuk menekan respons imun. Kegunaannya di klinik terutama pada transplantasi untuk mencegah reaksi penolakan dan pada berbagai penyakit inflamasi yang menimbulkan kerusakan atau gejala sistemik, seperti autoimun atau auto-inflamasi (Baratawidjaja, 2010).

### **2.3 Sel Darah Putih**

Sel darah putih atau leukosit merupakan sel darah yang memiliki inti. Leukosit memiliki ukuran sel yang lebih besar, tetapi jumlah yang lebih sedikit dibandingkan dengan eritrosit (Bacha dan Bacha, 2000). Leukosit berfungsi sebagai sistem pertahanan tubuh terhadap agen infeksi yang cepat dan kuat (Cahyaningsih, 2007). Sistem pertahanan tersebut dilakukan dengan cara menghancurkan antigen melalui fagositosis atau pembentukan antibodi. Leukosit sebagian dibentuk di sumsum tulang dan sebagian di organ limfoid seperti kelenjar limfe, timus, dan tonsil, kemudian akan diangkut menuju bagian yang mengalami peradangan (Guyton dan Hall, 2006).

Leukosit dibagi menjadi dua kelompok yaitu granulosit yang terdiri dari neutrofil, eosinofil, basofil dan kelompok agranulosit terdiri dari monosit dan limfosit (Cahyaningsih, 2007). Neutrofil berperan dalam respon imun bawaan

(Fitria dan Sarto, 2014). Neutrofil memiliki masa hidup singkat yaitu sekitar 10 jam dalam sirkulasi. Granula pada neutrofil tidak bewarna, mempunyai inti sel yang terangkai (kadang terpisah), dan banyak terdapat granula pada protoplasmanya. Adanya peningkatan neutrofil dapat terjadi karena terjadinya stress akut (Handayani dan Haribowo, 2008).

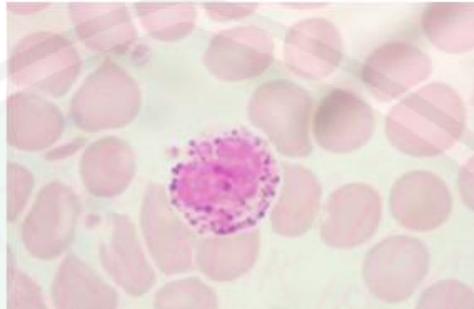


Gambar 2.2 Neutrofil  
Sumber: UC 2009

Adanya sel yang dirusak mikroba akan mengeluarkan sinyal kimiawi untuk memanggil neutrofil dari darah datang, memasuki jaringan yang terinfeksi dan menelan serta merusak mikrobia dalam sel tersebut. Ketika terdapat antigen maka neutrofil merupakan fagosit yang pertama datang, diikuti monosit yang berkembang menjadi makrofag besar dan aktif. Makrofag akan memfagositosis antigen dan produknya serta membersihkan sel-sel jaringan yang rusak dan sisa neutrofil yang dirusak dalam proses fagositosis tersebut (Campbell, 2004).

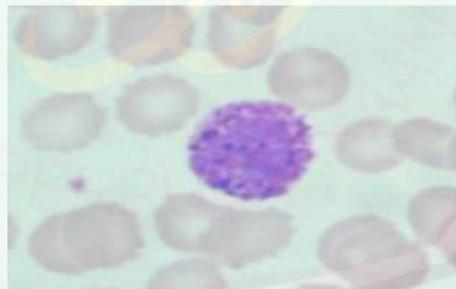
Eosinofil memiliki diameter antara 10-15  $\mu\text{m}$ . Nukleus eosinofil terlihat lebih kasar daripada neutrofil dan hanya memiliki dua sampai tiga lobus ketika dewasa. Eosinofil terdiri dari nukleus polimorfik yang sedikit padat dan bersegmen (Dellmann, 1998). Eosinofil dalam sistem pertahanan tubuh berperan pada reaksi alergi karena penyakit infeksius, dan parasit yang berukuran besar, seperti cacing. Eosinofil akan memposisikan dirinya melawan dinding eksternal

parasit dan melepaskan enzim-enzim perusak dari granula sitoplasmik. Sel eosinofil memiliki aktifitas fagositik yang terbatas (Campbell, 2004).



Gambar 2.3 Eosinofil  
Sumber: UC 2009

Basofil adalah jenis sel leukosit yang sangat jarang. Basofil memiliki nukleus yang kasar dan polimorfik. Sitoplasma dari sel ini memiliki banyak granula basofilik yang kasar. Sitoplasma besar dengan inti sel yang tidak begitu jelas terlihat dan berwarna biru tua sampai ungu (Dellmann, 1998).

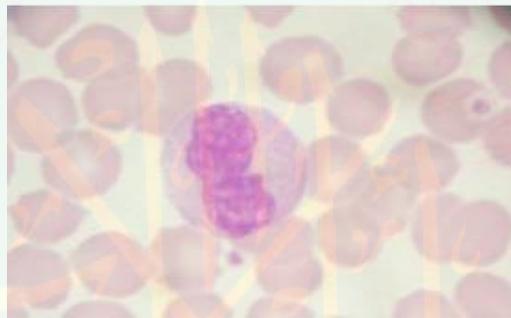


Gambar 2.4 Basofil  
Sumber: UC 2009

Granulosit seperti monosit, eosinofil, dan basofil jumlahnya sangat sedikit dalam kondisi normal, tetapi apabila terdapat antigen maka jumlahnya akan meningkat (Fitria dan Sarto, 2014). Monosit berukuran lebih besar daripada limfosit dengan memiliki inti sel berbentuk bulat atau panjang seperti ginjal. Monosit dibentuk di dalam sumsum tulang kemudian memasuki aliran darah,

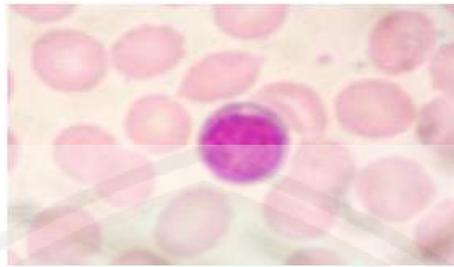
beredar sekitar 8 jam dan kemudian memasuki jaringan ikat, tempat sel ini mengalami pematangan menjadi makrofag yang berfungsi sebagai fagosit (Handayani dan Haribowo, 2008).

Monosit memiliki diameter rata-rata 16  $\mu\text{m}$  pada ulas darah. Monosit memiliki sitoplasma yang berlimpah (besar), dan berwarna sedikit basofilik. Warna nukleus tidak segelap nukleus pada limfosit, dan kromatin terlihat lebih samar dan berbentuk seperti tapal kuda ataupun ginjal (Campbell, 2004).



Gambar 2.5 Monosit  
Sumber: UC 2009

Limfosit berperan dalam respon imun adaptif (Fitri dan sarto, 2014). Terdapat dua jenis utama limfosit yaitu limfosit T (sel T) dan limfosit B (sel B) yang bersirkulasi dalam darah dan limfa. Kedua jenis limfosit tersebut melakukan respons pertahanan terhadap antigen yang berbeda tetapi saling melengkapi. Sel B akan mensekresi protein yaitu antibodi ketika terdapat antigen. Sel B dan sel T dapat mengenali antigen secara spesifik karena adanya reseptor antigen yang terikat pada membran plasma. Sel T umumnya bermigrasi ke kelenjar limfa perifer. Limfosit T dalam organ limfoid sekunder akan berkembang menjadi sel T *helper* (Th) atau T *cytotoxic* (Tc). Sel Th akan berinteraksi dengan antigen yang disajikan oleh APC (*Antigen Presenting Cell*) (Campbell, 2004).



Gambar 2.6 Limfosit  
Sumber: UC 2009

Profil darah merupakan gambaran kondisi fisiologis tubuh yang berkaitan dengan kesehatan, sehingga kondisi profil darah yang baik akan mendukung proses fisiologis tubuh yang lebih baik. Kondisi profil darah yang baik dapat ditandai dengan komponen darah yang berada dalam kisaran normal. Profil darah mempunyai dua komponen yaitu hematologi dan kimia darah. Hematologi lengkap (*complete blood count*) merupakan dasar untuk pengujian praklinis dan klinis serta menjadi persyaratan dasar dalam penilaian praklinis obat-obatan dan toksisitas (Fitri dan Sarto, 2014)

#### 2.4 Antibodi

Antibodi (imunoglobulin) adalah molekul glikoprotein yang tersusun atas asam amino dan karbohidrat. Secara sederhana molekul imunoglobulin dapat digambarkan menyerupai huruf Y dengan engsel (*hinge*). imunoglobulin mempunyai berat molekul antara 160.000 dan 970.000. Imunoglobulin sekitar 20% dari seluruh protein plasma yang terdiri dari kombinasi rantai polipeptida berat dan ringan (Guyton, 2010). Antibodi dikelompokkan menjadi lima subkelas berdasarkan perbedaan dalam aktivitas biologisnya (Sherwood, 2011):

1. Imunoglobulin M (IgM) berfungsi sebagai reseptor permukaan sel B untuk mengikat antigen dan disekresikan pada tahap-tahap awal respon sel

plasma. Makromolekul ini adalah suatu aglutinator antigen-antigen tertentu yang sangat efisien, seperti bakteri, sd darah merah dan dapat mengikat komplemen dengan tingkat efisien yang tinggi. Immunoglobulin ini diduga sangat penting pada hari-hari pertama respon imun primer. Bilamana antigen asing dikenalkan ke dalam hospes untuk pertama kalinya, sintesis antibodi IgM mendahului IgG. Namun kadar antibodi IgM mencapai puncaknya dalam beberapa hari, dan kemudian menurun lebih cepat dari kadar antibodi IgG (Bellanti, 1993).

2. Immunoglobulin G (IgG) merupakan Ig terbanyak dalam darah dan diproduksi dalam jumlah besar ketika tubuh kemudian terpajan ke antigen yang sama. Molekul ini mencapai konsentrasi yang berarti baik intravaskular maupun ekstrasvaskular dan mempunyai waktu paruh relatif lama (23 hari), dapat melintasi plasenta dan dapat mengaktifkan komplemen. Kelas immunoglobulin ini diduga membantu imunitas melawan beberapa agen infeksi yang disebarkan melalui darah seperti bakteri, virus, parasit dan beberapa jamur (Baratawidjaja, 2010).
3. Immunoglobulin E (IgE) berfungsi melindungi tubuh dari cacing parasit dan merupakan mediator antibodi untuk respon alergi umum, misalnya *hay fever*, asma, dan urtikaria
4. Immunoglobulin A (IgA) ditemukan dalam sekresi sistem pencernaan, pernapasan, dan kemih kelamin serta dalam air susu dan air mata. Baratawidjaja (2010) menambahkan bahwa meskipun IgA nomor dua dalam jumlah serum immunoglobulin, mempunyai peranan penting pada imunitas sistem sekretoris eksternal. Molekul-molekul IgA tidak mengaktifkan komplemen melalui cara klasik.

5. Imunoglobulin D (IgD) terdapat dalam serum dengan kadar yang sangat rendah. Hal tersebut mungkin disebabkan oleh karena IgD tidak dilepas sel plasma dan sangat rentan terhadap degradasi oleh proses proteolitik. IgD merupakan petanda dari diferensiasi sel B yang lebih matang dan juga 1% dari total imunoglobulin. IgD diduga dapat mencegah terjadinya toleransi imun, tetapi mekanismenya belum jelas (Baratawidjaja, 2010).

Antibodi dari kelima subkelas terdiri dari empat rantai polipeptida yang saling berkaitan-dua rantai panjang yang berat dan dua rantai pendek yang ringan yang tersusun membentuk huruf Y. Karakteristik bagian lengan dari Y menentukan spesifitas antibodi (yaitu, dengan antigen apa antibodi dapat berikatan). Sifat dari bagian ekor antibodi menentukan sifat fungsional antibodi (apa yang dilakukan antibodi setelah berikatan dengan antigen). Sebuah antibodi memiliki dua tempat pengikatan antigen identik, satu di masing-masing ujung lengan (Sherwood, 2011).

Antigen binding fragment (Fab, bagian pengikat antigen) ini bersifat unik untuk masing-masing antibodi, sehingga setiap antibodi hanya dapat berinteraksi dengan satu antigen yang secara spesifik cocok dengannya, seperti kunci dan anak kuncinya. Sangat beragamnya bagian pengikat antigen dari berbagai antibodi menyebabkan adanya antibodi unik dalam jumlah sangat besar yang dapat berikatan secara spesifik dengan jutaan antigen berbeda. Berbeda dengan bagian Fab di ujung lengan yang bervariasi ini, bagian ekor setiap antibodi dalam subkelas imunoglobulin yang sama bersifat identik. Bagian ekor atau disebut bagian konstan (Fc), mengandung tempat untuk mengikat mediator tertentu yang

aktivitasnya diinduksi oleh antibodi, yang berbeda-beda di antara berbagai subkelas antibodi (Sherwood, 2011).

## **2.5 Uji Hemaglutinasi**

Uji hemaglutinasi adalah metode yang digunakan untuk mengetahui aktivitas imunoglobulin dalam serum hewan coba setelah pemberian ekstrak. Pengujian terhadap serum darah hewan coba ini dilakukan dengan menambahkan antigen yang sama. Interaksi antara antigen dengan antibodi menyebabkan terjadinya reaksi sekunder, yaitu berupa aglutinasi atau presipitasi sebab antigen merupakan partikel-partikel kecil yang tidak larut. Gumpalan yang terbentuk antara antigen dan anti serum spesifik akan bersatu dan akhirnya mengendap sebagai gumpalan gumpalan besar dan mudah terlihat dengan cairan di atasnya tetap jernih. Hal ini terjadi karena pada umumnya antibodi memiliki lebih dari satu reseptor pengikat antigen sehingga antibodi bereaksi dengan molekul antigen lain yang mungkin sudah berikatan dengan salah satu molekul antibodi dan terbentuklah gumpalan (Bratawijaya, 2002).

Pengamatan aktivitas imunoglobulin dilakukan dengan melihat aglutinasi yang terjadi dan dihitung sebagai titer antibodi yaitu pengenceran tertinggi dari serum darah hewan coba yang masih menunjukkan reaksi aglutinasi positif pada sumur mikrotitrasi. Hasil akhir dari uji hemaglutinasi dapat ditentukan dengan melihat pola pengendapan sel darah merah pada dasar well plate. Apabila sel darah merah membentuk titik berwarna merah pada pusat sumur dan terlihat bening uji dinyatakan negatif. Sel yang teraglutinasi akan menyebar pada cairan di

dalam sumuran (Utami, 2012). Nilai titer selanjutnya ditransformasikan ke dalam rumus berikut ini (Rahmi, 2011):

$$[2 \log (\text{titer})+1$$



## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorium yang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari 6 perlakuan dan 4 ulangan, bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap jumlah leukosit dan titer antibodi mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Setiap kelompok perlakuan mempunyai cadangan sebanyak 2 ekor.

### **3.2 Waktu dan Tempat**

Penelitian dengan judul pengaruh ekstrak etanol daun ketepeng cina (*cassia alata* L.) terhadap jumlah leukosit dan titer antibodi ini dilaksanakan pada bulan September 2018. Penelitian ini dilakukan di beberapa tempat sebagai berikut:

1. Laboratorium Biokimia UIN Malang untuk pembuatan ekstrak ketepeng cina
2. Laboratorium Biosistematik UIN Malang untuk pemeliharaan hewan coba
3. Laboratorium Fisiolgi Hewan UIN Malang untuk tempat pengambilan sampel darah

### **3.3 Variabel Penelitian**

Variabel yang ada pada penelitian ini meliputi 3 jenis Variabel, yaitu:

- 1.) Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata*. L) dengan 3 dosis yang berbeda, perlakuan yang digunakan yaitu: 42 mg/20g BB, 84 mg/20g BB, 168 mg/20g BB, kontrol Larutan Na CMC 10 ml sebagai kontrol negatif (K-), kontrol positif (+) dan mencit normal (K0) tanpa perlakuan. Semua perlakuan diberikan selama 14 hari dengan menggunakan sonde
- 2.) Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah leukosit meliputi neutrofil, limfosit, eosinofil dan monosit serta titer antibodi
- 3.) Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah mencit digunakan adalah *Balb/C* yang berumur 8-12 minggu dengan berat badan 20-30 gram, kandang, pakan, cahaya dan suhu

### 3.4 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat destilasi vakum, *rotary evaporator*, botol maserasi, jarum suntik, gunting, timbangan hewan, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas ukur, kaca objek, plat tetes, lumpang dan alu, kandang mencit ad libitum, spuit 5 ml dan 10 ml. vial, spatel, sumur mikrotiter tipe U (*96 multiwellplate*), dan sentrifus.

Bahan-bahan yang digunakan antara lain adalah daun ketepeng cina, etanol 70%, aquades, NaCMC1%, sel darah merah 0,5% minyak emersi, methanol murni, pewarna Giemsa (D6 100-darstadt), Levamisol, larutan PBS (*Phospat Buffered Saline*), antigen *S. typhimurium*.

### 3.5 Kegiatan penelitian

Langkah-langkah yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

#### 3.5.1 Ekstraksi sampel

Metode ekstraksi dalam penelitian ini adalah metode maserasi menggunakan etanol 70% (DepKes RI *dalam* Aldi (2013)).

1. Dimasukkan 400 g serbuk simplisia daun ketepeng cina ke dalam botol maserasi 2 x 200 g.
2. Ditambahkan etanol 70% ke dalam botol maserasi sampai serbuk simplisia terendam.
3. Dibiarkan rendaman selama 6 jam kemudian diaduk dan didiamkan kembali selama 18 jam
4. Dipisahkan maserat dengan cara filtrasi. Prosedur ini diulangi sebanyak 2 kali dengan menggunakan jenis dan jumlah pelarut yang sama
5. Dikumpulkan semua maserat dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai mendapatkan ekstrak kental.
6. Ditimbang hasil rendaman kemudian dicatat beratnya

#### 3.5.2 Pembuatan suspensi Na CMC 0,5%

Pembuatan sediaan larutan Na CMC 0,5% yang dilakukan dalam penelitian ini mengacu pada Aldi (2014). Sediaan suspensi Na CMC 0,5% dibuat dengan memasukkan 50 mg Na-CMC ke dalam 10 ml aquades dingin.

Kemudian dihomogenkan perlahan-lahan larutan Na CMC selama  $\pm$  15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai gel.

### 3.5.3 Penyiapan suspensi levamisol

Departemen Kesehatan (1995) memberikan informasi tentang penggunaan dosis suspensi levamisol untuk mencit sebagai berikut:

1. Ditimbang tablet levamisol sebanyak 250 mg
2. Dimasukkan tablet ke dalam lumpang dan digerus
3. Ditambahkan serbuk ke dalam suspensi NaCMC 0,5% 10 ml
4. Dihomogenkan dan dituangkan ke dalam labu terukur 25 ml
5. Ditambahkan suspensi NaCMC 0,5% sampai batas tanda labu ukur 25 ml

### 3.5.4 Perhitungan dosis

Dosis yang digunakan untuk ekstrak etanol ketepeng cina adalah sebagai berikut (Kusmardi, 2007):

1. Dosis 1 yaitu  $42 \text{ mg}/20\text{g BB} = 63 \text{ mg}/30\text{g BB}$
2. Dosis 2 yaitu  $84 \text{ mg}/20\text{g BB} = 126 \text{ mg}/30\text{g BB}$
3. Dosis 3 yaitu  $168 \text{ mg}/20\text{g BB} = 252 \text{ mg}/30\text{g BB}$

### 3.5.5 Pemilihan dan Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit *Balb/C* berumur 8-12 minggu dengan berat 20-30 gram. Mencit berjumlah 24 ekor masing-masing dibagi ke dalam 6 kelompok perlakuan dan 4 ulangan. Pembagian kelompok yaitu perlakuan I mencit tanpa infeksi *S. typhimurium* dan tanpa ekstrak. Perlakuan II mencit diinfeksi dengan *S. typhimurium* dan larutan NaCMC

sebagai kontrol negatif. Perlakuan III mencit diinfeksi *S. typhimurium* dan suspensi antibiotik sebagai kontrol positif. Perlakuan IV mencit diinfeksi *S. typhimurium* dan ekstrak etanol ketepeng cina 42 mg/g BB. Perlakuan V mencit diinfeksi *S. typhimurium* dan ekstrak etanol ketepeng cina 84 mg/g B. Perlakuan VI mencit diinfeksi *S. typhimurium* dan ekstrak etanol ketepeng cina 168 mg/g BB. Sebelum digunakan untuk penelitian, ayam broiler terlebih dahulu disesuaikan dengan kondisi kandang (aklimatisasi) selama 1 minggu dengan diberi pakan dan minum yang cukup.

#### **3.5.6 Pembuatan suspensi antigen *Salmonella typhimurium***

Antigen yang digunakan adalah suspensi bakteri *S. typhimurium* yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang. Untuk dosis infeksi yang digunakan yaitu sebesar  $10^7$  cfu/ml sebanyak 100 $\mu$ l secara intraperitoneal. Infeksi bakteri ini dilakukan setelah proses aklimatisasi yaitu hari ke 8 sesuai dengan kelompok perlakuan.

#### **3.5.7 Pembuatan suspensi Sel Darah Merah (SDM)**

Pengujian hemaglutinasi ini dilakukan sesuai dengan prosedur dari Kresno (2004) sebagai berikut:

1. Dimasukkan darah merah sebanyak 3 mL dengan menggunakan *disposable syringe* volume 5 mL ke dalam tube volume 10 mL yang telah diisi dengan EDTA 3 mL
2. Disentrifugasi suspensi dengan kecepatan 1500 rpm

3. Dicuci sel darah merah dengan menambahkan *Phosphat Buffered Saline* (PBS) sebanyak 5 mL
4. Dibuang lapisan atas yang berupa plasma dan disisakan lapisan bawah yang berupa endapan sel darah merah domba dengan menggunakan pipet pasteur
5. Ditambahkan larutan PBS pH 7,2 sebanyak tiga kali volume SDM yang tersisa
6. Dibolak-balik beberapa kali tabung dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 1500 rpm sampai SDM tersuspensi secara homogen. Prosedur ini dilakukan kembali sampai plasma benar-benar jernih dan tidak berwarna.
7. Dibuang lapisan plasma yang jernih dan disisakan lapisan bawah yang berupa suspensi SDM 100%.
8. Ditambahkan PBS pada SDM 100% dengan volume sampai diperoleh suspensi SDM 50%
9. Ditambahkan 50 ml PBS sehingga diperoleh suspensi SDM 0,5%
10. Disimpan suspensi SDM 0,5% dalam tube volume 50 mL pada suhu 4°C

### **3.5.8 Pengambilan Sampel Darah**

Pengambilan sampel darah untuk penghitungan jumlah leukosit dan titer antibodi dilakukan pada hari ke 15 setelah infeksi dilakukan. Darah diambil dengan cara memotong ujung ekor mencit kemudian diulas di atas objek glass untuk pengujian jumlah leukosit. Sedangkan untuk pengujian titer antibodi darah

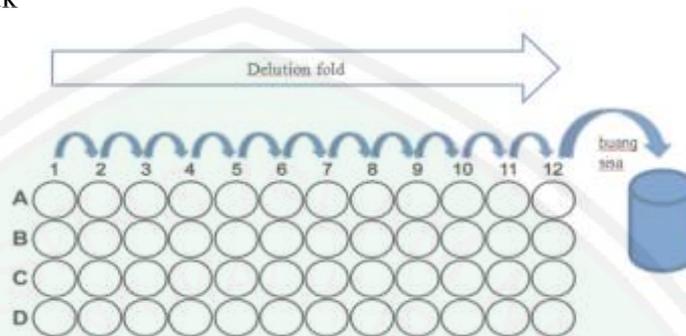
diambil dari intrakardiak menggunakan spuit 1 ml. Kemudian dibiarkan sampai darah menggumpal pada suhu kamar selama 2 jam. Selanjutnya serum dipindahkan ke dalam mikrotube.

### 3.5.9 Uji Hemaglutinasi

Pengujian hemaglutinasi ini dilakukan sesuai dengan prosedur dari Kresno (2004) sebagai berikut:

1. Diambil darah mencit secukupnya dengan menggunakan *disposable syringe* volume 5 ml melalui vena *brachialis*
2. Dibiarkan cuplikan darah menggumpal atau membeku pada suhu kamar selama 2 jam
3. Disentrifus cuplikan darah dengan kecepatan 300 rpm selama 10 menit kemudian diambil supernatan (serum)
4. Diencerkan serum secara bertingkat menjadi 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 dengan PBS sebanyak 50 µl untuk setiap sumur pada papan mikrotiter (gambar 3.1)
5. Ditambahkan 50 µl sel darah merah 0,5% ke dalam sumuran dan dihomogenkan
6. Ditambahkan 50 µl suspensi antigen *Salmonella typhimurium* pada setiap sumur
7. Diaduk rata (digoyang-goyang) selama 5 menit
8. Diinkubasi pada 37°C selama 60 menit dan didiamkan selama 24 jam pada suhu kamar.

9. Diamati pada sumuran dengan melihat pengenceran tertinggi dari serum darah mencit yang masih menunjukkan adanya aglutinasi yang terbentuk



Gambar 3.1 Pengenceran Bertingkat

Nilai titer antibodi ditentukan dari pengenceran tertinggi yang masih memperlihatkan terjadinya hemaglutinasi. Angka hasil pembacaan titer yang berupa deret ukur dikonversikan ke dalam deret hitung dengan rumus sebagai berikut (Sartini, 2011):

$$[2 \log (\text{titer})] + 1$$

### 3.6 Analisa Hasil

Data hasil penelitian ini diolah secara statistik dengan menggunakan ANOVA satu arah (*One-Way ANOVA*) pada taraf kepercayaan 95% ( $p < 0,05$ ). Uji ANAVA satu arah digunakan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Kemudian dilanjutkan dengan uji lanjut berdasarkan koefisien keragaman (KK). Koefisien keragaman mengacu pada Hanafiah (2016) sebagai berikut:

1. Jika KK besar (minimal 10% pada kondisi homogen atau minimal 20% pada kondisi heterogen), maka uji lanjut yang digunakan adalah uji Duncan, karena uji ini dikatakan paling teliti.

2. Jika KK sedang (antara 5-10% pada kondisi homogen atau 10-20% pada kondisi heterogen), maka uji lanjut yang digunakan adalah Beda Nyata Terkecil (BNT).
3. Jika KK kecil (maksimal 5% pada kondisi homogen atau maksimal 10% pada kondisi heterogen), maka uji lanjut yang dipakai adalah Beda Nyata Jujur (BNJ).



## **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

Penelitian tentang pengaruh ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) ini difokuskan pada potensi tanaman terhadap mencit (*Mus musculus*) jantan yang diinfeksi oleh bakteri *Salmonella typhimurium*. Parameter yang dilihat adalah jumlah sel darah putih (leukosit) dan titer antibodi. Hasil kedua parameter tersebut diuraikan di bawah ini:

### **4.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) terhadap Persentase Jumlah Leukosit Mencit (*Mus musculus*) yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium***

Penelitian ini untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap persentase jumlah jenis leukosit yaitu neutrofil, limfosit, eosinofil dan monosit mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Penghitungan jumlah leukosit ini dengan mengelompokkan masing-masing jenis leukosit (neutrofil, limfosit, eosinofil dan monosit) dalam 100 sel leukosit pada apusan darah di bawah pengamatan mikroskop cahaya dengan menggunakan perbesaran 10x40. Hasil rerata dari penghitungan masing-masing jenis sel leukosit disajikan pada tabel 4.1 berikut ini:

**Tabel 4.1** Pengaruh ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap jumlah leukosit mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*

Perlakuan	Rerata $\Sigma$ Leukosit (%) $\pm$ SD			
	Neutrofil	Limfosit	Eosinofil	Monosit
K0	21,00 $\pm$ 2,70	72,25 $\pm$ 1,70	3,75 $\pm$ 0,95	3,00 $\pm$ 0,15
K-	11,75 $\pm$ 8,30	81,25 $\pm$ 6,34	4,25 $\pm$ 1,70	2,75 $\pm$ 1,25
K+	19,25 $\pm$ 0,95	76,25 $\pm$ 2,98	2,50 $\pm$ 1,29	2,00 $\pm$ 1,41
D1	21,25 $\pm$ 2,75	72,75 $\pm$ 3,30	3,50 $\pm$ 1,29	2,50 $\pm$ 1,29
D2	17,25 $\pm$ 1,89	75,50 $\pm$ 2,64	3,75 $\pm$ 0,95	3,50 $\pm$ 1,00
D3	24,50 $\pm$ 1,29	71,25 $\pm$ 2,21	2,75 $\pm$ 0,96	1,50 $\pm$ 0,57
Jumlah	19,16 $\pm$ 5,31	74,87 $\pm$ 4,63	3,41 $\pm$ 1,24	2,54 $\pm$ 1,21

Keterangan: Perlakuan K0 (mencit tanpa perlakuan), K- (mencit diinfeksi *Salmonella typhimurium*), K+ (mencit diinfeksi *S. typhimurium* dan antibiotik), D1 (mencit diinfeksi *S. typhimurium* + ekstrak daun ketepeng cina 42mg/20g BB), D2 (mencit diinfeksi *S. typhimurium* + ekstrak daun ketepeng cina 84mg/20g BB), D3 (mencit diinfeksi *S. typhimurium* + ekstrak daun ketepeng cina 168mg/20g BB).

Tabel 4.1 menunjukkan bahwa rerata neutrofil pada perlakuan dosis yang paling tinggi pada perlakuan D3 kemudian diikuti dengan perlakuan D1 dan D2. Perlakuan D3 mempunyai rerata lebih tinggi daripada K-. Berbeda dengan limfosit dan eosinofil, dimana rerata yang paling tinggi terdapat pada perlakuan K-. Perlakuan dosis pada limfosit, eosinofil dan monosit mempunyai urutan dari yang terkecil yaitu D3, D1 dan yang rerata yang terbesar terdapat pada D2. Rerata monosit yang paling rendah yaitu pada perlakuan D1 karena jauh lebih rendah dari pada K0.

Data masing-masing jenis leukosit mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan diberi ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) diuji normalitas *kolmogorov-smirnov* dan homogenitas (lampiran 4) menunjukkan bahwa semua data berdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dan homogen ( $p > 0,05$ ) (lampiran 4). Oleh karena itu data dapat dianalisis parametrik menggunakan uji *One Way*

ANOVA ( $p < 0,05$ ). Hasil pengujian *One Way ANOVA* pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina terhadap jumlah leukosit disajikan pada tabel 4.2 berikut ini:

**Tabel 4.2** Hasil Uji *One Way Anova* pengaruh ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap jumlah leukosit mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*

Jenis Leukosit	F Hitung	Sig.
Neutrofil	5,058	0,005*
Limfosit	4,323	0,009*
Eosinofil	1,178	0,358
Limfosit	1,547	0,225

Keterangan \*: berbeda nyata

Pengujian tersebut menunjukkan signifikansi  $< 0,05$  (lampiran 2) pada neutrofil dan limfosit sehingga dapat disimpulkan bahwa hipotesis 0 ( $H_0$ ) ditolak dan hipotesis 1 ( $H_1$ ) diterima. Artinya ada pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap persentase limfosit dan neutrofil mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Sedangkan nilai signifikansi eosinofil dan monosit  $> 0,05$  (lampiran 2) yang mempunyai arti  $H_0$  diterima dan  $H_1$  ditolak (tidak ada pengaruh pemberian ekstrak etanol ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap persentase eosinofil dan monosit).

Setelah diketahui terdapat pengaruh pada neutrofil dan limfosit maka diuji lanjut untuk mengetahui perbedaan pengaruh pada setiap perlakuan. Uji lanjut yang digunakan berhubungan dengan nilai koefisien keragaman (KK). Nilai KK neutrofil sebesar 20,21 (besar) maka uji lanjut yang digunakan adalah uji Duncan. Hal ini didasarkan pada pernyataan Hanafiah (2016) bahwa apabila KK besar yaitu lebih dari 10% (homogen) atau lebih dari 20% (heterogen) maka sebaiknya menggunakan uji lanjut Duncan. Uji Duncan ini merupakan uji yang

mempunyai tingkat ketelitian yang tinggi. Sementara nilai KK limfosit kecil yaitu 4,72 maka sebaiknya diuji lanjut dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) sebagaimana Hanafiah (2016) yang menyatakan bahwa nilai KK yang kecil jika pada kondisi homogen maksimal pada 5% dan heterogen maksimal pada 10% maka uji lanjut yang digunakan adalah BNJ.

Hasil dari uji lanjut menjelaskan perbedaan nyata atau tidak pada setiap perlakuan. Berikut ini tabel hasil uji Duncan 5% untuk parameter neutrofil dan uji BNJ 5% untuk limfosit:

**Tabel 4.3** Hasil Uji Duncan dan BNJ 5% pengaruh ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap jumlah leukosit mencit (*Mus musculus*) jantan yang diinfeksi *Saslmonella typhimurium*

Uji Duncan 5%		Uji BNJ 5%	
Perlakuan	Rerata Neutofil (%) dan Notasi	Perlakuan	Rerata Limfosit (%) dan Notasi
K-	11,75 a	D3	71,25 a
D2	17,25 ab	K0	72,25 a
K+	19,25 bc	D1	72,75 a
K0	21,00 bc	D2	75,50 ab
D1	21,25 bc	K+	76,25 ab
D3	24,50 c	K-	81,25 b

Keterangan: huruf yang berbeda pada kolo yang sama menunjukkan perbedaan nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf 5%

Uji Duncan 5% pada tabel 4.2 menunjukkan bahwa D2 tidak berbeda nyata dengan perlakuan K+, K0, dan D1 akan tetapi berbeda nyata dengan perlakuan D3 dan K-. Begitu juga perlakuan K- berbeda nyata dengan perlakuan D3. Sedangkan hasil uji BNJ 5% menunjukkan bahwa rerata perlakuan K- berbeda nyata dengan perlakuan D3, akan tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan K+ dan D2. Begitu juga dengan perlakuan D3 yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan K0, D1, D2 dan K+.

Pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) berpengaruh terhadap persentase jumlah neutrofil dan limfosit mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Perlakuan K- mempunyai nilai rerata terendah dibandingkan dengan perlakuan yang lain yaitu 11,75%. Nilai ini mendekati batas normal minimum dari jumlah neutrofil mencit jantan. Hal ini sesuai dengan yang disebutkan oleh Handojo (2003) bahwa nilai fisiologi darah mencit jenis neutrofil mempunyai kisaran normal antara 6-40%. Apabila jumlah neutrofil kurang dari batas tersebut maka kemungkinan tubuh mencit mengalami neutropenia. Berhman (2015) berpendapat bahwa terjadinya penurunan jumlah sel neutrofil di dalam sirkulasi pada hewan disebabkan karena adanya peningkatan destruksi sel neutrofil.

Penurunan jumlah neutrofil tersebut kemungkinan karena peningkatan pengeluaran neutrofil ke dalam jaringan tanpa diimbangi oleh pemasukan neutrofil baru ke dalam sirkulasi darah serta penurunan produksi sel neutrofil baru di sumsum tulang belakang (Berhman, 2015). Berdasarkan hal itu perlakuan D3 menunjukkan peningkatan jumlah neutrofil. Adanya infeksi bakteri *Salmonella typhimurium* pada mencit menyebabkan proses produksi neutrofil terganggu sehingga terjadi ketidakseimbangan. Setelah pemberian ekstrak etanol ketepeng daun ketepeng cina dengan dosis 85 mg/g BB dan 168 mg/g BB mampu meningkatkan jumlah neutrofil. Akan tetapi dosis yang efektif untuk meningkatkan jumlah neutrofil mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* adalah dosis 168 mg/g BB mencit. Hasil penelitian ini sama dengan penelitian

yang dilakukan oleh Sunarno (2007) yang menunjukkan adanya penurunan jumlah neutrofil setelah diinfeksi bakteri *S. typhimurium*.

Sedangkan pada parameter limfosit, perlakuan K- mempunyai rerata paling tinggi dibandingkan dengan semua kelompok perlakuan yaitu sebesar 81,25%. Hal ini mengindikasikan adanya infeksi karena jumlah limfosit melebihi batas normal. Linden (2011) beranggapan bahwa limfosit termasuk jenis leukosit yang dominan pada sebagian besar mencit sehat. Jumlah limfosit normal itu dalam kisaran antara 70%-80% dari jumlah diferensial sel darah putih. Jumlah limfosit mencit yang diinfeksi bakteri *Salmonella typhimurium* pada hari ke 14 masih dalam keadaan tinggi.

Berbeda dengan perlakuan D2 yang mempunyai rerata yang mendekati rerata perlakuan K0 dan K+. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun ketepeng cina mampu meningkatkan jumlah limfosit. Peningkatan ini kemungkinan disebabkan oleh senyawa flavonoid yang terdapat dalam ekstrak etanol daun ketepeng cina tersebut. Menurut Kurnianingtyas (2013) flavonoid mempunyai kemampuan yang dapat mengatur aktifitas sel limfosit untuk berproliferasi.

Perlakuan D3 mempunyai rerata yang lebih rendah dibandingkan dengan K0, meskipun masih dalam rentang jumlah limfosit yang normal. Hal ini bisa dikarenakan dosis yang terlalu besar sehingga menurunkan jumlah limfosit dalam darah. Cheeke (1989) menyatakan bahwa senyawa dalam tanaman mampu meningkatkan dan juga menurunkan jumlah limfosit dalam darah. Apalagi

senyawa antibakteri apabila berada dalam tubuh hewan terlalu lama dapat menurunkan daya tahan tubuh.

Mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* kemudian diberi perlakuan antibiotik levamisol menunjukkan rerata yang lebih besar dari D2 mendekati perlakuan K-. Hal ini menunjukkan bahwa K+ kurang efektif dalam memperbaiki jumlah limfosit. Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian Parsad (1999) yang membuktikan bahwa levamisol berperan dalam meningkatkan imunitas tubuh baik selular maupun humoral. Levamisol termasuk salah satu obat cacing yang berfungsi untuk mendukung sistem imunitas seluler dalam menanggapi serangan antigen. Mencit yang diberi perlakuan K+ pada hari pertama pemberian antibiotik mengalami kematian sebanyak 1 ekor. Hal ini membuktikan bahwa hasil semua perlakuan dipengaruhi oleh kondisi fisik tubuh mencit dalam memberikan respon terhadap antibiotik.

Penelitian Parlinaningrum (2014) menunjukkan hasil pada mencit yang diinfeksi *S. typhimurium* dan diberi perlakuan ekstrak sirih merah (*Piper crocatum*) menunjukkan mampu meningkatkan proliferasi limfosit mencit dibanding dengan kontrol normal. Limfosit salah satu sel target dari imunomodulator karena mempunyai peran sebagai induktor paraimunitas terutama membantu dalam menstimulasi mekanisme pertahanan seluler. Pertahanan seluler inilah yang bertugas membasmi antigen yang masuk ke dalam tubuh. Proliferasi limfosit mampu ditingkatkan oleh senyawa flavonoid yang terdapat dalam tumbuhan sebagaimana penelitian yang telah dilakukan oleh Saifulhaq (2009).

Senyawa flavonoid yang diperoleh dari daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) ini dapat merangsang peningkatan sel limfosit, baik limfosit T maupun B. Selain itu, limfosit bisa meningkat dari ambang batas normal dikarenakan adanya pajanan antigen sehingga merangsang limfosit untuk berganda lebih cepat (Kurnianingtyas, 2013). Veerachari (2012) menyatakan bahwa senyawa flavonoid yang terdapat dalam tanaman mampu memberikan efek imunostimulan pada manusia dan hewan. Flavonoid mampu meningkatkan produksi sel interferon dan aktivitas sel NK. Interferon dapat membantu dalam presentasi antigen dan memiliki peranan dalam imunitas humoral. Peran imunoregulasi dari interferon adalah kemampuannya dalam mempromosi fase inaktif dari respon imun. IFN terlibat dalam pembentukan dan presentasi peptida antigenik dipermukaan sel dan juga mempunyai kemampuan yang unik dalam meregulasi ekspresi molekul MHC kelas II, sehingga dapat meningkatkan respon dari sel limfosit ThCD4+ (Wiedosari, 2007).

Induksi ekspresi molekul MHC kelas II oleh IFN terjadi berbagai macam sel, diantaranya sel fagosit mononuklear, sel endotel dan sel epitel. IFN menghambat ekskresi molekul MHC kelas II di permukaan sel B yang bersifat IL-4- dependent dan memegang peran kunci dalam pemrosesan antigen intraseluler menjadi bentuk peptida antigenik sebelum diekskresikan ke permukaan sel bersama molekul MHC. Modifikasi aktivitas proestom, yaitu suatu subunit kompleks enzim yang bertanggung jawab atas proses terjadinya peptida yang kemudian berikatan dengan molekul MHC kelas 1 (Wiedosari, 2007).

Selain flavonoid masih banyak lagi senyawa yang juga membantu dalam proses perbaikan sistem tubuh. Pemanfaatan tanaman ini telah disebutkan oleh Allah SWT. dalam Al-Qur'an surat Ar-Ra'du ayat 4 sebagai berikut.

وَفِي الْأَرْضِ قِطْعٌ مُتَجَوِّرَةٌ وَجَنَّتْ مِّنْ أَعْنَابٍ وَزَرْعٌ وَنَخِيلٌ صِنَوَانٌ وَغَيْرُ صِنَوَانٍ يُسْقَى بِمَاءٍ وَوَاحِدٍ وَنُفْضَلٌ بَعْضُهَا عَلَى بَعْضٍ فِي الْأُكُلِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ (٤)

Artinya: “Dan di bumi ini terdapat bagian-bagian yang berdampingan, dan kebun-kebun anggur, tanaman-tanaman dan pohon korma yang bercabang dan yang tidak bercabang, disirami dengan air yang sama. Kami melebihkan sebahagian tanam-tanaman itu atas sebahagian yang lain tentang rasanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berfikir”.

Shihab (2006) menjelaskan bahwa sungguh terdapat tanda-tanda kekuasaan Allah bagi kaum yang menggunakan akalnyanya. Orang yang memperhatikan bermacam-macam bentuk, warna, baunya dan kandungan seperti metabolit sekunder di belahan tanah yang berdekatan. Padahal disirami dengan air yang sama dan sama pula sarana pertumbuhannya. Hal ini memastikan bahwa semua itu menunjukkan adanya pembuat Yang Maha Kuasa.

#### **4.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) terhadap Titer Antibodi Mencit (*Mus musculus*) yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium***

Infeksi bakteri *Salmonella typhimurium* mempunyai kemampuan dalam menginduksi aktivasi sel T khususnya CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>. Sel T CD4<sup>+</sup> ini berfungsi untuk membantu aktivasi dan diferensiasi sel B dan membantu dalam proses pembentukan sel T CD8<sup>+</sup> spesifik *Salmonella* (Lee, 2008). Kondisi ini menyebabkan peningkatan titer antibodi yang tidak seimbang. Oleh karena itu

tubuh memerlukan sesuatu yang mampu memperbaiki sistem imun yang terganggu tersebut.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap titer antibodi mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Pengukuran titer antibodi mencit pada penelitian ini menggunakan metode hemaglutinasi dengan serum mencit. Penentuan hemaglutinasi titer antibodi bertujuan untuk mengetahui respon imun humoral tubuh mencit dalam melawan bakteri *S. typhimurium*. Berdasarkan pernyataan Mulyaningsih (2007) pengamatan terjadinya hemaglutinasi bisa diketahui apabila terdapat suspensi pada sumuran berarti menunjukkan terjadinya reaksi antigen dan antibodi. Nilai titer hemaglutinasi sebanding dengan jumlah antibodi. Hasil pengujian hemaglutinasi titer antibodi mencit yang diinfeksi *S. typhimurium* setelah ditransformasikan ke dalam rumus sebelumnya disajikan dalam lampiran (3).

Berdasarkan lampiran 3 tersebut dapat dilihat bahwa perlakuan K- menunjukkan interpretasi hasil titer aglutinasi berindikasi kuat demam tifoid pada hari ke 15. Tingginya titer antibodi ini kemungkinan disebabkan oleh infeksi *S. typhimurium*  $10^7$  cfu. Menurut Kayser (2005) dosis infeksi *S. typhi* adalah  $10^2$  hingga  $10^3$ , sedangkan pada *S. typhimurium* membutuhkan dosis yang lebih besar yaitu lebih dari  $10^6$  sehingga infeksi yang ditimbulkan menjadi sistemik. Patimah (2015) mengatakan bahwa titer 1/32 itu sudah mendukung kuat diagnosis demam tifoid. Hal ini juga disampaikan oleh Menteri Kesehatan tahun 2006 meskipun sebenarnya belum ada kesepakatan terkait nilai titer patokan untuk demam tifoid

ini. Namun kebanyakan pendapat menjadikan titer 1/32 sebagai patokan untuk diagnosis demam tifoid.

Data dari pengenceran yang masih membentuk suspensi mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan diberi ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) diuji normalitas *kolmogorov-smirnov* dan homogenitas (lampiran 4) menunjukkan bahwa semua data berdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dan homogen ( $p > 0,05$ ) (lampiran 1). Oleh karena itu data dapat dianalisis parametrik menggunakan uji *One Way ANOVA* ( $p < 0,05$ ). Hasil pengujian *One Way ANOVA* pada taraf 5% pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina terhadap titer antibodi disajikan pada tabel 4.4 berikut ini:

**Tabel 4.4** Hasil uji *One Way ANOVA* 5% pengaruh ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap titer antibodi mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*

SK	db	JK	KT	F	Sig.
Perlakuan	5	6,791	1,358	20,577	0,000*
Galat	18	1,188	0,066		
Total	23	7,979			

Keterangan \*: berbeda nyata

Tabel 4.3 menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) berpengaruh terhadap titer antibodi mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *S. typhimurium* ( $p < 0,05$ ) (Lampiran 4). Hasil uji tersebut menyatakan terdapat pengaruh maka selanjutnya data diuji lanjut dengan Duncan 5%. Pengujian lanjut ini didasarkan pada Hanafiah (2016) yang menyarankan agar diuji lanjut Duncan karena melihat nilai KK yang besar yaitu 14,51. Berikut hasil pengujian Duncan 5% pengaruh ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata*

L.) berpengaruh terhadap titer antibodi mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *S. typhimurium*:

**Tabel 4.5** Hasil uji Duncan 5% pengaruh ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) berpengaruh terhadap titer antibodi mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *S. typhimurium*

Perlakuan	Rerata Titer Antibodi ( $\mu\text{l}$ ) $\pm$ SD	Notasi
K0	2,35 $\pm$ 0,30	a
D3	2,65 $\pm$ 0,30	a
D1	3,11 $\pm$ 0,34	b
K+	3,26 $\pm$ 0,30	b
D2	3,41 $\pm$ 0,00	b
K-	4,01 $\pm$ 0,00	c

Keterangan: huruf yang berbeda pada kolo yang sama menunjukkan perbedaan nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf 5%

Tabel 4.4 menunjukkan perlakuan K0 mempunyai pengaruh yang berbeda nyata dengan perlakuan D1, K+, D2 dan K- dimana K- mempunyai rerata yang paling tinggi. Tingginya nilai titer antibodi ini menandakan adanya infeksi bakteri *Salmonella typhimurium* yang berarti dalam darah mencit. Sedangkan perlakuan D1 tidak berbeda nyata dengan perlakuan K+ dan D2. Sementara ketiga perlakuan tersebut berbeda nyata dengan kelompok perlakuan K-. Perlakuan K+ mempunyai selisih rerata yang kecil dengan perlakuan D2. Hal ini menunjukkan bahwa D2 lebih baik dari K+ dalam meningkatkan titer antibodi mencit yang diinfeksi *S. typhimurium*.

*Salmonella typhimurium* ini dapat bertahan hidup di sel fagositik maupun nonfagositik. Perlakuan K- nilai titer sangat tinggi karena bakteri sudah memasuki wilayah humoral. Hal ini bisa dilihat dari suspensi yang terakhir yang terbentuk yaitu pada pengenceran ke 1/32. Disebutkan oleh Mulyaningsih (2007) bahwa peningkatan respon humoral bisa dibuktikan dengan adanya peningkatan titer

antibodi yang mengindikasikan peningkatan kepekaan sel T dan sel B yang terkait dengan produksi antibodi. Berbeda dengan perlakuan D2 dan K+, nilai titernya tinggi dengan selisih yang kecil antara keduanya.

Perbaikan nilai titer antibodi ini kemungkinan disebabkan oleh adanya senyawa dalam ekstrak etanol daun ketepeng cina tersebut. Perlakuan dosis dalam penelitian ini mampu memperbaiki sistem imun. Fenomena ini telah dicatat Allah SWT dalam Al Qur'an surat Al-Infithor ayat 6-8 berikut ini:

يَا أَيُّهَا الْإِنْسَانُ مَا غَرَّبَكَ بِرَبِّكَ الْكَرِيمِ (٦) الَّذِي خَلَقَكَ فَسَوَّاكَ فَعَدَلَكَ (٧) فِي أَيِّ صُورَةٍ مَا شَاءَ رَكَّبَكَ (٨)

Artinya: *“Hai manusia, apakah yang telah memperdayakan kamu (berbuat durhaka) terhadap Tuhanmu yang Maha Pemurah, yang telah menciptakan kamu lalu menyempurnakan kejadianmu dan menjadikan (susunan tubuh)mu seimbang. Dalam bentuk apa saja yang Dia kehendaki, Dia menyusun tubuhmu”*. (QS. Al-Infithor: 6-8)

Kata seimbang pada ayat tersebut bersifat universal dimana bisa diartikan sebagai keseimbangan dalam hal formasi tubuh, metabolisme dan fungsi-fungsinya. Akan tetapi yang perlu diperhatikan adalah penciptaan Allah pada tubuh manusia ini sudah diatur sedemikian rupa agar mampu menjalankan perintah dan menjauhi larangannya. Tubuh manusia pada awalnya disempurnakan kemudian apabila dikemudian waktu mendapati kerusakan (demam tifoid) maka sudah kewajiban kita berusaha mengembalikan kepada kondisi semula. Meskipun perlakuan D3 dengan dosis paling besar akan tetapi belum memberikan efek yang bagus. Sedangkan perlakuan D2 dengan dosis sedang, mampu memperbaiki nilai titer antibodi.

Senyawa flavonoid adalah agen lipofilik yang dapat berinteraksi dengan lipid membran dan dapat mempengaruhi respon sel imun (Brown dan Hormaeche,

1989). Salah satu respon imun yang terpengaruhi adalah antibodi. Antibodi berpartisipasi dalam perlindungan terhadap *S. typhimurium* dan pada mencit yang resisten. Antibodi saja cukup untuk mengendalikan bakteri ganas. Pada mencit yang rentan, di mana infeksi dengan *S. typhimurium* yang mematikan memberatkan tantangan yang lebih besar pada sistem kekebalan, antibodi berpartisipasi dalam kontrol tetapi perlindungan bergantung pada mekanisme tambahan (Mittrucker, 2000). Mekanisme tambahan ini bisa berasal dari tanaman yang mempunyai potensi sebagai imunomodulator. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Yanti (2018) menunjukkan bahwa tikus yang diinfeksi *Salmonella typhi* mempunyai titer antibodi yang tinggi yang mengindikasikan demam tifoid akut. Kemudian tikus diberi terapi perlakuan menggunakan minyak atsiri temu putih (*Curcuma zedoria* Rosc.) selama 14 hari. Hasilnya adalah titer antibodi tikus menjadi turun sehingga berubah negatif demam tifoid. Yanti (2018) menyatakan perbaikan sistem imun tersebut disebabkan oleh adanya senyawa dalam minyak atsiri temu putih.

## **BAB V PENUTUP**

### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Ada pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap jumlah leukosit mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *Salmonella typhimurim* kecuali eosinofil dan monosit.
2. Ada pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap titer antibodi mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*

### **5.2 Saran**

Berdasarkan hasil penelitian ini perlu dilakukan penelitian lanjut:

1. Penelitian yang menggunakan dosis ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata*L.) yang lebih bervariasi dengan pemberian terapi yang bervariasi. Misalnya seperti perlakuan mencit yang hanya diberi perlakuan ekstrak tanpa infeksi *S. typhimurium*.
2. Penelitian untuk melihat kadar titer antibodi mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan diberi perlakuan ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) secara molekuler. Titer antibodi sebelum dan setelah diinfeksi *S. typhimurium* penting untuk diamati sebagai pembandingan kontrol normal dengan perlakuan lainnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- [UC] University of Cincinnati Clermont College. 2009. *Histology of Circulatory System*. [terhubung berkala]. [http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/Labs/Anatomy\\_&\\_Physiology/A&P203/Circulatory\\_System/Circulatory\\_Sys\\_Histology.htm](http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/Labs/Anatomy_&_Physiology/A&P203/Circulatory_System/Circulatory_Sys_Histology.htm) [28 Jun 2018].
- Abbas, A.K. 2003. *Cellular and Molecular Immunology*. Fifth Edition Philadelphia: Saunders.
- Aldi, Y. 2013. Uji Efek Anti Anafilaksis Kutan Aktif dari Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) pada Mencit Putih Jantan. *Jurnal Farmasi Higea*. 5 (2): 186-197.
- Anonim, 2018. NCBI Taxonomy Homepage: *Cassia alata* L. txid53923 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Cassia%20alata> (diakses tanggal 5 Januari 2019)
- Arjana, A.A. Gde dan Budiasa, K. 2016. *Peran Imunomodulator dalam Mengaktifkan Respon Imun terhadap Infeksi Virus*. Denpasar: FKH Universitas Udayana
- Bacha, L.M dan Bacha, W.J. 2000. *Color Atlas of Veterinary Histology*. Ed ke-2. New York (US). Lippincot Williams & Wilkins
- Baratawidjaja, K.G & Rengganis, I. 2006. *Imunologi Dasar* Edisi 8. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Baratawidjaja, K.G & Rengganis, I. 2010. *Imunologi Dasar* Edisi 8. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Behrman, Kliegman., & Jenson. 2015. *Nelson Textbook of Pediatrics 17th Edition*. India: Saunders.
- Bellanti J.A. 1993. *Imunologi III, Diterjemahkan oleh Samik Wahab*: Cetakan I. Yogyakarta: Gajah Mada University Press. hal 96 -125, 186.
- Block, K.I. and M.N. Mead. 2003. Immune system effects of Echinacea, Ginseng and Astragalus: A review. *Integrative cancer therapies*. 2(3): 247 – 267.
- Brown, A. dan Hormaeche, CE. 1989. The antibody response to salmonellae in mice and humans studied by immunoblots and ELISA. *Microb. Pathog.*6, 445–454.
- Cahyaningsih, U., Malichatin H, dan Hediando YE. 2007. *Diferensial Leukosit pada Ayam setelah diinfeksi Eimeria tenella dan Pemberian Serbuk Kunyit (Curcuma domestica) Dosis Bertingkat*. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. IPB: Bogor
- Campbell, K. L. dan Campbell, J. R. 2004. *Companion Animals Their Biology, Care, Health and Mangement Second Edition*. London: Pearson Prentice Hall. Pp: 10-63.
- Chatterjee, S. 2013. An Over on The Ethnophytopathological Studies of *Cassia alata* – an Important Medicinal Plant and The Effect of VAM on its Growth and Productivity. *International Journal of Research in Botany*. 2(4): 13-19.
- Cheeke, P. R. 1989. *Toxicants of Plants Origin*, Volume IV. Phenolics. CRC Press.
- Dellmann, HD, Jo Ann Eurell. 1998. *Textbook of Veterinary Histology*. Carrol Cann, editor. Lippincott Williams & Wilkins.

- Eisenstein, TK. 1999. Pertahanan Kekebalan Mukosa Mencit: *Salmonella typhimurium*. Dalam *Vaksin Vaksin Bakteri Intraseluler* (Y. Paterson, ed.) New York: Wiley-Liss, 51–109.
- Faruq, Z.U., 2010. Antibacterial Activity of The Active Component of *Cassia alata* (Linn) Leaves. *Nigerian Journal of Basic and Applied Science*. 18(1):97-100.
- Fitria, L. dan Sarto, M., 2014. Profil Hematologi Tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) Galur Wistar Jantan dan Betina Umur 4, 6, dan 8 Minggu. *Biogenesis* 2(2): 94-100. ISSN 2302-1616.
- Govoni, G., Canonne-Hergaux, F., Pfeifer, CG, Marcus, SL, Mills, SD, Hackam, DJ, Grinstein, S., Malo, D., Finlay, BB, Gros, P. 1999. Functional expression of Nramp1 in vitro in the murine macrophage line RAW264.7. *Infect. Immun.* 67, 2225–2232.
- Gulig, PA, Doyle, TJ, Clare-Salzer, MJ, Maiese, RL, Matsui, H. 1997. Systemic infection of mice by wild-type but not Spv- *Salmonella typhimurium* is enhanced by neutralization of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* 65, 5191–5191.
- Guyton, Arthur. 2010. *Buku ajar fisiologi kedokteran*. Jakarta. EGC. Hal 556-562.
- Hanafiah, K. A. 2016. *Rancangan Percobaan: Teori dan Aplikasi*. Jakarta: Rajawali Press
- Handojo, I. 2003. *Imunoasai Dasar*. Universitas Airlangga Press, Surabaya.
- Hensel, M., Shea, JE, Waterman, SR, Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, FC, Holden, DW. 1998. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol. Mikrobiol.* 30, 163–174.
- Hollman, J.P. 1996. *Heat Transfer Sixth Editon*. Singapore: Mc.Graw Hill, inc.
- Hujjatusnaini, N. 2006. Uji Potensi Ekstrak Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata*) Terhadap Penghambatan Pertumbuhan *Trichophyton* sp. *Skripsi*. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan. Universitas Palangka Raya.
- Irmawati I, Tjahjono, Dharmana E. Pengaruh jus Aloe Vera terhadap proliferasi limfosit, produksi reactive oxygen intermediate dan koloni kuman organ hepar mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. 2004. *M Med Indones.*;39:195-202.
- Jayasree, R. 2016. Immunomodulatory effect of *Cassia alata* Petals in *Garra rufa* (Doctor Fish). *Journal of Chemical and Pharmaceutical* 9 (1): 215-218
- Kayser, F.H. dan Bienz, K.A. 2005. *Medical Microbiology*. New York: Stuttgart Thieme.
- Kresno, S.B. 2004. *Imunologi Diagnosis dan Prosedur Laboratorium Edisi IV*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Hal. 4-5, 11-12, 15-16, 44-47, 53-54, 408-409.
- Kurnianingtyas, E. 2013. Aktivitas Imunomodulator *Polyscias obtusa* terhadap Sistem Imunitas pada Bone Marrow Broiler setelah Pemberian *Salmonella typhimurium*. *J.Exp. Life Sci.* 3 (1): 25-30

- Kusmardi. 2007. Efek Imunomodulator Ekstrak Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Makrofag. *MAKARA KESEHATAN*. Vol 11 (2)
- Lee, J.H., Wang, C.J., Kuo, H.C., Chou, F.P., Jean, L.F., Tseng, T.H., 2008. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicol Appl Pharmacol*. 203(2):124–31.
- Lestarini, A.I. 2008. Pengaruh Pemberian *Phyllanthus niruri* L. terhadap Respon Imunitas Seluler Mencit yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Thesis. Program Pascasarjana Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
- Linda K, Widyarti S. 2011. Pengaruh pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap peningkatan jumlah sel T CD4+ dan CD8+ pada timus mencit (*Mus musculus*) (laporan penelitian). Universitas Brawijaya. h.24-26.
- Linden M, Ward JM, Cherian S. 2011. Hematopoietic and lymphoid tissues, p 309–338 In: Trueting PM, Dintzis SM, editors. Comparative anatomy and histology: a mouse and human atlas. Amsterdam (the Netherlands): Elsevier.
- Lumbessy, M. 2013. Uji Total Flavonoid pada Beberapa Tanaman Obat Tradisional di Desa Waitina Kecamatan Mangoli Timur Kabupaten Kepulauan Sula Provinsi Maluku Utara. *Jurnal MIPA Unsrat Online* 2 (1) 50-55.
- Makela, PH, Hormaeche, CE. 1997. Kekebalan terhadap salmonella. *Respon terhadap Patogen Intraseluler* (SHE Kaufmann, ed.), Austin, TX: RG Landes 143–166.
- Manitto, P. 1981. *Biosynthesis of Natural Product*, Sames, P. G. (trans). Ellis Horwood limited. New York, Chichester, Brisbane, Toronto.
- Mittrucker, H. 2000. Role of B lymphocytes in protective immunity against *Salmonella typhimurium* infection. *J. Immunol*. 164, 1648–1652.
- Mosser, DM. 1994. Receptors on phagocytic cells involved in microbial. *Immunol. Semin*. 60, 99–114.
- Mulyaningsih, S. 2007. Aktivitas Imunostimulan Ekstrak Etanol Daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) pada Mencit. *Logika*. 4(1): 41.
- Mun'im, A., dan Hanani, E. 2011. *Fitoterapi Dasar*. Jakarta: Dian Rakyat.
- Pang, T., Levine, MM, Ivanoff, B., Wain, J., Finlay, BB. 1998. *Tifus demam masalah-masalah penting masih tetap ada*. *Tren Mikrobiol*. 6, 131–133.
- Parlinaningrum, D., et al. 2014. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol *Annona muricata* terhadap Peningkatan Jumlah B220 pada *Mus musculus*. *Jurnal Biotropika*. Vol. 2 No. 5
- Parsad, D., Saini, R., Negi, K.S. 1999. Comparison of Combination of Cimetidine and with Cimetidine Alone in the Treatment of Recalcitrant Warts. *Australas J Levamisole Dermatol*, 40 : 93-5 (abst.)
- Patimah, Kusumawarti, E. 2015. Pengaruh Air Rebusan Cacing Tanah terhadap Titer Antibodi, Jumlah Leukosit dan Jenis Leukosit Mencit yang diinfeksi *Salmoella typhimurium*. *Bioprospek* 10 (2) h. 7-14

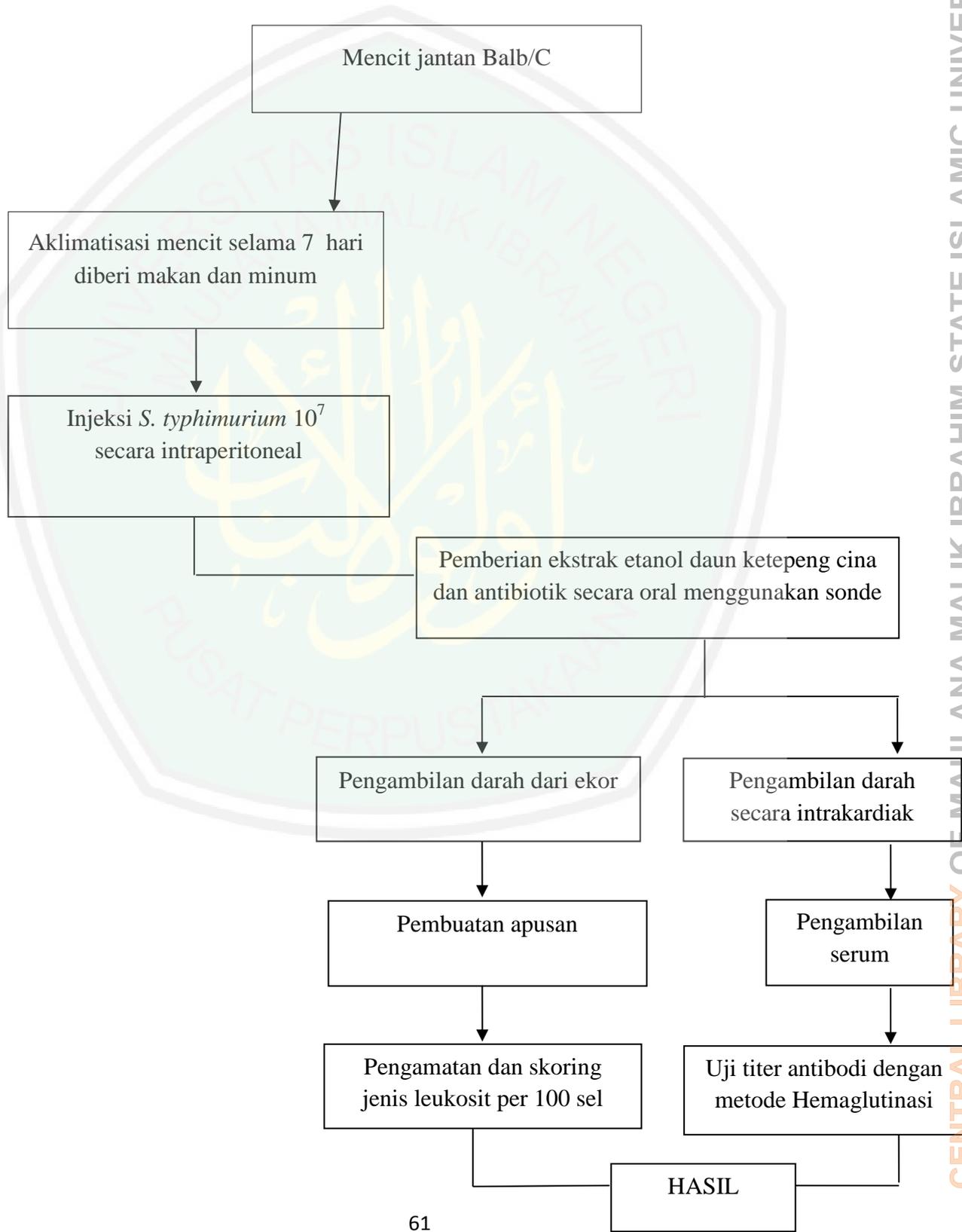
- Purba, Ivan Elisabeth. Wandra, T., Nugrahini, N., Nawawi, S., Kandun, N. 2016. Program Pengendalian Demam Tifoid di Indonesia: tantangan dan peluang. *Media Litbangkes*. Vol. 26 No. 299 – 108.
- Rahmi, E. P. 2011. Efek Imunomodulator Ekstrak Rimpang Temu Giring (*Curcuma heyneana* Val. et van Zijp.) Terhadap Respon Hipersensitivitas Tipe lambat dan Titer Antibodi Sel Imun Mencit Jantan. *Skripsi*. Medan: Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara.
- Richter, D. AA, Finlay, BB. 1997. Salmonella interaction with host cells. In *Host Response to Intracellular Pathogens* (SHE Kaufmann, ed.), Austin, TX: RG Landes, 251–270.
- Rosinta, L., Suryani, Y. D., & Nurhayati, E., 2014. Hubungan Durasi Demam Dengan Kadar Leukosit pada Penderita Demam Tifoid Anak Usia 5-10 Tahun yang Dirawat Inap di Rumah Sakit Al-Ihsan Periode Januari Desember Tahun 2014. *Prosiding Pendidikan Dokter*, pp. 43-8
- Sagnia, B., Fedeli, D. 2014. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Extracts from *Cassia alata*, *Eleusine indica*, *Eremomastax speciosa*, *Carica papaya* and *Polyscias fulva* Medicinal Plants Collected in Cameroon. *Journal List. PloS One*. Vol. 9 (8): 2014
- Saifulhaq, M. 2009. Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Mahkota Dewa Dosis Bertingkat terhadap Proliferasi Limfosit Lien pada Mencit BALB/C. *Biomedika* 1.2.33
- Sartini. 2011. Pengaruh Pemberian Bakteri Probiotik Indigenus Terhadap Aktivitas Immunoglobulin G (IgG) dan Immunoglobulin M (IgM) pada Mencit. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, Vol. 15, No. 3. hlm. 10 – 12
- Setiati, S., Idrus, A., Aru, W.S., Marcellus, S. K., Bambang, S., Ari, F. S., 2014. *Buku Ajar Penyakit Dalam Jilid I Edisi VI*. Jakarta: Interna Publishing
- Sherwood, L. 2001. *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem*. (Brahm U pendit, Penerjemah). Jakarta: EGC.
- Shihab, Q.M. 2002. *Tafsir Al-Misbah (pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an) Volume 9*. Jakarta: Lentera Hati.
- Shihab, Q.M. 2006. *Tafsir Al-Misbah (pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an) Volume 9*. Jakarta: Lentera Hati.
- Sugita, P., Arifin, B., Rachmawati, S., Annas, WY., 2014. *Identification of Compounds from Extract Methanol of Ketepeng Leaves (Cassia Aata)*. *J. Nat. Prod. Plant Resour.*, 4 (5): 39-48.
- Suhirman, S., Winart C., 2013, Prospek dan Fungsi Tanaman Obat sebagai Imunomodulator, *Jurnal Penelitian Sains Dan Teknologi*.4(2),1-8.
- Sule, W. F., Okonko, I.O., et al. 2010. *Invitro antifungal activity of Senna Alata Linn. Crude leaf extract*. h. 19-23.
- Sunarno.2007. Efek *Phyllanthus Niruri L.* Pada Prosentase Neutrofil, KoloniI Bakteri Limpa, Dan Histopatologi Hepar Mencit Balb/C Yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*. *Tesis*. Universitas Diponegoro.
- Tindall, BJ. Grimont PA, Garrity, GM. 2005. Nomenclature and Taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J. Syst Evol microbiol*. 55 (pt 1): 521-4
- Tizard, I.R. 2000. *Immunology: An Introduction*. 6th Ed. New York: Saunders College Publishing. pp. 98 – 161.

- Utami, Y.P. 2016. Uji Efek Imunostimulan Kombinasi Ekstrak Mahkota Bunga Kasumba Turate (*Carthamus tinctorius* L.) dan ekstrak Umbi Bawang Dayak pada Mencit (*Mus musculus*). *JST Kesehatan*. Vol. 6 No. 2: 179-184.
- Veerachari, U. 2012. Phytochemical Investigation Of The Ethanol, Methanol And Ethyl Acetate Leaf Extracts Of Six Cassia Species. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. Vol 3/Issue 2.
- Weidosari, E. 2007. Peran Imunomodulator Alami (*Aloe vera*) dalam Sistem Imunitas Seluler dan Humoral. *Wartazoa*. Vol. 17 No.4.
- Yanti, R. A. 2018. Efek Anti Tifoid Minyak Atsiri Temu Putih (*Curcuma zedoria* Rosc.) pada Tikus yang Diinfeksi *S. typhi*. *Pharmaceutical Sciences and Research*,. 5 (3) 116-122.
- Zaki, S.A. dan Karande, S. 2011. Multidrug-resistant thypoid fever. A. Review. *J. Infect developing. Countries*. Vol. 5.(5) 324-337



**LAMPIRAN**

**Lampiran 1.** Alur Penelitian



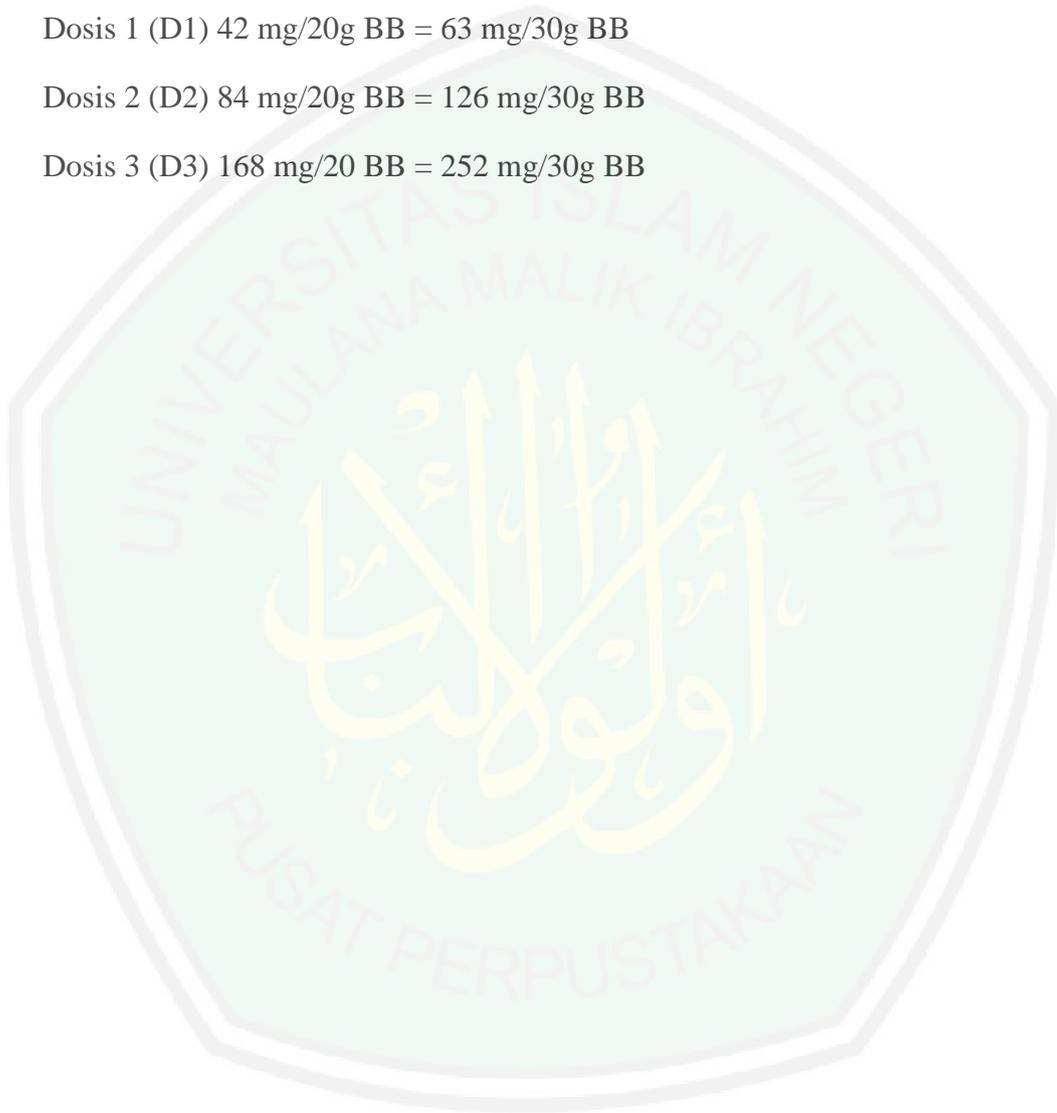
**Lampiran 2.** Penentuan dan Perhitungan Dosis

Berat mencit setelah aklimatisasi menjadi 30 gram, sehingga dosis menyesuaikan berat badan.

Dosis 1 (D1)  $42 \text{ mg}/20\text{g BB} = 63 \text{ mg}/30\text{g BB}$

Dosis 2 (D2)  $84 \text{ mg}/20\text{g BB} = 126 \text{ mg}/30\text{g BB}$

Dosis 3 (D3)  $168 \text{ mg}/20 \text{ BB} = 252 \text{ mg}/30\text{g BB}$



**Lampiran 3. Data Hasil Penelitian**

PERLAKUAN	Jumlah Leukosit Per 100 sel (%)				Nilai Titer Antibodi (μl)
	Limfosit	Neutrofil	Eosinofil	Monosit	Titer Antibodi
K0	72.0	19.0	5.0	4.0	2.81
	70.0	25.0	3.0	2.0	2.2
	74.0	20.0	4.0	2.0	2.2
	73.0	20.0	3.0	4.0	2.2
K-	74.0	23.0	2.0	1.0	4.01
	79.0	11.0	6.0	4.0	4.01
	83.0	10.0	4.0	3.0	4.01
	89.0	3.0	5.0	3.0	4.01
K+	77.0	20.0	2.0	1.0	3.41
	80.0	18.0	1.0	1.0	3.41
	73.0	19.0	4.0	4.0	3.41
	75.0	20.0	3.0	2.0	2.81
D1	75.0	20.0	4.0	1.0	2.81
	73.0	23.0	2.0	2.0	3.41
	75.0	18.0	3.0	4.0	2.81
	68.0	24.0	5.0	3.0	3.41
D2	72.0	20.0	4.0	4.0	3.41
	78.0	17.0	3.0	2.0	3.41
	75.0	16.0	5.0	4.0	3.41
	77.0	16.0	3.0	4.0	3.41
D3	74.0	23.0	2.0	1.0	2.2
	70.0	26.0	2.0	2.0	2.81
	72.0	24.0	3.0	1.0	2.81
	69.0	25.0	4.0	2.0	2.81

## Lampiran 4 Hasil Analisis SPSS

### 4.1 Hasil Analisis Statistik Skoring Jumlah Leukosit

#### 1. Uji Normalitas dengan *Kolmogorov Smirnov Test*

		neutrofil	limfosit	eosinofil	monosit
N		24	24	24	24
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	19.1667	74.8750	3.4167	2.5417
	Std. Deviation	5.31337	4.63740	1.24819	1.21509
Most Extreme Differences	Absolute	.163	.198	.172	.218
	Positive	.104	.198	.172	.214
	Negative	-.163	-.101	-.138	-.218
Kolmogorov-Smirnov Z		.799	.968	.845	1.069
Asymp. Sig. (2-tailed)		.546	.306	.474	.203

a. Test distribution is Normal.

#### 2. Uji Homogenitas *Laveve*

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
neutrofil	2.466	5	18	.072
limfosit	1.876	5	18	.149
eosinofil	.500	5	18	.772
monosit	.531	5	18	.750

3. Uji *One Way ANOVA*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
neut Between Groups	379.333	5	75.867	5.058	.005
rofil Within Groups	270.000	18	15.000		
Total	649.333	23			
limf Between Groups	269.875	5	53.975	4.323	.009
osit Within Groups	224.750	18	12.486		
Total	494.625	23			
eosi Between Groups	8.833	5	1.767	1.178	.358
nofil Within Groups	27.000	18	1.500		
Total	35.833	23			
mon Between Groups	10.208	5	2.042	1.547	.225
osit Within Groups	23.750	18	1.319		
Total	33.958	23			

4. Uji Lanjut *Post Hoc*a. Neutrofil menggunakan Duncan  $\alpha = 5\%$ 

## Neutrofil

Duncan

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
K-(S+NaCMC)	4	11.7500		
S+D2	4	17.2500	17.2500	
K+(S+Levamisol)	4		19.2500	19.2500
K0	4		21.0000	21.0000
S+D1	4		21.2500	21.2500
S+D3	4			24.5000
Sig.		.060	.196	.094

b. Limfosit menggunakan BNJ  $\alpha = 5\%$

### Limfosit

Tukey HSD

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
S+D3	4	71.2500	
K0	4	72.2500	
S+D1	4	72.7500	
S+D2	4	75.5000	75.5000
K+(S+Levamisol)	4	76.2500	76.2500
K-(S+NaCMC)	4		81.2500
Sig.		.379	.244

## 4.2 Hasil Analisis Statistik Titer Antibodi

### 1. Uji Normalitas dengan *Kolmogorov Smirnov Test*

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		titer_antibodi
N		25
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	3.0880
	Std. Deviation	.61956
Most Extreme Differences	Absolute	.218
	Positive	.153
	Negative	-.218
Kolmogorov-Smirnov Z		1.092
Asymp. Sig. (2-tailed)		.184

2. Uji Homogenitas *Lavene***Test of Homogeneity of Variances**

Titer\_Antibodi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.774	5	18	.050

3. Uji *One Way ANOVA***ANOVA**

titer\_antibodi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.791	5	1.358	20.577	.000
Within Groups	1.188	18	.066		
Total	7.979	23			

4. Uji Lanjut *Post Hoc*

titer\_antibodi

Duncan

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
K0	4	2.3525		
S+D3	4	2.6575		
S+D1	4		3.1100	
K+(S+Levamisol)	4		3.2600	
S+D2	4		3.4100	
K-(S+NaCMC)	4			4.0100
Sig.		.110	.134	1.000



KEMENTERIAN AGAMA  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI JURUSAN BIOLOGI  
Jl. Gegeran No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks: (0341) 558933  
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: [biologi@uin-malang.ac.id](mailto:biologi@uin-malang.ac.id)

### KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Riadun Ni'mah  
NIM : 12620110  
Program Studi : S1 Biologi  
Semester : Ganjil TA 2018  
Pembimbing : Kholifah Holil, M.Si  
Judul Skripsi : Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) terhadap Jumlah Leukosit dan Titer Antibodi Mencit (*Mus musculus*) yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1	14 Februari 2017	Pengajuan Judul	
2	10 April 2017	BAB I	
3	2 Mei 2017	Revisi BAB I	
4	6 Juni 2017	BAB II	
5	18 Agustus 2017	Revisi BAB II	
6	7 September 2017	BAB III	
7	20 Maret 2018	Revisi BAB III	
8	2 Oktober 2018	BAB IV	
9	23 November 2018	Revisi BAB IV	
10	12 Desember 2018	BAB V	
11.	21 Desember 2018	ACC BAB I-V	

Malang, 28 Desember 2018

Pembimbing Skripsi,

Kholifah Holil, M.Si  
NIP. 197511062009122002

Ketua Jurusan,

Romaidi, M.Si.,D.Sc  
NIP 19810201 200901 1 019



KEMENTERIAN AGAMA  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI JURUSAN BIOLOGI  
Jl. Gajayana No. 90 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933  
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: [biologi@uin-malang.ac.id](mailto:biologi@uin-malang.ac.id)

### KARTU KONSULTASI SKRIPSI

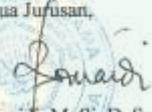
Nama : Riadun Ni'mah  
NIM : 12620110  
Program Studi : S1 Biologi  
Semester : Ganjil TA 2018  
Pembimbing : Kholifah Holil, M.Si  
Judul Skripsi : Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) terhadap Jumlah Leukosit dan Titer Antibodi Mencit (*Mus musculus*) yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	4 April 2017	Integrasi BAB I	
2.	7 Maret 2018	Integrasi BAB II	
3.	13 Desember 2018	Integrasi BAB IV	

Malang, 28 Desember 2018

Pembimbing Skripsi,

Umayyatussyarifah, MA  
NIP. 19820925200912005

Ketua Jurusan,  
  
Romaidi, M. Si., D. Sc  
NIP 19810201 2009011019