

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Gambaran umum penelitian

Penelitian ini menggunakan subjek penelitian berupa 42 ekor mencit Balb/C jantan dengan berat badan sekitar 20gram dan berumur 10-12 minggu. Selama dalam pemeliharaan mencit diberi pakan standar BR I dan diberi air minum *aqua*, setelah 42 mencit diadaptasi selama 1 minggu, kemudian mencit dibagi menjadi 6 kelompok yang masing-masing terdiri dari 7 ekor yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok perlakuan (ekstrak *D.alata* peroral dengan dosis 0.00g, 0.31g, 0.62g dan 1.24g/kg bb/hari selama 28 hari dan disensitisasi alergi), dan kelompok kontrol positif (antihistamin+ovalbumin).

Setelah dilakukan pemilihan subjek uji, tahap selanjutnya identifikasi tanaman yang dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada. Identifikasi ini dilakukan untuk mencegah terjadinya kesalahan dalam pengambilan obyek uji. Kemudian dilakukan pembuatan ekstrak etanolik umbi *D.alata* L. dan standardisasi. Ekstrak diperoleh dari umbi *D.alata* L. yang diiris tipis, dikeringkan, dihaluskan dan diekstraksi dengan cairan etanol 80%. Pemberian ekstrak dilakukan secara peroral pada kelompok P2 (0,31g/kg/bb), kelompok P3 (0,62g/kg/bb) dan kelompok P4 (1,24g/kg/bb)

selama 28 hari dengan alat bantu sonda. Pada kelompok kontrol positif

diberikan antihistamin generasi ke-3 peroral dengan dosis 0.02 mg/20g bb/hari selama 28 hari berturut-turut. Selain pemberian ekstrak, dilakukan juga sensitisasi dengan ovalbumin 0.15 cc pada hari ke-15, hari ke-22, hari ke-23 sampai dengan hari ke-28. Mencit dikorbankan 24 jam setelah akhir pemaparan ovalbumin.

Tahapan selanjutnya adalah pembuatan preparat dari mukosa intestinum mencit dan dilakukan pengecatan menggunakan hematoxylin-and eosin (HE) untuk melihat infiltrasi sel radang. Kemudian dilakukan pengamatan di bawah mikroskop cahaya dan dilakukan analisa data.

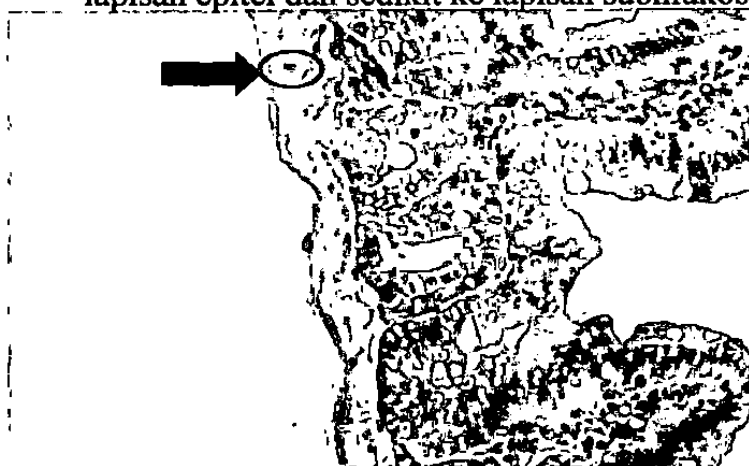
Untuk menentukan infiltrasi sel radang, dilakukan dengan *grade* reaksi alergi menurut Chang (2006). Infiltrasi sel radang dibagi menjadi *grade* 0 (tidak ada infiltrasi sel radang), *grade* 1 (infiltrasi sel radang sampai ke lapisan epitel) seperti pada gambar 3, *grade* 2 (infiltrasi sel radang sampai ke epitel dan sedikit infiltrasi ke submukosa) pada gambar 4, *grade* 3 (infiltrasi sel radang sampai ke submukosa) pada gambar 5, dan *grade* 4 (infiltrasi sel radang sampai ke muskularis) pada gambar 6. *Grade* yang paling ringan adalah *grade* 0 sedangkan yang terberat adalah *grade* 4



Gambar 3. Gambar histologi mukosa intestinum mencit (HE, 100x). Tanda panah menunjukkan infiltrasi sel radang sampai ke lapisan epitel mukosa usus (*grade 1*).



Gambar 4. Gambar histologi mukosa intestinum mencit (HE, 100x). Tanda panah menunjukkan infiltrasi sel radang sampai ke lapisan epitel dan sedikit ke lapisan submukosa (*grade 2*).



Gambar 5. Gambar histologi mukosa intestinum mencit (HE, 100x). Tanda panah menunjukkan infiltrasi sel radang sampai ke



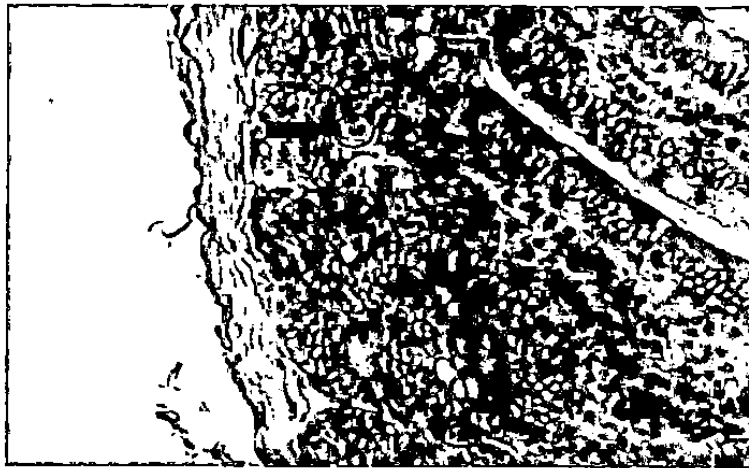
Gambar 6. Gambar histologi mukosa intestinum mencit (HE, 100x). Tanda panah menunjukkan infiltrasi sel radang sampai ke lapisan muskularis (*grade 4*).

B. Hasil penelitian

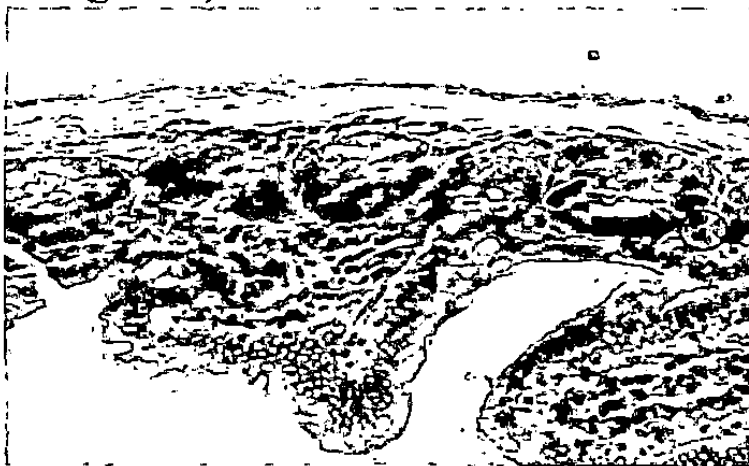
Hasil pengamatan mikroskopis masing-masing perlakuan dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



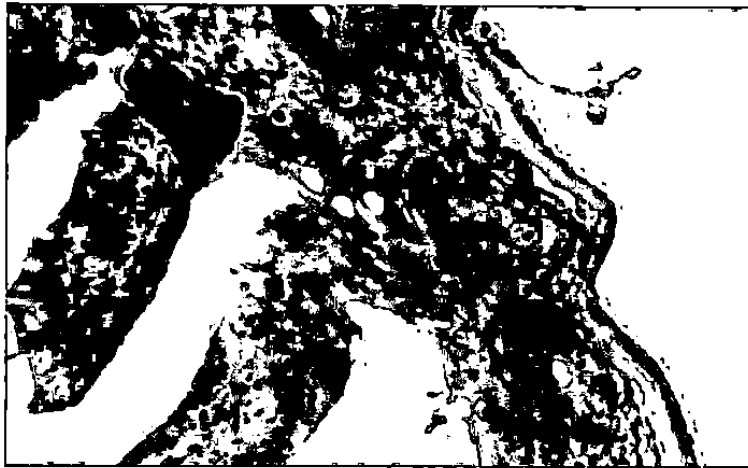
Gambar 7. Gambar histologi mukosa intestinum mencit (HE, 100x) kelompok kontrol negatif (KN). Tanda panah menunjukkan infiltrasi sel radang sampai ke lapisan epitel (*grade 1*).



Gambar 8. Gambar histologi mukosa intestinum mencit (HE, 100x) kelompok ekstrak *D. alata* dosis 0,00g/kg bb/hari (P1). Tanda panah menunjukkan adanya infiltrasi sel-sel radang sampai ke lapisan epitel dan sedikit ke lapisan submukosa (*grade 2*).



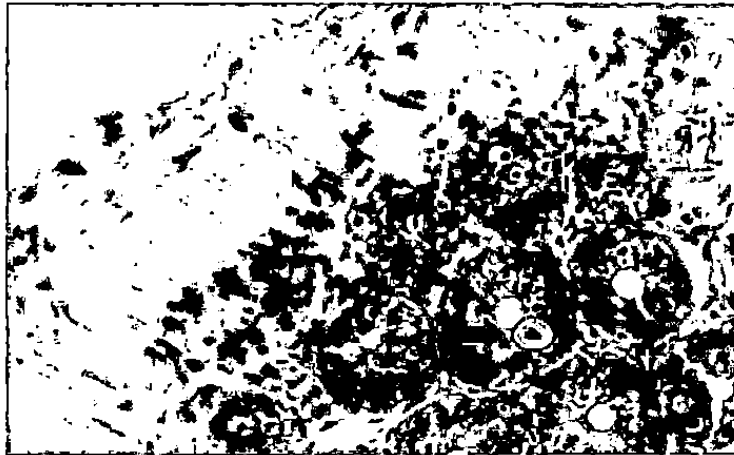
Gambar 9. Gambar histologi mukosa intestinum mencit (HE, 100x) kelompok ekstrak *D.alata* dosis 0,31g/kg bb/hari (P2). Tanda panah menunjukkan adanya infiltrasi sel radang sampai ke lapisan epitel dan sedikit ke lapisan submukosa (*grade 2*).



Gambar 10. Gambar histologi mukosa intestinum mencit (HE, 100x) kelompok ekstrak *D.alata* dosis 0,62g/kg bb/hari (P3). Tanda panah menunjukkan adanya infiltrasi sel-sel radang sampai ke lapisan epitel (*grade 1*).



Gambar 11. Gambar histologi mukosa intestinum mencit (HE, 100x) kelompok ekstrak *D.alata* dosis 1,24g/kg bb/hari (P4). Tanda panah menunjukkan adanya infiltrasi sel-sel radang sampai ke lapisan epitel mukosa usus (*grade 1*).



Gambar 12. Gambar histologi mukosa intestinum mencit (HE, 100x) kelompok kontrol positif (KP). Tanda panah menunjukkan adanya infiltrasi sel-sel radang sampai ke lapisan epitel (*grade 1*).

Gambar 7 adalah kelompok kontrol negatif, terlihat adanya infiltrasi radang pada *grade 1*. Gambar 8 adalah kelompok ekstrak *D. alata* dosis 0,00 g/kg bb/hari (P1) terlihat adanya infiltrasi sel-sel radang pada *grade 2*. Kelompok ekstrak *D.alata* dosis 0,31g/kg bb/hari (P2) pada gambar 9 menunjukkan adanya infiltrasi radang sampai ke lapisan mukosa dan sedikit ke submukosa (*grade 2*). Gambar 10 adalah kelompok ekstrak *D.alata* dosis 0,62g/kg bb/hari (P3) memperlihatkan adanya infiltrasi sel radang pada *grade 1*. Gambar 11 adalah kelompok perlakuan dosis tertinggi (ekstrak *D.alata* dosis 1,24g/kg bb/hari), tingkat infiltrasi radang pada kelompok ini hanya terbatas pada lapisan mukosa (*grade 1*). Kelompok VI (kontrol positif) pada gambar 12 menunjukkan adanya infiltrasi radang pada *grade 1*. Setelah diberi ekstre maka dilakukan analisis

Hasil pengukuran dan analisis dari data yang diperoleh menunjukkan rata-rata tingkat infiltrasi radang pada mukosa intestinum mencit balb/c. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 1.

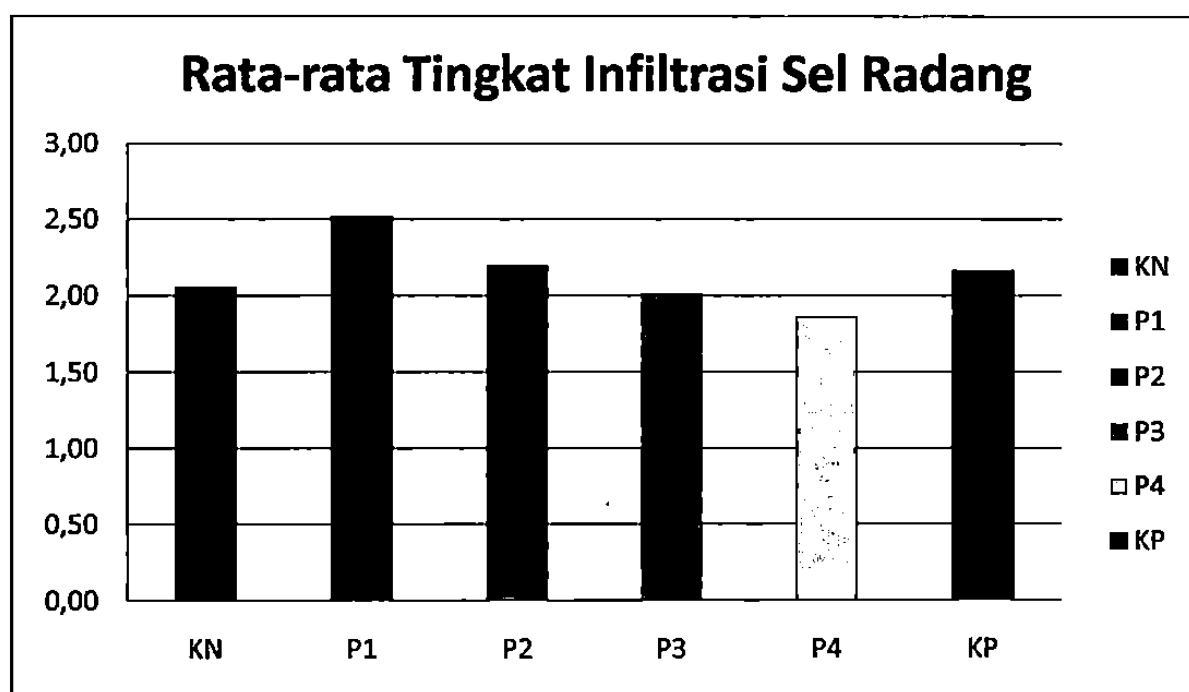
Tabel 1. Rerata tingkat infiltrasi sel radang ($x \pm SD$) setelah diberi ekstrak etanol umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) berbagai dosis

No	Nama Kelompok	Rata-rata \pm SD
1	Kontrol Negatif	2,0571 \pm 0,34945 ^a
2	Ekstrak <i>D. alata</i> 0.00 g (P1)	2,5222 \pm 0,34102 ^b
3	Ekstrak <i>D. alata</i> 0.31 g (P2)	2,2000 \pm 0,21082 ^{ab}
4	Ekstrak <i>D. alata</i> 0.62 g (P3)	2,0133 \pm 0,21807 ^b
5	Ekstrak <i>D. alata</i> 1.24 g (P4)	1,8667 \pm 0,30307 ^b
6	Kontrol Positif: Antihistamin (KP)	2,1667 \pm 0,22998 ^b

Keterangan: SD: standar deviasi; ^{a,b}: angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak ada beda nyata antar kelompoknya

Dari tabel 1 dapat dilihat bahwa rata-rata tingkat infiltrasi radang yang paling tinggi adalah kelompok ekstrak *D. alata* dosis 0,00 g/kg bb/hari dan disensitisasi ovalbumin dengan rata-rata 2,5222. Rata-rata terendah adalah kelompok P4 sebesar 1,8667. Kelompok ini diberi perlakuan berupa sensitisasi ovalbumin dan ekstrak *D.alata*. L dengan dosis tertinggi (1,24g/kg/bb). Kelompok lain yang diberi ekstrak *D.alata*. L juga mengalami penurunan jika dibandingkan dengan kelompok P1 yang hanya diberi ovalbumin. Kontrol positif dengan pemberian antihistamin juga mampu menurunkan tingkat infiltrasi sel radang dengan rata-rata

sebesar 2,1667. Hasil uji statistik menunjukkan adanya perbedaan bermakna pada kelompok P1 dengan kontrol negatif. Selain itu, terdapat pula perbedaan antara P3, P4 dan kontrol positif dibanding P1. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 3.



Gambar 13. Histogram rata-rata tingkat infiltrasi sel radang setelah diberi ekstrak etanol umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) berbagai dosis.

Keterangan :

- KN : Kontrol negatif
- P1 : Ekstrak *D.alata* L. 0,00g/kg bb/hari
- P2 : Ekstrak *D.alata* L. 0,31g/kg bb/hari
- P3 : Ekstrak *D.alata* L. 0,62g/kg bb/hari
- P4 : Ekstrak *D.alata* L. 1,24g/kg bb/hari
- KP : Kontrol Positif

Pada gambar diatas tampak adanya perbedaan rata-rata tingkat infiltrasi radang antara kelompok ovalbumin dengan kelompok kontrol negatif ekstrak *D.alata* L. 0,31g/kg/bb, 0,62g/kg/bb, 1,24g/kg/bb dan

Selanjutnya dilakukan uji normalitas data secara keseluruhan untuk diketahui distribusinya normal atau tidak. Uji normalitas pada penelitian ini menggunakan metode analitik melalui uji *Shapiro-wilk* karena jumlah sampel yang digunakan ≤ 50 .

Dari uji normalitas diperoleh bahwa semua kelompok mempunyai tingkat signifikansi diatas 0,05 atau dapat dikatakan distribusinya normal. Sehingga uji statistik selanjutnya menggunakan *One Way Anova*.

Tabel 2. Uji statistik menggunakan *Anova*

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.322	5	.264	3.266	.019
Within Groups	2.267	28	.081		
Total	3.589	33			

Hasil statistika menggunakan *Anova* menunjukkan nilai $p=0,019$ ($p<0,05$), artinya perbedaan derajat dosis pemberian ekstrak etanol umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) menunjukkan terdapat perbedaan rata-rata tingkat infiltrasi radang yang bermakna di antara keenam kelompok tersebut. Kemudian, untuk mengetahui perbandingan nilai p antar kelompok tersebut maka dilakukan uji *LSD (Least Significant*

Tabel 3. Uji LSD (*Least Significant Difference*) tingkat infiltrasi sel radang mencit Balb/C model alergi setelah pemberian ekstrak etanol umbi uwi ungu (*Dioscorea alata L.*)

No	Kelompok		Nilai p
1	KN	P1	0,007*
		P2	0,374
		P3	0,795
		P4	0,295
		KP	0,495
2	P1	P2	0,060
		P3	0,006*
		P4	0,001*
		KP	0,039*
3	P2	P3	0,288
		P4	0,080
		KP	0,841
4	P3	P4	0,449
		KP	0,381
5	P4	KP	0,114

*terdapat perbedaan yang signifikan dengan $p \leq 0,05$

Keterangan : KN : Kontrol negatif
 P1 : Ekstrak *D.alata L.* 0,00g/kg bb/hari
 P2 : Ekstrak *D.alata L.* 0,31g/kg bb/hari
 P3 : Ekstrak *D.alata L.* 0,62g/kg bb/hari
 P4 : Ekstrak *D.alata L.* 1,24g/kg bb/hari
 KP : Kontrol Positif

Tabel 3 terlihat adanya perbedaan bermakna antara kelompok ekstrak *D. alata* dosis 0,00 g/kg bb/hari dengan kelompok kontrol negatif dengan nilai $p=0,007$. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ovalbumin dapat meningkatkan infiltrasi sel radang jika dibandingkan dengan kontrol negatif yang tidak diberi ovalbumin. Selain itu, terdapat perbedaan bermakna tingkat infiltrasi radang pada kelompok P3 (ekstrak *D.alata*. L. 0,62g/kg bb/hari), P4 (ekstrak *D.alata*. L. 1,24g/kg bb/hari) dan kelompok kontrol positif dibandingkan kelompok ekstrak *D. alata* dosis 0,00 g/kg bb/hari dengan nilai $p=0,006$; $p=0,001$ dan $p=0,039$.

Sebagai data tambahan, dilakukan pengukuran berat badan mencit pada masing-masing kelompok yang dilakukan pada hari ke-0, 7, 14, 21 dan 28. Rata-rata berat badan mencit dapat dilihat pada tabel 4.

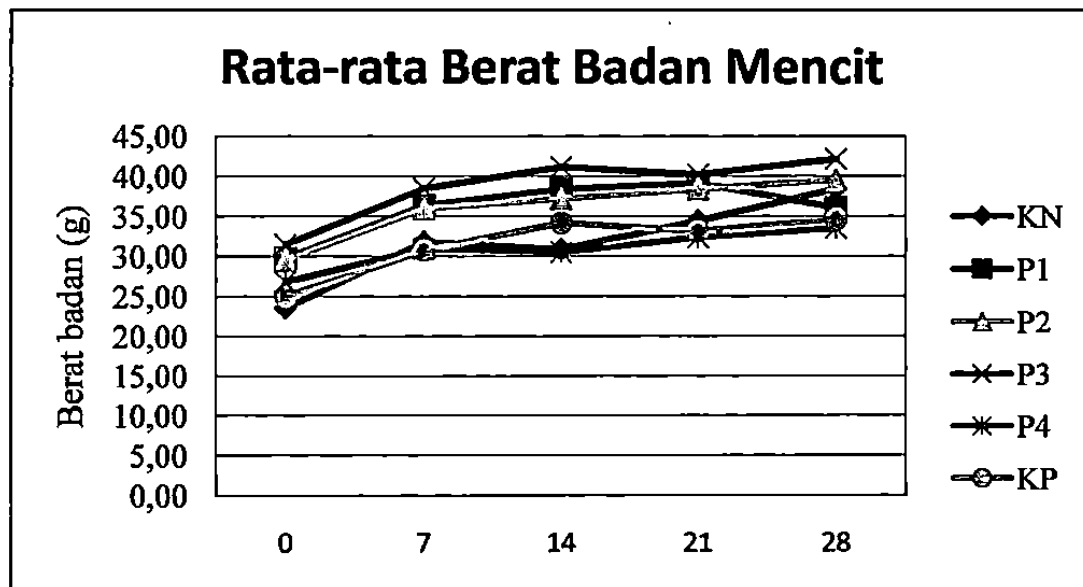
Tabel 4. Rata-rata berat badan mencit masing-masing kelompok

Kel	hari ke-				
	0	7	14	21	28
KN	23.58 ± 2.03	31.81 ± 1.99	30.90 ± 5.12	34.43 ± 4.13	38.43 ± 1.57
P1	29.81 ± 0.85	36.34 ± 2.91	38.38 ± 3.09	39.15 ± 2.75	36.07 ± 3.48
P2	29.55 ± 1.64	35.9 ± 1.67	37.18 ± 1.58	38.36 ± 1.53	39.53 ± 1.27
P3	31.48 ± 0.87	38.44 ± 1.08	41.18 ± 2.53	40.21 ± 2.52	42.15 ± 2.15
P4	26.85 ± 0.56	30.98 ± 1.59	30.51 ± 3.77	32.38 ± 2.43	33.5 ± 3.27
KP	25.02 ± 0.96	30.75 ± 1.85	34.17 ± 2.50	33.15 ± 1.67	34.6 ± 1.60

Tabel 4 diatas merupakan rata-rata berat badan mencit pada masing-masing kelompok yang diukur pada hari ke 0, 7, 14, 21, dan 28.

Kelompok P1 adalah kelompok yang disensitisasi menggunakan ovalbumin. Rata-rata berat badan mencit pada kelompok tersebut

menunjukkan adanya penurunan dari 39,15g pada hari ke-21 menjadi 36,07g pada hari ke-28.



Gambar 14. Grafik rata-rata berat badan mencit masing-masing kelompok yang diukur pada hari ke-0, 7, 14, 21, dan 28.

Keterangan :

- KN : Kontrol negatif
- P1 : Ekstrak *D.alata* L. 0,00g/kg bb/hari
- P2 : Ekstrak *D.alata* L. 0,31g/kg bb/hari
- P3 : Ekstrak *D.alata* L. 0,62g/kg bb/hari
- P4 : Ekstrak *D.alata* L. 1,24g/kg bb/hari
- KP : Kontrol Positif

Gambar 14 diatas menunjukkan adanya penurunan berat badan mencit pada kelompok ekstrak *D.alata* L. dosis 0,00g/kg bb/hari dan disensitisasi ovalbumin. Ovalbumin merupakan antigen yang dapat menstimulasi keluarnya mediator-mediator seperti histamin sehingga terjadi reaksi alergi. Reaksi alergi yang terjadi dapat menyebabkan perubahan pada saluran pencernaan seperti edema pada jejunum yang

C. Pembahasan

Pada penelitian ini menggunakan mencit Balb/C jantan yang dijadikan sebagai mencit model alergi. Untuk menimbulkan reaksi hipersensitivitas, mencit balb/c disensitisasi menggunakan ovalbumin terlebih dahulu. Ovalbumin merupakan komponen terbanyak pada putih telur yang dapat digunakan untuk menstimulasi reaksi alergi dalam tes atau uji alergi. Ovalbumin mampu memicu keluarnya mediator seperti histamin yang merupakan faktor kemotaktik sehingga dapat meningkatkan berbagai sel radang seperti neutrofil dan eosinofil (Leasa, 2010).

Hipersensitivitas sendiri merupakan kondisi berubahnya respon imunologi, dimana terjadi reaksi imun yang sangat hebat terhadap masuknya/paparan antigen. Reaksi yang terjadi dibawa, baik melalui imunitas humoral (antibodi) maupun imunitas selular (limfosit-T). Hasil reaksi ini dapat berupa suatu lesi dari bentuk yang ringan sebagai inflamasi lokal sampai syok menyeluruh. Pada sebagian besar keadaan, reaksi hipersensitivitas disebabkan/dirangsang oleh antigen asing, seperti serbuk bunga, jamur, substansi makanan dan obat-obatan (Underwood,1999).

Gell dan Coombs membagi hipersensitivitas menjadi 4 tipe, yaitu tipe I (anafilaktik), tipe II (sitotoksik), tipe III (kompleks imun), tipe IV (diperantarai sel). Pada tipe I terjadi ikatan silang antara antigen dan IgE yang diikat sel mast dan basofil sehingga melepas mediator vasoaktif. Tipe II melibatkan mekanisme pembentukan antibodi seperti IgG dan Ig M

yang berikatan dengan antigen yang merupakan bagian dari sel atau jaringan tubuh. (Baratawidjadja, 2009). Untuk tipe III terjadi penyatuan antigen dan antibodi membentuk suatu kompleks yang mengaktifkan sistem komplemen, menarik leukosit, dan menyebabkan kerusakan jaringan oleh produk-produk leukosit. Tipe IV merupakan reaksi limfosit T dengan antigen yang menyebabkan pelepasan limfokin, sitotoksitas langsung, dan pengerahan sel-sel reaktif (Price dan Wilson, 2006).

Mekanisme imun yang berperan dalam reaksi inflamasi alergi adalah tipe I yang diperankan oleh antibodi IgE. Bila seseorang yang telah mempunyai antibodi terpajan dengan alergen serupa, maka alergen tersebut akan terikat pada IgE yang sudah terikat pada sel mast dan akan terjadi fusi granula dengan membran sel mast sehingga terjadi degranulasi. Akibatnya mediator yang sudah ada dalam granula seperti histamin keluar dari sel mast. Selain histamin, dilepaskan juga mediator lain seperti kemotaktik eosinofil (ECF-A), dan faktor kemotaktik netrofil (NCF) yang akan menarik eosinofil dan netrofil ke tempat alergen berada. Reaksi ini disebut reaksi alergi fase cepat. Bersamaan dengan lepasnya mediator dari sel mast juga terjadi aktivasi enzim fosfolipase yang ada pada membran sel mast, basofil akan mengubah fosfolipid menjadi asam arakidonat yang kemudian akan dimetabolisme tubuh. Hasil metabolit ini adalah prostaglandin dan leukotrien yang disebut mediator yang terbentuk kemudian atau disebut juga *slow reacting substance of anaphylaxis* (SRS-A). Mediator ini akan menarik sel sel radang ke tempat alergen berada

juga meningkatkan permeabilitas dan pelebaran pembuluh darah sehingga terjadi inflamasi alergi (Siregar, 2000).

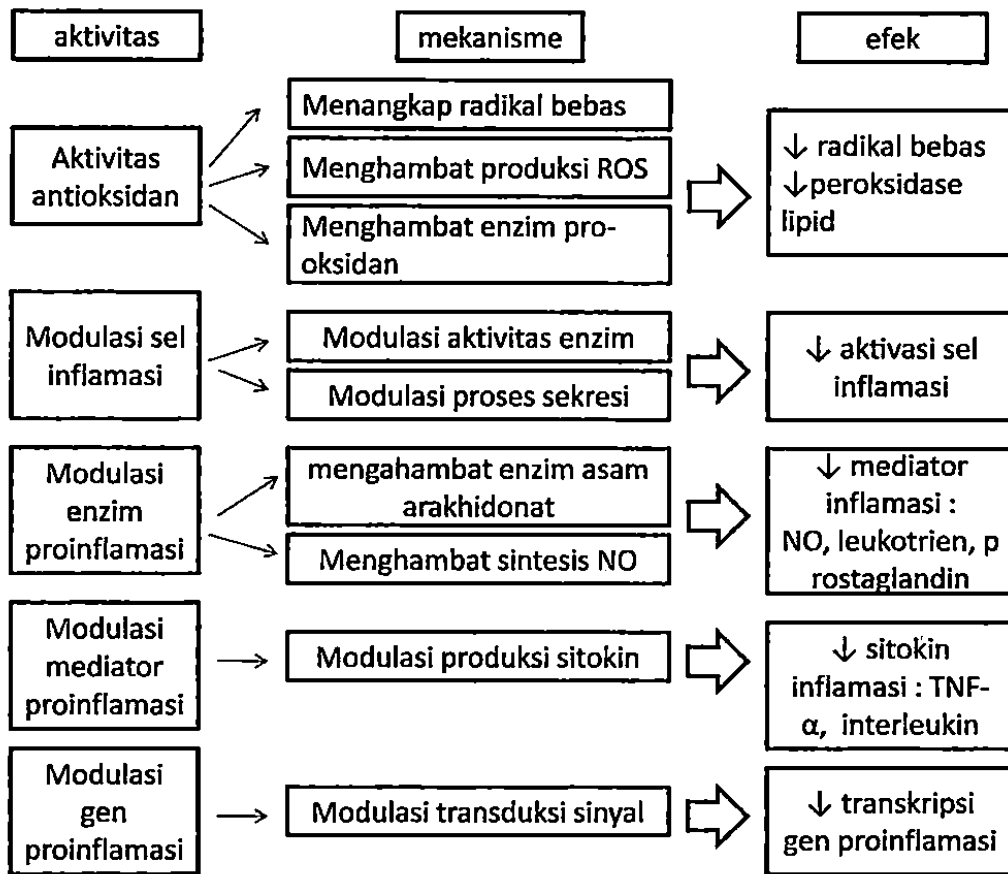
Umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) merupakan salah satu varietas umbi-umbian yang potensial sebagai sumber pangan karbohidrat non beras. Selain sebagai sumber karbohidrat, anekaragam umbi-umbian terbukti secara ilmiah dapat mencegah berbagai macam penyakit. Tanaman ini merupakan tumbuhan merambat yang dapat mencapai panjang 10 m. Batangnya lunak, segi empat dengan diameter 2-4 mm, panjang ruas sekitar 14 cm (Tim Kehati, 2003).

Hasil uji statistika Imenggunaskasn *anova* yang mempunyai nilai $p=0,019$ ($p \leq 0,05$) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) berpengaruh terhadap tingkat infiltrasi sel radang pada mukosa usus mencit balb/c. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak *D.alata* memberikan efek antiinflamasi pada mencit balb/c. Efek antiinflamasi tersebut dapat ditimbulkan karena adanya kandungan flavonoid dan saponin dalam umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.).

Flavonoid merupakan golongan terbesar senyawa polifenol. Flavonoid berperan memberikan warna dan rasa pada berbagai buah dan sayuran. Di dalam tubuh, flavonoid dan fenol lainnya mempunyai berbagai manfaat biologis, termasuk sebagai antioksidan, antiinflamasi, dan menghambat pertumbuhan mikroba. Beberapa senyawa flavonoid dan asam fenolat beserta sumbernya antara lain: katekin (teh dan minuman

anggur), flavon (buah-buahan sitrus), flavonol (bawang merah, buah zaitun, teh, minuman anggur, dan apel), antosianidin (buah-buahan berwarna), dan asam kafeat (tomat, plum dan ceri). Salah satu komponen flavonoid yang paling umum terdapat pada tumbuhan adalah antosianin yang merupakan derivat dari antosianidin (Safitri, 2012).

Mekanisme flavonoid sebagai anti-inflamasi dapat melalui beberapa cara, diantaranya sebagai antioksidan dan penangkap radikal bebas (*free radical scavenging*), mengatur aktivitas seluler yang terkait dengan inflamasi, mempengaruhi enzim proinflamasi, mediator proinflamasi dan gen proinflamasi. Sebagai antioksidan, flavonoid menghambat pembentukan radikal bebas dan menghambat pembentukan nitrit oksida yang dapat menyebabkan kerusakan oksidatif. Flavonoid juga menghambat terbentuknya enzim-enzim pro inflamasi seperti siklooksigenase dan lipooksigenase yang menyebabkan penurunan mediator-mediator penting inflamasi seperti prostaglandin, leukotrien dan nitrit oksida (Lafuente *et.al.*, 2009). Mekanisme flavonoid sebagai anti-inflamasi dapat dilihat pada gambar 15



Gambar 15. Mekanisme flavonoid sebagai antiinflamasi (Lafuente *et.al.*, 2009)

Selain flavonoid, pada umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) juga terdapat senyawa lain yaitu saponin. Saponin adalah suatu kelas gabungan senyawa kimia, salah satu senyawa metabolit sekunder yang ditemukan dari sumber alami dan dari berbagai macam spesies tanaman (Cahyadi, 2009). Sumber utama saponin adalah biji-bijian khususnya kedelai. Senyawa ini diketahui berfungsi sebagai antikanker dan anti inflamasi (Kordi, 2010)

Saponin mempunyai sifat seperti sabun, merupakan senyawa aktif permukaan yang kuat, yang menimbulkan busa jika dikocok dalam air dan

kelebihan saponin menyebabkan hemolisis sel darah merah

Beberapa saponin bekerja sebagai antimikroba. Kombinasi flavonoid dan saponin mempunyai efek anti inflamasi, analgesik, dan sitotoksik (Simanjuntak, 2008). Efek anti inflamasi inilah yang dapat menyebabkan terjadinya penurunan infiltrasi sel radang.

Penelitian yang dilakukan oleh Hidayati, Listyawati dan Setyawan (2005) tentang uji anti inflamasi pada ekstrak etanol *Lantana camara* menunjukkan bahwa kandungan saponin dan flavonoid pada tanaman tersebut mempunyai aktivitas antiinflamasi yang ditandai dengan menurunnya persentase radang pada tikus putih. Pada penelitian ini menggunakan ekstrak etanol umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) yang juga mengandung banyak flavonoid. Hasil penelitian ini menunjukkan penurunan tingkat infiltrasi radang yang dilihat dari penurunan rata-rata dan hasil yang signifikan menggunakan uji *anova* dengan nilai $p=0,019$ ($p \leq 0,05$), sehingga penelitian ini mendukung penelitian sebelumnya tentang flavonoid dan saponin yang berperan dalam reaksi inflamasi.