

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

Pengumpulan data dilakukan dengan pemeriksaan histologi untuk menentukan ada atau tidaknya parasit *Plasmodium berghei* serta pelebaran pulpa rubra pada lien mencit. Penilaian adanya parasit pada lien mencit dibagi menjadi tiga yaitu: sedikit, sedang, banyak. Penilaian dikatakan "sedikit" apabila terlihat 1- 5 parasit berwarna kecoklatan pada pulpa rubra pada satu lapangan pandang. Nilai "sedang" bila terdapat 5-10 parasit dalam satu lapangan pandang. Nilai "banyak" apabila terdapat > 10 parasit pada satu lapangan pandang. Pelebaran pulpa rubra didapat dari perhitungan jarak antara dua pulpa alba yang dilihat menggunakan mikroskop dilengkapi dengan mikrometer. Ukuran yang dipakai adalah mikromili (μm). Pengukuran dilakukan pada jarak terlebar serta tersempit diantara dua pulpa alba pada satu lapangan pandang. Perhitungan jarak antara dua pulpa alba dilakukan sebanyak 3 kali, kemudian untuk keperluan data statistik dari ketiga perhitungan tersebut diambil rata-ratanya. Hasil penilaian ada tidaknya parasit pada lien mencit dapat dilihat pada Tabel 3, sedangkan data pelebaran pulpa rubra dapat dilihat dari Tabel 5

Tabel 3. Adanya parasit *Plasmodium berghei* pada lien mencit

Kelompok	No hewan uji	Parasit pada lien	P
K (-) Kontrol Negatif	1	Ada P sedang	0,027
	2	ada P sedang	
	3	ada P sedang	
	4	ada P sedang	
K (+) Kontrol positif	1	Ada P sedikit	
	2	Ada P sedikit	
	3	Ada P sedikit	
	4	Ada P sedang	
P I (Perlakuan I) Echinacea 0,65 mg	1	ada P banyak	
	2	ada P sedikit	
	3	ada P banyak	
	4	ada P banyak	
P II (Perlakuan II) Echinacea 1,3 mg	1	ada P banyak	
	2	ada P sedikit	
	3	ada P banyak	
	4	ada P banyak	

Berdasarkan Tabel 3 di atas, pada kontrol negatif menunjukkan adanya parasit pada lien dengan jumlah sedang. Pada kontrol positif ditemukan rata-rata ditemukan sedikit parasit. Pada perlakuan I dengan pemberian echinacea 0,65 mg didapatkan banyak parasit, begitu pula pada perlakuan II yang menggunakan echinacea 1,3 mg ditemukan banyak parasit.

Dari hasil analisis *Kruskal-Wallis* test diperoleh nilai $p=0,010$ ($p < 0,05$), berarti dari perhitungan analisis terdapat perbedaan pengaruh pemberian echinacea pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dengan dosis rendah 0,65 mg dan dosis tinggi 1,3 mg setiap hari selama 5 hari. Pemberian echinacea dimaksudkan untuk meningkatkan daya tahan

tubuh mencit terhadap infeksi malaria. Uji analisis yang dilakukan selanjutnya adalah uji *Mann Whitney* yang membandingkan antara setiap perlakuan dengan perlakuan lain. Hasil Uji *Mann Whitney* dapat dilihat dari Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji *Mann Whitney* antar kelompok perlakuan.

No	Perbandingan Kelompok	P
1	K negatif & K positif	0,010
2	K negatif & perlakuan I	0,011
3	K negatif & perlakuan II	0,046
4	K positif & perlakuan I	0,040
5	K positif & perlakuan II	0,350
6	Perlakuan I & perlakuan II	0,405

Kontrol negatif yang dibandingkan dengan kontrol positif diperoleh nilai $p=0,010$ ($p<0,05$) yang berarti terdapat perbedaan bermakna antara mencit terinfeksi malaria tanpa perlakuan dengan mencit terinfeksi malaria yang diberi klorokuin. Kontrol negatif dibandingkan dengan perlakuan I didapatkan hasil $p=0,011$ ($p<0,05$) berarti terdapat kemaknaan pada pemberian echinacea dosis 0,65 mg pada mencit terinfeksi malaria. Kontrol negatif dengan perlakuan dua didapatkan hasil $p=0,046$ yang bermakna terdapat pengaruh pemberian echinacea 1,3 mg dibandingkan dengan mencit terinfeksi tanpa perlakuan.

Pada perhitungan analisis kontrol positif dengan perlakuan I, kelompok yang diberi echinacea 0,65 mg didapatkan hasil $p=0,040$ berarti terdapat perbedaan bermakna antara pemberian klorokuin dengan echinacea

sebagai imunomodulator tubuh. Perbandingan antara kontrol positif dengan perlakuan II, pemberian echinacea 1,3 mg tidak didapatkan perbedaan yang bermakna. Pada perbandingan perlakuan I (echinacea 0,65 mg) dengan perlakuan II (echinacea 1,3 mg) dari hasil statistik yang dilakukan tidak didapat perbedaan bermakna, sehingga pemberian echinacea dosis 0,65 mg tidak memberikan perbedaan efek terapi terhadap pemberian echinacea dosis 1,3 mg pada mencit terinfeksi malaria.

Tabel 5. Hasil Jarak antara dua pulpa alba pada lien mencit.

Kelompok	No Hewan Uji	Rata-rata jarak terlebar	rata-rata jarak tersempit	P lebar	P sempit
K (-) Kontrol Negatif	1	47	7,67	0,010	0,177
	2	28,33	11,33		
	3	32,33	12,67		
	4	60,67	30,67		
K (+) Kontrol positif	1	37,67	21,33		
	2	51	30,33		
	3	45,33	28		
	4	48,67	35,67		
P I (Perlakuan I) Echinacea 0,65 mg	1	77,67	27,33		
	2	79,33	24,67		
	3	78,33	20,00		
	4	67,33	24,67		
P II (Perlakuan II) Echinacea 1,3 mg	1	83,67	18,87		
	2	72	23,67		
	3	79	22,33		
	4	72,33	22,33		

Berdasarkan Tabel 5 yang menampilkan hasil rata-rata dari 3x perhitungan jarak antara dua pulpa alba, dengan tes *Kruskal-Wallis* didapatkan hasil probability $p=0,010$ ($p<0,05$) untuk jarak terlebar kedua pulpa alba yang berarti terdapat perbedaan terhadap setiap perlakuan

kelompok. Pada perhitungan uji statistik pada jarak tersempit, dengan tes *Kruskal-Wallis* didapatkan hasil $p=0,177$ ($p>0,05$) menandakan tidak terdapat perbedaan bermakna pada setiap perlakuan antar kelompok pada penelitian ini.

Uji statistik selanjutnya adalah uji *Mann-Whitney*. Hasil Uji Mann Whitney jarak antara dua pulpa alba dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil uji *Mann Whitney* antar kelompok berdasar jarak dua pulpa alba.

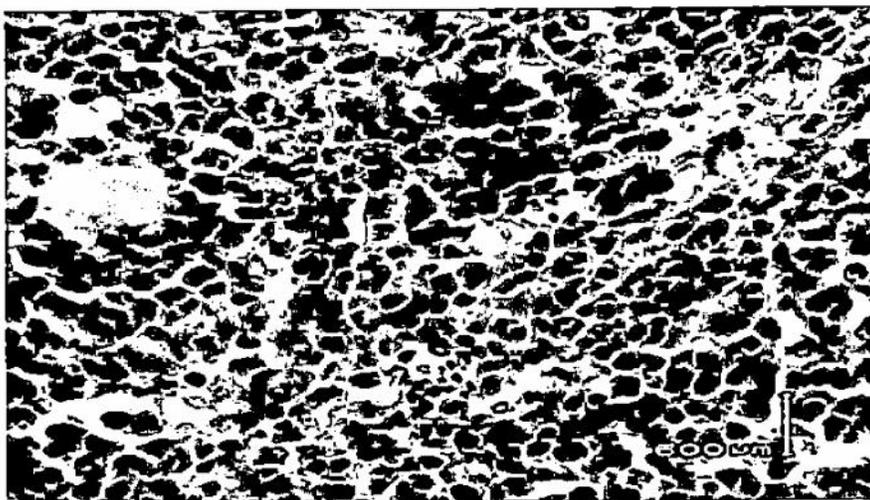
No	Perbandingan Kelompok	P lebar	P sempit
1	K negatif & K positif	0,564	0,149
2	K negatif & perlakuan I	0,021	0,245
3	K negatif & perlakuan II	0,020	0,245
4	K positif & perlakuan I	0,021	0,146
5	K positif & perlakuan II	0,020	0,146
6	Perlakuan I & perlakuan II	0,772	0,144

Hasil uji *Mann Whitney*, kelompok yang memberikan nilai signifikan berasal dari nilai pelebaran dua pulpa alba. Pada kelompok perbandingan antara kontrol negatif dan perlakuan I (echinacea 0,65 mg) bernilai $p=0,021$ ($p<0,05$) yang berarti terdapat perbedaan bermakna di kedua kelompok tersebut. Perbandingan kontrol negatif dan perlakuan II bernilai $p=0,020$ ($p<0,05$) menandakan terdapat perbedaan bermakna antara kedua kelompok. Hasil signifikan yang lain adalah perbandingan antara kontrol positif dengan perlakuan I (echinacea 0,65 mg) $p=0,021$ ($p<0,05$) dan perbandingan kontrol positif dengan perlakuan II (echinacea 1,3 mg) bernilai $p=0,020$ ($p<0,05$). Kedua nilai tersebut menyatakan bahwa terdapat perbedaan antara kelompok perlakuan kontrol positif dengan perlakuan I maupun perlakuan

II. Perbandingan kontrol negatif dan kontrol positif jarak terlebar bernilai $p=0,564$ ($p>0,05$) yang berarti tidak didapat perbedaan, sedang pada perbandingan perlakuan I (echinacea 0,65 mg) dengan perlakuan II (echinacea 1,3 mg) mendapat nilai $p=0,772$ ($P>0,05$) juga tidak didapat nilai perbedaan bermakna. Pada jarak tersempit antara dua pulpa alba, dari semua kelompok $p>0,05$ yang berarti pada perbandingan tiap kelompok tidak terdapat perbedaan yang bermakna.

1. Gambaran histologis

Dari hasil pembacaan persebaran parasit pada lien, dapat diamati bahwa kontrol positif menunjukkan infeksi parasit yang lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok yang lain. Gambar 3 menunjukkan keberadaan parasit pada kontrol positif, dan Gambar 4 menunjukkan keberadaan parasit pada perlakuan I (Echinacea 0,65 mg).

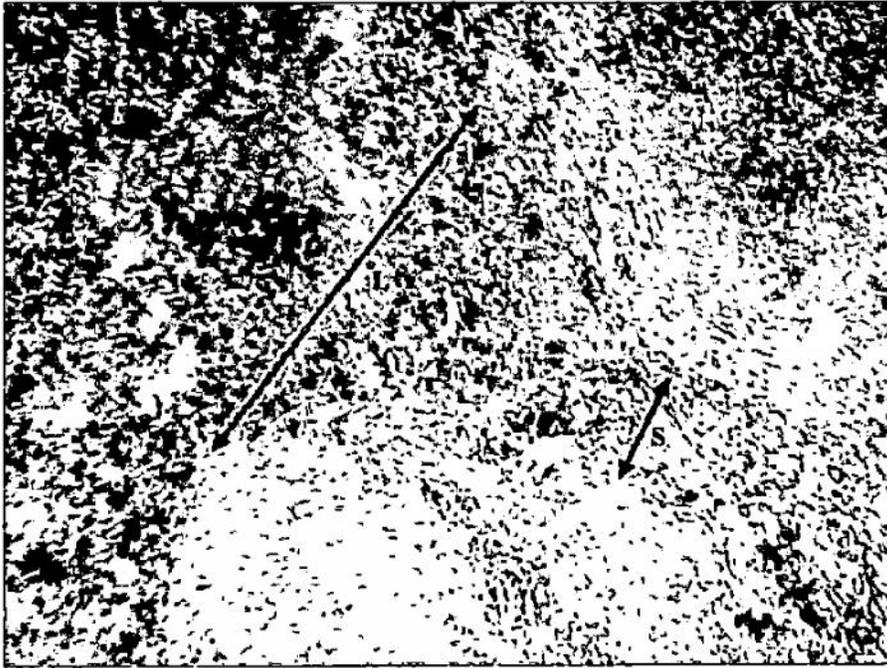


Gambar 3. Gambaran histologis lien kelompok kontrol negatif. Tanda panah menunjukkan infeksi parasit *Plasmodium heroshei* di lien mencit.

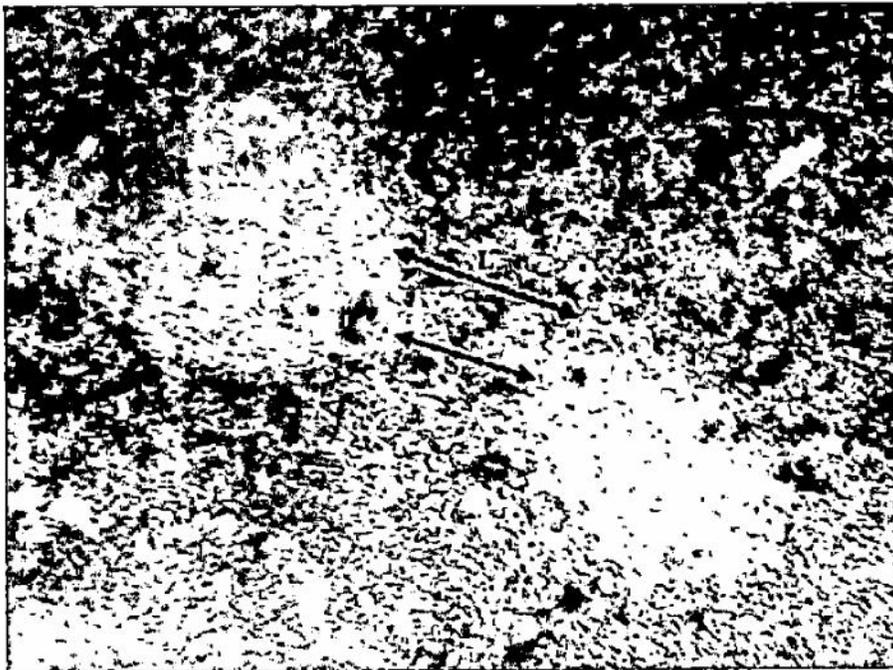


Gambar 4. Gambaran histologis lien kelompok kontrol positif (klorokui 1,56 mg selama 3 hari). Tanda panah menunjukkan infeksi parasit *Plasmodium berghei* di lien mencit.

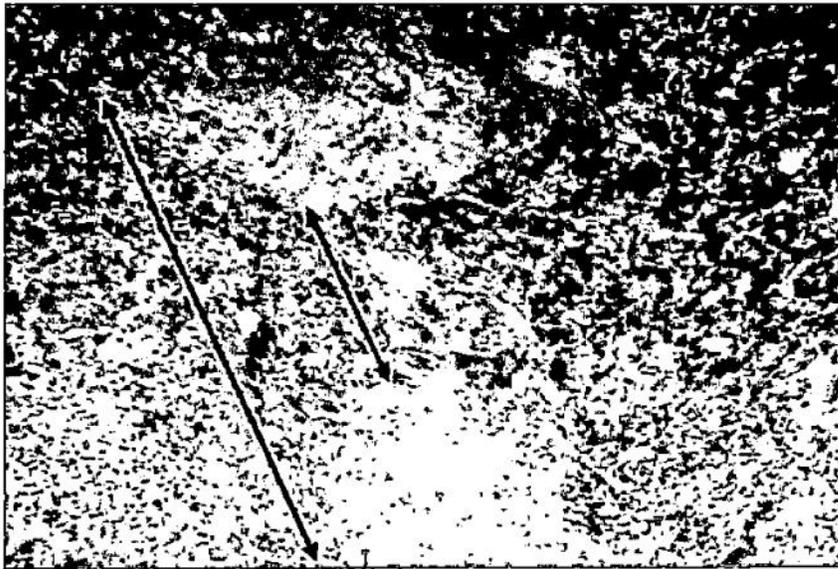
Dari hasil pengukuran jarak antara dua pulpa alba untuk mengukur pulpa rubra, kelompok kontrol negatif menunjukkan jarak kedua pulpa yang masih sempit, serta pulpa rubra yang terlihat rapi berwarna merah keunguan disekitar pulpa alba mendekati kondisi normal (Gambar 5). Pada kelompok kontrol positif menunjukkan pulpa rubra meningkatkan aktivitasnya sehingga terlihat area pulpa rubra yang lebih lebar diantara dua pulpa alba dalam satu lapangan pandang (Gambar 6). Pada kelompok yang diberikan echinacea dosis 0,65 mg tampak pulpa rubra terlihat terdekstruksi akibat dari produksi makrofag yang berlebihan efek dari peningkatan imunomodulator (Gambar 7). Tampak pelebaran yang lebih bermakna pada pulpa rubra, serta destruksi yang semakin meluas akibat dari pemberian dosis echinacea sebagai imunomodulator sebanyak 2x lipat dari dosis



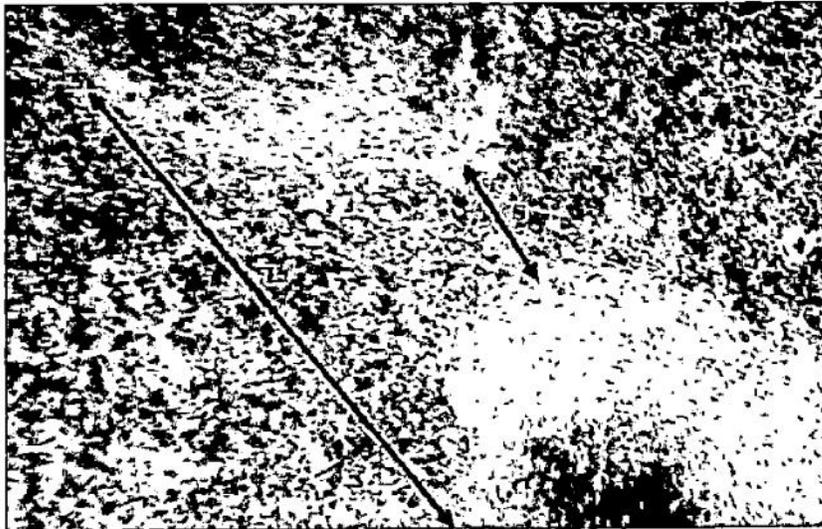
Gambar 5. Struktur histologi lien pada kelompok kontrol negatif. L= jarak terlebar, S= jarak tersempit. Rata-rata Lebar= $\pm 42,0825 \mu\text{m}$, sempit= $\pm 15,0825 \mu\text{m}$.



Gambar 6. Struktur histologi lien pada kelompok kontrol positif. L= jarak terlebar S= iarak tersempit. Rata-rata lebar= $\pm 45.6675 \mu\text{m}$. sempit=



Gambar 7. Struktur histologi lien pada kelompok perlakuan I (Echinacea 0,65 mg). L= jarak terlebar, S= jarak tersempit. Rata-rata lebar= $\pm 75,665 \mu\text{m}$, sempit= $\pm 28,8325 \mu\text{m}$.



Gambar 8. Struktur histologi lien pada kelompok perlakuan II (Echinacea 1,3 mg). L= jarak terlebar, S= jarak tersempit. Rata-rata lebar= $\pm 76,75 \mu\text{m}$, sempit= $\pm 21,8 \mu\text{m}$.

B. PEMBAHASAN

Hasil penelitian terhadap ada tidaknya parasit pada lien mencit mendapatkan hasil yang signifikan dilihat dari uji *Kruskal-Wallis* bernilai $p = 0,027$ ($p < 0,05$). Hal tersebut berarti terdapat perbedaan antar kelompok

penelitian. Hal tersebut membuktikan bahwa *Echinacea angustifolia* sebagai imunomodulator tubuh dapat meningkatkan daya imunitas tubuh. Dosis yang memberikan perbedaan didapatkan dari perbandingan antara kontrol negatif dengan kontrol positif $p= 0,010$ ($p<0,05$), perlakuan I (*echinacea* 0,65 mg) $p= 0,011$ ($p<0,05$), maupun perlakuan II (*echinacea* 1,3 mg) $p= 0,046$ ($p<0,05$). Hal tersebut membuktikan dengan adanya pemberian *Echinacea* yang memiliki kandungan aktif *cichroid acid*, *alkalamide*, serta *polysacarida* yang dapat memacu peningkatan aktivitas makrofag serta meningkatkan fagositosis pada lien sehingga terjadi peningkatan angka parasit pada lien mencit. Peningkatan angka parasit merupakan kompensasi dari peningkatan daya fagositosis terhadap makrofag. Pada uji *Mann-Whitney*, perbandingan antara kontrol negatif dengan ketiga perlakuan kelompok memberikan hasil bermakna. Hal tersebut normal karena pada kontrol negatif tidak diberikan perlakuan apapun, sehingga respon imunitas tubuh lebih lambat bila dibanding kelompok yang diberi perlakuan.

Pada perbandingan antara perlakuan I dengan kontrol positif menunjukkan bahwa parasit pada perlakuan I lebih banyak. Hal tersebut terjadi karena kontrol positif diberikan klorokuin yang merupakan skizontisid darah dengan mekanisme menghambat sintesis enzimatik DNA dan RNA yang mencegah terjadinya replikasi RNA parasit (Goldsmith, 1998). Pada pemberian *echinacea* 0,65 mg menimbulkan efek peningkatan imunitas tubuh yang diakibatkan dari kandungan *poliscaride* di *echinacea*.

Perbandingan dengan perlakuan II tidak memberikan efek pada penurunan

parasit pada lien mencit. Hal tersebut dikarenakan, klorokuin yang mempunyai aksi skizontisida membunuh parasit yang ada di darah, sehingga destruksi darah tidak sebesar pada kelompok perlakuan tanpa diberi klorokuin. Pada perlakuan II, echinacea berupaya meningkatkan imunitas tubuh dengan meningkatkan aktivitas makrofag melalui kandungan *polisakaride* yang mempengaruhi pengeluaran toksin ekstraseluler yang melawan target tumor (Stimpel, 1984).

Dari Tabel 3 dapat dilihat bahwa parasit pada kontrol positif lebih sedikit dari yang lain, sedangkan pada perlakuan I dan perlakuan II parasit yang terlihat banyak. Hal ini menunjukkan bahwa, klorokuin dan echinacea mempunyai target yang berbeda dalam mengeliminasi parasit pada mencit. Klorokuin yang berfungsi sebagai skizontisida darah, sehingga skizon yang ada di darah telah mati terbunuh akibat dari penghambatan pembentukan replikasi RNA parasit (Goldsmith, 1998). Seperti yang telah diketahui, *Plasmodium sp.* memerlukan nutrisi dari pencernaan haemoglobin dan vakuola makanan yang bersifat asam. Haemoglobin yang tercerna dapat menghasilkan asam amino sebagai nutrient bagi parasit dan zat toksik (*ferryprotoporphoryn* / FP IX). Klorokuin yang mempunyai struktur cincin quinolin mampu berikatan dengan *ferryprotoporphoryn* dalam vakuola parasit. Hal tersebut berakibat terhambatnya pembentukan pigmen parasit, dan menghambat ambilan makanan sehingga parasit mati kelaparan. Selain itu, kompleks FP IX ini juga mengganggu permeabilitas parasit dan pompa proton membran parasit (Syamsudin, 2005). Pada echinacea proses

pengeleminasi parasit berbeda. *Echinacea* mempunyai efek untuk meningkatkan imunitas tubuh, sehingga target dari *Echinacea* bukan parasit tetapi imunitas tubuh terutama imunitas non-spesifik (Kuddah, 2009).

Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa *polyscaride* yang terkandung pada *Echinacea* berupa *arabinogalactan* terbukti dapat memacu peningkatan ekhibusi makrofag serta beberapa sitokin antara lain *TNF α* , *IL-1*, *interferon β* (Goel *et al.*, 2002). Peningkatan kemampuan fagosit makrofag pada *Echinacea angustifolia* meningkat 2x lipat (Hertanto, 2009). Hal tersebut terjadi karena ketika aktivitas makrofag meningkat, maka keluar *interferon γ* yang kemudian dapat memacu peningkatan fagositosis serta kenaikan sel limfosit T melalui aksi pengeluaran sitokin (O'Neill *et al.*, 2002).

Tabel 4 menunjukkan perbedaan jarak antara dua pulpa alba baik dari jarak terlebar maupun tersempit. Hasil diambil dari preparat histologi lien mencit dengan satuan μm . Untuk jarak terlebar, perbandingan dengan kontrol negatif memberikan kemaknaan. Hal tersebut terjadi karena pada semua perlakuan terjadi peningkatan imunitas akibat dari infeksi parasit. Pada infeksi parasit malaria, respon imunitas tubuh utama adalah lien. Hal tersebut terjadi karena selain menginfeksi sel kupfer di hepar, *Plasmodium sp* juga menginfeksi eritrosit. Eritrosit yang terinfeksi plasmodium akan mengalami destruksi, sehingga rusak. Eritrosit yang melewati *spleen* untuk didestruksi akibat terinfeksi plasmodium akan memacu munculnya makrofag. Peningkatan aktivitas makrofag pada lien muncul sebagai respon

terhadap adanya infeksi *Plasmodium berghei* di eritrosit. Pada kelompok dengan pemberian echinacea baik dosis rendah maupun dosis tinggi, makrofag yang dihasilkan lebih banyak dari pada kontrol positif. Hal itu ditunjukkan dari nilai probability terhadap perlakuan 1 = 0,021 ($p < 0,05$) yang berarti terdapat perbedaan bermakna. Pada perhitungan manual terdapat pelebaran rata-rata 33,5825 μm . Pelebaran rata-rata 34,6675 μm didapatkan dari perbandingan kontrol negatif dengan perlakuan II yang mempunyai $p = 0,020$ ($p < 0,05$).

Aktivitas yang meningkat dari makrofag dapat dilihat dari perbandingan antara kontrol positif (klorokuin) dengan perlakuan I dan II. Hal ini terjadi karena klorokuin bekerja sebagai skizontisida darah, sehingga darah yang didestruksi oleh lien tidak banyak mengandung parasit. Rata-rata pelebaran jarak dua pula alba pada kontrol positif memiliki nilai terkecil sebesar 33,585 μm . Perlakuan II (echinacea 1,3 mg) memberikan rata yang paling tinggi yaitu 76,75 μm dan memiliki nilai $p = 0,020$, nilai p mendekati $p = 0,05$ sehingga dapat dikatakan dosis yang paling efektif. Penggunaan dosis echinacea sendiri sampai saat ini belum ada standar minimal yang dapat dipakai tetapi penggunaannya dianjurkan maksimal selama 8 minggu karena ditakutkan akan menimbulkan efek hepatotoksik (Cheeseman, 2002).

Mekanisme peningkatan aktivitas makrofag diikuti dengan peningkatan pengeluaran *TNF- α* dan *interferon- γ* yang diinduksi oleh *polisacaride* sebagai kandungan aktif *Echinacea angustifolia*. Pada lien tikus normal yang diberi echinacea selama 4 hari menunjukkan bahwa

peningkatan *lipopolisacaride* meningkat seiring dengan peningkatan dosis yang diberikan (Goel *et al.*, 2002). Semakin tinggi aktivitas makrofag, maka pelebaran jarak pulpa semakin nyata. Pulpa rubra pada *spleen* terlihat sebagai daerah disekitar pulpa alba. Pada pewarnaan giemsa pulpa rubra tampak berwarna merah keunguan dan menyebar.

Perbandingan antara kelompok perlakuan I dan II tidak didapat perbedaan yang signifikan, baik dari uji statistik ataupun di lihat secara manual dengan cara melihat selisih jarak yang dihasilkan (1,085 μm). Perbedaan dosis yang diberikan kurang besar, tidak terdapat perbedaan yang bermakna:

Pada perbandingan antar kelompok untuk subjek jarak tersempit semuanya menyatakan tidak adanya perbedaan. Hal tersebut terjadi karena mencit yang terinfeksi parasit *Plasmodium sp.* akan berusaha meningkatkan aktivitas makrofag di lien. Hal tersebut menyebabkan jarak antara dua pulpa alba yang semakin lebar karena makrofag terdapat di pulpa rubra. Dari pemeriksaan histologi jarak tersempit antara dua pulpa alba pun melebar bila dibandingkan satu dengan yang lain. Nilai \bar{x} rata-rata yang didapatkan