

**EFEK ECHINACEA TERHADAP KEMAMPUAN
FAGOSITOSIS DAN KADAR *NITRIC OXIDE* (NO)
MAKROFAG PADA ADENOKARSINOMA MAMMAE
MENCIT C3H YANG MENGALAMI STRESS**

***THE EFFECT OF ECHINACEA ON THE PHAGOCYTOSIS
ABILITY AND NITRIC OXIDE (NO) LEVEL OF
MACROPHAGE IN BREAST ADENOCARCINOMA OF C3H
MICE IN STRESS***



Tesis

**untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat
Sarjana S-2 dan memperoleh keahlian dalam bidang Ilmu Bedah**

Barkah Fajar Riyadi

**PROGRAM PASCA SARJANA
MAGISTER ILMU BIOMEDIK
DAN
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I
ILMU BEDAH
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2008**

Tesis

**EFEK ECHINACEA TERHADAP KEMAMPUAN
FAGOSITOSIS DAN KADAR NITRIC OXIDE (NO)
MAKROFAG PADA ADENOKARSINOMA MAMMA
MENCIT C3H YANG MENGALAMI STRESS**

Disusun oleh

Barkah Fajar Riyadi

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji pada tanggal 31 Januari 2008 dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui :
Komisi Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II

dr. Djoko Handojo, SpB, SpBOnk
NIP. 130 675 341

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

Mengetahui :

Ketua
Program Studi PPDS I Bedah
Universitas Diponegoro

Ketua
Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Program Pasca Sarjana
Universitas Diponegoro

dr. Sidharta Darsojono, SpB, SpU
NIP. 131 757 921

Prof. dr. Soebowo, SpPA(K)
NIP. 130 352 249

PERNYATAAN

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

Semarang, 31 Januari 2008

Penulis

RIWAYAT HIDUP SINGKAT

A. IDENTITAS

Nama : dr. Barkah Fajar Riyadi
NIM Magister Biomedik : G4A002004
NIM PPDS I Bedah : G3A002004
Tempat / Tgl lahir : Semarang, 16 Oktober 1974
Agama : Islam
Jenis kelamin : Laki-laki

B. Riwayat Pendidikan

1. SD Kanisius SMG Jawa Tengah : Lulus tahun 1987
2. SMPN 3 SMG Jawa Tengah : Lulus tahun 1990
3. SMA Negeri 3 SMG Jawa Tengah : Lulus tahun 1993
4. FK UNDIP Semarang Jawa Tengah : Lulus tahun 2001
5. PPDS I Bedah FK UNDIP Semarang Jawa Tengah
6. Magister Ilmu Biomedik Pasca Sarjana UNDIP Semarang Jawa Tengah

KATA PENGANTAR

Puji syukur dipanjatkan kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan anugerahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul Efek Echinacea Terhadap Kemampuan Fagositosis Dan Aktifitas Nitric Oxide (No) Makrofag Pada Adenokarsinoma Mamma Mencit C3h Yang Mengalami Stress

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

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

Dalam kesempatan ini penulis juga menghaturkan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. dr. Susilo Wibowo, SpAnd, Rektor Universitas Diponegoro Semarang.
2. Prof.dr.Soebowo,SpPA(K), Ketua program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca sarjana Universitas Diponegoro Semarang.

3. dr. Soejoto, SpKK(K), Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
 4. Prof. dr. H. Soebowo, SpPA(K), Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang.
 5. Prof. Dr. dr. Tjahjono, SpPA(K)FIAC, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran UNDIP / RS dr. Kariadi Semarang.
 6. dr. Djoko Handojo, SpB, SpBOnk, Ketua Bagian Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP dr. Kariadi Semarang.
 7. dr. Sidharta Darsojono, SpB, SpU, Ketua Program Studi PPDS I Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
 8. dr. Pudjadi, SU, Ketua Laboratorium Biokimia FK UNDIP Semarang
 9. Tim penguji dan nara sumber yang telah dengan sabar berkenan memberi masukan, arahan dalam penelitian dan penulisan tesis ini.
 10. dr. Selamat Budijitno, Msi.Med, SpB, yang memberikan waktu untuk memberikan inspirasi dan konsultasi.
 11. Semua rekan sejawat Residen Ilmu Bedah FK UNDIP, pegawai Lab. Biokimia FK UNDIP, dan yang tidak dapat kami sebutkan satu per satu.
 12. Ucapan terima kasih khusus kepada kedua orang tua saya yang telah memberikan dukungan moril dan materiil untuk keberhasilan studi saya.
 13. Tesis ini kupersembahkan untuk anaku Alfin Shidqi.
- Penulis menyadari bahwa penelitian ini masih jauh dari sempurna. Kritik dan

saran demi kesempurnaan penelitian ini akan diterima dengan senang hati.

Penulis

berharap penelitian ini dapat berguna bagi masyarakat serta memberi sumbangan bagi perkembangan ilmu kedokteran.

Semarang, 31 Januari 2008

Penulis

ABSTRAK

Latar belakang : *Echinacea purpurea* merupakan salah satu imunostimulator yang dapat meningkatkan imunitas seluler, yang telah tersedia di pasaran. Salah satu respon imunitas seluler adalah peningkatan aktifitas fagositosis makrofag dan kadar *nitric oxide* (NO), karena terbukti NO efektif untuk eliminasi sel-sel tumor. Tujuan dari penelitian ini membuktikan adanya perbedaan kemampuan fagositosis makrofag dan adanya perbedaan kadar NO makrofag pada mencit *adenokarsinoma mamma* yang diberikan *Echinacea purpurea* dengan yang tidak.

Metoda : Dilakukan penelitian eksperimental hewan coba, *desain randomized post test only controle group design*. Sampel 18 ekor mencit C3H yang diinokulasi tumor, dibagi 3 kelompok yang terbagi K-P1-P2, pada P1 diberikan diet standart dan stress sedangkan P2 diberikan diet standart, *Echinacea purpurea* 0,195 mg/gramBB/hari dan stress. Perlakuan dilakukan selama 10 hari, kemudian dilakukan pemeriksaan kemampuan fagositosis dan kadar NO makrofag. Analisis statistik untuk uji beda semua kelompok dengan menggunakan uji *One way Anova* dan uji beda untuk masing-masing kelompok dengan menggunakan *Post Hoc Bonferoni Test*.

Hasil : Didapatkan bahwa semua kelompok mempunyai perbedaan bermakna pada kemampuan fagositosis makrofag ($p=0,001$) dan kadar NO makrofag ($p=0,004$). Uji beda masing-masing kelompok pada kemampuan fagositosis makrofag terdapat perbedaan bermakna antara K ($42,75 \pm 6,49$) dan P1 ($29,83 \pm 2,64$) dengan nilai $p=0,001$ dan antara P1 ($29,83 \pm 2,64$) dan P2 ($38,17 \pm 3,66$) dengan nilai $p=0,019$. Tidak ada perbedaan bermakna antara K ($42,75 \pm 6,49$) dengan P2 ($38,17 \pm 3,66$) dengan nilai $p=0,307$ dan untuk uji beda masing-masing kolompok pada kadar NO terdapat perbedaan bermakna antara K ($5,034 \pm 0,274$) dengan P1 ($4,384 \pm 0,169$) dengan nilai $p=0,004$ dan antara P1 ($4,384 \pm 0,169$) dan P2 ($4,848 \pm 0,169$) dengan nilai $p=0,038$. Tidak terdapat perbedaan bermakna antara K ($5,034 \pm 0,274$) dan P2 ($4,848 \pm 0,169$) dengan nilai $p=0,829$

Simpulan : Terdapat perbedaan yang signifikan pada kemampuan fagositosis dan kadar NO antara makrofag mencit yang diberi *echinacea purpurea* daripada tanpa pemberian *echinacea purpurea*.

Kata kunci : *Echinacea purpurea*, Aktifitas makrofag, Adenokarsinoma mammae.

ABSTRACT

Background : *Echinacea purpurea* is one of the immunostimulators which already available in the market that can increase cellular immunity. One of the cellular immunity respons are the enhancement of macrophage's phagocytosis activity and the increase of nitric oxide level for killing process of tumor cells. The objectives of this study are to differentiate macrophage's phagocytosis activity and the difference of nitric oxide level between mice, inoculated with breast adenocarcinoma, which are receive *Echinacea purpurea* and which are not.

Methods : *The design of this study with randomized post test only control group design. 18 C3H mice which was inoculated by breast adenocarcinomas were divided to 3 groups : K-P1-P2, the P1 group received standart diet and stress, whereas P2 group received standart diet, Echinacea purpurea 0,195 mg/gram/day and stress. The intervention was performed for 10 days. Statistical analysis were using one way ANOVA test and Post Hoc Bonferoni test.*

Results : *There are significant differences in all groups for macrophage's phagocytosis activity ($p=0,001$) and the macrophage's nitric oxide level ($p=0,004$). There was significant difference in differential test in each group for macrophage's phagocytosis activity between K ($42,75 \pm 6,49$) and P1 ($29,83 \pm 2,64$) groups with $p=0,001$ and between P1 ($29,83 \pm 2,64$) and P2 ($38,17 \pm 3,66$) groups with $p=0,019$. There was no significant differences K ($42,75 \pm 6,49$) and P2 ($38,17 \pm 3,66$) with $p=0,307$. The differential test for each groups for nitric oxide level between K ($5,034 \pm 0,274$) and P1 ($4,384 \pm 0,169$) groups and between P1 ($4,384 \pm 0,169$) and P2 ($4,848 \pm 0,169$) groups were significantly different ($p=0,004$ and $p=0,038$, respectively). There was no significant difference between K ($5,034 \pm 0,274$) and P2 ($4,848 \pm 0,169$) groups with $p=0,829$.*

Conclusions : *It is shown in this study for macrophage's phagocytosis activity and the macrophage's nitric oxide level, that the macrophage which treated mice with echinacea purpurea is significantly enhance than non treated mice*

Keyword : *Echinacea purpurea, macrophage's activity, breast adenocarcinoma*

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
ABSTRAK.....	xv
<i>ABSTRACT</i>	xvi
BAB 1. Pendahuluan	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	4
1.3. Tujuan dan Manfaat Penelitian	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.3.3. Manfaat Penelitian	5
1.4 Orisinalitas	6

	Halaman
BAB 2. Tinjauan Pustaka	7
2.1. Adenokarsinoma mamma.....	7
2.1.1. Anatomi dan Histologi	7
2.1.2. Etiologi dan patogenesis	7
2.1.3. Klasifikasi.....	8
2.2. Respon Immunologik Terhadap Sel Tumor Ganas	9
2.2.1. Antigen tumor	10
2.2.2. Peran makrofag dalam respon antitumor	14
2.2.3. Limfosit T sebagai Efektor anti tumor	15
2.2.4. Makrofag teraktivasi	18
2.3. Nitric Oxide (NO).....	22
2.4. Pengaruh Stress Terhadap Respon Imunitas Seluler	24
2.5. <i>Echinacea sp</i> Sebagai Immunostimulator	29
2.5.1. Latar belakang echinacea	29
2.5.2. Farmakologi	30
2.5.3. Mekanisme	31
2.5.4. Hasil-hasil penelitian <i>echinacea</i>	32
2.5.5. Keamanan dan kemanjuran <i>Echinacea</i>	33
2.5.6. Dosis	37
BAB 3. Kerangka Teori, Kerangka Konsep dan Hipotesis	38
3.1 Kerangka Teori	38

3.2	Kerangka Konsep	38
3.3	Hipotesis Penelitian	39
BAB 4	Metode Penelitian	40
4.1	Rancangan Penelitian	40
4.2	Populasi Dan Sampel	41
4.2.1.	Populasi	41
4.2.2.	Sampel	41
4.3	Variabel Penelitian	42
4.3.1.	Variabel bebas	42
4.3.2.	Variabel tergantung	42
4.4	Definisi Operasional	42
4.5	Bahan dan alat	44
4.6.	Alat / Instrumen Penelitian	46
4.7.	Tempat Penelitian	46
4.8.	Prosedur Pengumpulan Data	46
4.9.	Alur Kerja	48
4.10.	Analisis Data	48
4.11.	Persyaratan Etik	49
BAB 5.	Hasil	50
5.1.	Kemampuan fagositosis makrofag dan produksi NO makrofag	50
5.2.	Uji Statistik	51

BAB 6. Pembahasan	56
BAB 7. Simpulan dan Saran	61
7.1. Simpulan	61
7.2. Saran	61
Daftar Pustaka	62
Lampiran	67

GAMBAR

	Halaman
Gambar-1. Reaksi immune <i>T-Cell mediated</i>	17
Gambar-2. Tahapan sitolitik sel target oleh CTLs	18
Gambar-3. Molekul NO	21
Gambar-4. Reaksi kimia terbentuknya <i>Nitric Oxide</i> (NO).....	23
Gambar-5. Mekanisme yang terjadi pada stress dan sistem imun.....	25
Gambar-6. Fungsi sel-sel Th1	28
Gambar-7. Fungsi sel-sel Th2	28
Gambar-8. Grafik boxplot kemampuan fagositosis Makrofag	50
Gambar-9. Grafik boxplot kadar NO	51
Gambar-10. Hasil <i>Post Hoc test</i> kemampuan fagositosis makrofag dengan menggunakan uji <i>Bonferroni</i>	53
Gambar-11. Hasil <i>Post Hoc test</i> produksi NO makrofag dengan menggunakan uji <i>bonferroni</i>	54
Gambar-12. Diagram skematik hasil penelitian.....	55
Gambar-13 Mekanisme yang terjadi pada stress dan sistem imun	57
Gambar-14 Mekanisme yang terjadi pada stress dan sistem imun	58

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel-1. Tumor antigen yang menstimulasi respon sel-T.....	11
Tabel-2. Nilai rata-rata hasil penghitungan <i>kemampuan fagositosis makrofag</i> dan <i>produksi NO makrofag</i> pada tiap kelompok percobaan.....	50
Tabel-3. Uji normalitas data kemampuan fagositosis makrofag pada tiap kelompok percobaan	52
Tabel-4. Uji normalitas data produksi NO makrofag pada tiap kelompok percobaan	52

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran Prosedur Trasplantasi Tumor	67
Lampiran Prosedur Pengambilan Sampel Dari Hewan Percobaan	68
Lampiran Prosedur Pemeriksaan NO	69
Lampiran Prosedur Pemeriksaan Fagositosis Makrofag dengan <i>Latex Beads</i>	71
Lampiran bentuk makrofag yang memfagosit <i>latex beads</i> dan yang tidak	73
Lampiran <i>ethical clearance</i>	74
Lampiran Data Penelitian.....	75

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

Tumor ganas payudara merupakan keganasan yang sering ditemukan diseluruh dunia, dengan insidensi relatif tinggi yaitu sebesar 20% dari seluruh keganasan. Sekitar 600.000 kasus baru setiap tahunnya dan 250.000 kasus diantaranya ditemukan di negara berkembang, sedangkan 350.000 kasus lainnya ditemukan dinegara maju¹. Di Amerika pada tahun 2003 ditemukan 180.000 kasus baru per tahun¹, sedangkan pada tahun 2005 di Amerika ditemukan 211.240 kasus baru dengan jumlah kematian 40.410 wanita per tahun². Insiden tumor ganas payudara di Amerika adalah 100 per 100.000 penduduk per tahun³.

Di Asia secara keseluruhan insidennya 20 per 100.000 penduduk per tahun³. Di Indonesia, insiden tumor ganas payudara adalah 100 per 100.000 penduduk, dan menempati urutan kedua jumlah tumor ganas terbanyak (11% dari jumlah seluruh tumor ganas di Indonesia) setelah tumor ganas leher rahim⁴. Data dari BRK-IAPI (Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia) 1994 menunjukkan bahwa persentase tumor ganas payudara wanita menduduki urutan kedua tertinggi (11,77%) setelah tumor ganas rahim (17,70%) dari semua kasus tumor ganas di seluruh senter Patologi Anatomi di Indonesia⁵. Di Jawa Tengah pada tahun 2005 ditemukan sebanyak 3.884 kasus (36,83%) dari keseluruhan kasus tumor ganas dan merupakan urutan kedua setelah tumor ganas leher rahim. Sedangkan di Semarang pada tahun 2005, ditemukan tumor ganas payudara

sebanyak 749 kasus atau 19,62% dari keseluruhan kasus tumor ganas payudara di Jawa Tengah dan menempati urutan pertama⁶. Insiden puncak pada kelompok umur 45-54 tahun⁷.

Data dari Departemen Kesehatan RI hasil survei kesehatan rumah tangga (SKRT) menunjukkan bahwa angka kematian karena tumor ganas payudara meningkat yaitu pada tahun 1972: 1,4%, tahun 1980:3,4% tahun 1986: 4,3%, dan tahun 1992:4,4%⁸. Penyakit tumor ganas umumnya dipandang oleh masyarakat sebagai penyakit yang tidak dapat disembuhkan dan berakhir dengan kematian disertai dengan penderitaan hebat. Asumsi masyarakat yang demikian ini akan sangat menimbulkan stress bagi penderitanya. Stress sangat berpengaruh terhadap imunitas tubuh melalui stimulasi sekresi kortisol dan adrenalin dari korteks dan medula adrenal. Juga berpengaruh terhadap pelepasan noradrenalin dari postganglion simpatik terminal saraf di pembuluh darah dan organ lymfoid. Efek sistemik dari *glukokortikoid* dan *katekolamin* ini akan menghambat produksi Interleukin-12 (IL-12) dan penurunan produksi *Interferon- γ* (IFN- γ) oleh monosit sehingga akan terjadi penurunan respon imun seluler [terutama makrofag, sitotoksik T-limfosit (CTL), dan sel-NK (=Natural Killer)] yang sangat penting untuk immunitas terhadap sel tumor ganas.⁹

Aktifitas makrofag selain sebagai APC adalah sebagai efektor imun seluler yaitu dengan kemampuan fagositosis dan memproses sel tumor. Mekanisme *killing* terhadap sel tumor adalah dengan proses oksidasi di dalam sel dengan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) melalui jalur *Reactive Oxygen Intermediates* (ROI).¹⁰ [Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate](#) (NADPH)

oksidase akan mengkatalisis molekul oksigen menjadi O_2^- (Superoksida) yang dapat dimetabolisir menjadi ROI seperti H_2O_2 yang sangat toksik. Di lain pihak iNOS akan mengkatalisis L-arginin menjadi sitrulin dan membentuk *Nitric Oxide* (NO) yang selanjutnya dapat dimetabolisir menjadi *Reactive Nitrogen Intermediate* (RNI).¹¹ Pada suatu penelitian memperlihatkan bahwa tingkat ekspresi yang tinggi dari iNOS dapat sebagai sitostatika atau sitotoksik terhadap sel tumor adenokarsinoma. Sinergi ROI dan RNI dapat membentuk spesies antimikroba yang lebih toksik. Sebagai contoh NO yang bereaksi dengan *singlet* O_2 membentuk peroksinitrit ($ONOO^-$) suatu oksidan yang dapat merusak lipid, protein, dan DNA bakteri serta mempunyai peran dalam killing sel tumor. Aktifitas makrofag dapat diukur dengan kemampuan fagositosis dan pengukuran kadar *Nitric Oxide* (NO) makrofag.^{11,12}

Salah satu imunostimulator adalah *Echinacea sp* yang dapat meningkatkan respon imunitas seluler, telah tersedia di pasaran baik dalam bentuk suplemen yang dapat diperoleh dengan mudah. *Echinacea sp* dapat memacu makrofag untuk menghasilkan sitokin yang akan membantu regulasi sistem imun. Kultur makrofag yang mendapat stimulasi *echinacea sp* menunjukkan efek antiviral dibandingkan dengan yang tidak distimulasi.¹⁰ Sitokin yang dihasilkan makrofag darah perifer mencit yang mendapat *Echinacea purpurea* akan mengaktifasi sel T helper untuk berproliferasi. Dilaporkan juga bahwa aktifasi makrofag yang berhubungan dengan aktifasi limfosit T akan meningkatkan produksi $IFN-\gamma$.^{9,13} Belum ditemukan adanya suatu penelitian yang menganalisa efek pemberian *Echinacea sp* pada penderita adenokarsinoma mamma. Oleh karena hal tersebut belum

pernah dicobakan ke manusia, maka peneliti menggunakan mencit C3H sebagai sampel penelitian.

1.2. RUMUSAN MASALAH

Melihat hal-hal tersebut diatas, penelitian ini berusaha menjawab beberapa masalah :

- 1.2.1. Apakah akan terjadi perbedaan kemampuan fagositosis makrofag pada kelompok mencit adenokarsinoma mamma C3H yang mendapatkan stress, antara yang diberi *Echinacea sp* dan yang tidak?
- 1.2.2. Apakah akan terjadi perbedaan kadar NO makrofag pada kelompok mencit adenokarsinoma mamma C3H yang mendapatkan stress, antara yang diberi *Echinacea sp* dan yang tidak?

1.3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

1.3.1. TUJUAN UMUM

Membuktikan bahwa *echinacea sp* efektif dalam upaya meningkatkan respon imun pada penderita tumor ganas yang mengalami stress.

1.3.2. TUJUAN KHUSUS

- 1.2.1. Membuktikan adanya perbedaan kemampuan fagositosis makrofag pada kelompok mencit adenokarsinoma mamma C3H yang mendapatkan stress, antara yang diberi *Echinacea sp* dan yang tidak.

1.2.2. Membuktikan adanya perbedaan kadar NO makrofag pada kelompok mencit adenokarsinoma mamma C3H yang mendapatkan stress, antara yang diberi *Echinacea sp* dan yang tidak.

1.3.3. MANFAAT PENELITIAN

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan informasi mengenai pentingnya penggunaan imunostimulator pada penderita tumor ganas terutama yang mengalami stress sehingga tidak akan menimbulkan dampak lebih lanjut dengan menurunnya sistem kekebalan seluler yang pada akhirnya akan mempercepat pertumbuhan tumor. Penelitian ini juga bermaksud memberikan alternatif dalam upaya menanggulangi efek negatif berupa penurunan respon imunitas seluler tersebut dengan memberikan *echinacea sp* pada penderita tumor ganas terutama yang mengalami stress. Penelitian ini diharapkan juga dapat memberikan landasan untuk penelitian lebih lanjut pada manusia.

1.4. ORISINALITAS

Penulis	Judul / penerbit	Hasil
Burger R, Torres A, Warren R, Caldwell V, Hughes B.	Echinacea-induced cytokine production by human macrophages. Int J Immunopharmacol. 19(7): 371-9.	<i>Echinacea sp</i> dapat meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag alveoler. Disamping itu juga didapatkan

		peningkatan TNF- α , <i>interferon-γ</i> dan pelepasan <i>Nitric Oxide</i> (NO) makrofag alveoler yang dirangsang dengan <i>Lipopolisakarida</i> (LPS) ¹⁰ .
Mishima S, Saito K, Maruyama H, Inoue M, Yamashita T, Ishida T, Gu Y.	Antioxidant and immuno-enhancing effects of <i>Echinacea purpurea</i> . <i>Biol Pharm Bull.</i> 2004;27(7):1004-9	Kultur makrofag yang mendapat stimulasi <i>echinacea sp</i> menunjukkan efek antiviral dibandingkan dengan yang tidak distimulasi ¹³ .
See D, Broumand N, Sahl L, Tilles J.	In vitro effects of <i>echinacea sp</i> and ginseng on natural killer and anti-body-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or AIDS patients. <i>Immunopharmacology.</i> Jan 1997; 35(3): 229-35	Ekstrak <i>echinacea sp</i> secara nyata akan meningkatkan fungsi imun yang imunitas selulernya tertekan seperti pada AIDS ¹⁴ .
Bratman S, Kroll D.	Natural Health Bible. Prima Publishing. 1999: 179-81.	Penelitian klinis <i>double blind</i> terhadap 120 orang <i>common cold</i> yang mendapat <i>echinacea sp</i> dibanding plasebo didapatkan perbaikan klinisnya lebih cepat pada kelompok yang mendapatkan <i>echinacea sp</i> ¹⁵ .
Currier NL, Miller SC.	Natural Killer cells from aging mice treated with extracts from <i>echinacea sp purpurea</i> are quantitatively and functionally rejuvenated. <i>Exp Gerontol.</i> 2000 Aug;35(5): 627-39	<i>E.purpurea</i> dengan komponen-komponen fitokimianya dapat merangsang produksi sel-sel NK demikian juga fungsi sitolitiknya pada binatang coba yang mengalami penuaan ¹⁶ .
Goel V, Chang C, Slama J, Barton R, Bauer R, Gahler R, Basu T.	<i>Echinacea sp</i> stimulates macrophage function in lung and spleen of normal rats. <i>J Nutr Biochem.</i> 2002;13(8):487	<i>Echinacea purpurea</i> lebih meningkatkan sistem imunologis subset CD ⁴⁺ dan CD ⁸⁺ dibanding sel-sel <i>T helper</i> dan sel <i>T supresor</i> sebagaimana hasil penelitiannya dan ini menunjukkan adanya peningkatan respon imunitas seluler ¹⁷ .

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. ADENOKARSINOMA MAMMAE

2.1.1. Anatomi dan Histologi

Kelenjar ini khas untuk golongan mamalia. Jumlah kelenjar berbeda tergantung jenis spesies. Kelenjar payudara dewasa terletak diantara lapisan luar dan dalam fasia pektoralis superfisialis dinding dada depan, berada pada celah iga depan ke dua sampai ke tujuh.

Kelenjar payudara merupakan kelenjar *tubuloalveolar* terdiri atas 15 – 25 lobus yang berfungsi mengeluarkan air susu. Setiap lobus terpisah oleh jaringan ikat padat dan banyak jaringan lemak yang sesungguhnya merupakan kelenjar itu sendiri dengan saluran *laktiferus ekskretorius*.^{18,19}

2.1.2. Etiologi dan patogenesis

Ada 3 pengaruh penting pada tumor ganas payudara :

a. Faktor genetik

Faktor turunan pada suatu keluarga yang terkena tumor ganas payudara. Kelainan ini diketahui terletak dilokus kecil di kromosom 17q21 pada tumor ganas payudara yang timbul saat usia muda .

b. Jenis kelamin.

Tumor payudara umumnya diderita oleh jenis kelamin wanita. Akan tetapi bisa juga ditemukan pada laki-laki dengan insiden yang sangat kecil.

c. Hormon

Kelebihan hormon *estrogen endogen* atau lebih tepatnya terjadi ketidak seimbangan hormon terlihat sangat jelas pada tumor ganas payudara.

d. Faktor lingkungan

Pengaruh lingkungan diduga karena berbagai faktor antara lain: alkohol, diet tinggi lemak, kecanduan minum kopi, dan infeksi virus. Hal tersebut mungkin mempengaruhi gen supresi tumor dari tumor ganas payudara^{18,20}.

e. Umur

Usia saat *menarche* yang terlalu awal atau kurang dari 11 thn, usia *menopause* lebih dari 55 tahun dan usia saat kehamilan anak pertama lebih dari 30 tahun merupakan faktor-faktor resiko tumor payudara yang berhubungan dengan usia.

2.1.3. Klasifikasi

Berdasarkan gambaran histologis, WHO membuat klasifikasi tumor ganas payudara sebagai berikut.

a. Tumor ganas Payudara Non Invasif

1. Karsinoma intraduktus non invasif
2. Karsinoma lobular *in situ*

b. Tumor ganas Payudara Invasif

1. Karsinoma duktus invasif
2. Karsinoma lobular invasif
3. Karsinoma musinosum
4. Karsinoma meduler
5. Karsinoma papiler invasif
6. Karsinoma tubuler
7. Karsinoma adenokistik

8. Karsinoma apokrin¹⁸⁻²⁰

Berdasarkan gambaran gejala klinik, *Klasifikasi TNM* menurut *International Union Against Cancer (UICC)*²¹

Apabila dilihat dari derajat histologi, adenokarsinoma payudara menurut "*Nottingham Modification of The Bloom- Richardson System*"

18-20,22

2.2. RESPON IMUNOLOGIK TERHADAP SEL TUMOR GANAS

Respon imun merupakan hasil Interaksi antara antigen dengan sel-sel *imunokompeten*, termasuk mediator-mediator yang dihasilkannya. Limfosit merupakan unit dasar terbentuknya respon imun karena selain mampu berdiferensiasi menjadi seri lainnya, juga karena berperan dalam mengenal sekaligus bereaksi dengan antigen. Limfosit T dapat bertindak sebagai efektor dalam respon imun, tetapi dapat pula bertindak sebagai regulator respon imun karena kemampuannya dalam mempengaruhi aktifitas sel *imunokompeten* lainnya melalui *limfokin* yang dilepaskannya. Limfosit T-*helper* (Th) akan mempengaruhi produksi *imunoglobulin* oleh limfosit B. Setelah limfosit B berkontak dengan antigen kemudian berproliferasi, sebagian berdiferensiasi menjadi sel plasma yang berfungsi mensintesis serta mensekresi *imunoglobulin*, dan sebagian lagi menjadi limfosit B memori.²³⁻²⁹

Induksi limfosit T dalam respon imun hampir selalu bersifat makrofag "dependent". Makrofag berfungsi untuk memproses *immunogen* dan menyajikannya – sebagai *Antigen Presenting Cells* (APC) – ke limfosit T spesifik (*immune T cells*). Pada penelitian *in vitro* dapat terjadi ikatan limfosit T dengan makrofag.²³⁻²⁹

2.2.1. Antigen tumor

Meski tumor ganas berasal dari jaringan tubuh sendiri, ada beberapa sel tumor yang dapat mengekspresikan molekul yang akan dikenali oleh limfosit B dan T sebagai benda asing. Protein asing pada permukaan sel tumor ganas juga menjadi target sel NK. Sedangkan antigen tumor dapat dikelompokkan menjadi :

- *Tumor-specific antigens* (TSAs)

Adalah tumor antigen yang diekspresikan oleh sel tumor ganas tetapi tidak diekspresikan oleh sel-sel normal. Dan bila antigen ini karakteristik untuk satu jenis tumor / satu clone tumor disebut Unique tumor antigen.

- *Tumor-associated antigens* (TAAs)

Bila tumor antigen juga diekspresikan oleh jaringan normal di dalam tubuh, antigen ini juga dapat menginduksi respon imun tubuh, tetapi biasanya tidak.

Antigen tumor biasanya diekspresikan bersama *Major Histocompatibility Complex* kelas I (MHC kelas I) yang akan dikenali oleh sel limfosit T CD8. Jadi sel tumor sendiri dapat menjadi *Antigen Presenting Cells* (APCs) dari antigennya sendiri. Dan apabila protein antigen ini terlepas ke medium ekstraseluler bersama sel tumor yang mati atau sel tumor yang utuh akan diendositosis oleh APCs dan diekspresikan sebagai MHC tipe II yang akan dikenali oleh limfosit *T Helper* CD4.²³⁻²⁹ Antigen tumor yang diekspresikan bisa berasal dari anomali sintesa protein maupun anomali dari sintesa protein tumor *supressor* pada sel *maligna*. Beberapa tumor antigen yang menstimulasi respon sel-T antara lain dapat dilihat pada tabel-1.

Tabel-1. Tumor antigen yang menstimulasi respon sel-T.²³

Kategori	Contoh
Produk Onkogen	p21^{ras} protein (10% karsinoma pada manusia) p210 (chronic myelogenous leukemia) HER-2/neu , merupakan over ekspresi dari gen normal (karsinoma mamma)
Produk dari gen <i>tumor-supressor</i> yang mengalami mutasi	p53 (\approx 50% ca mamma pada manusia)
Produk dari gen virus yang berkaitan dengan keganasan	SV40T antigen HPV E6 dan E7 (karsinoma serviks pada manusia) EBNA-1 (<i>limphoma Burkitt's</i> , dan karsinoma nasofaring)

Respon Imun pada dasarnya terdiri dari tiga fase :

- Fase Kognitif

Fase kognitif dari respon imun terdiri dari pengikatan *imunogen* ke reseptor spesifik dari limfosit *mature* yang terjadi sebelum stimulasi imunogenik. Limfosit B memiliki molekul antibodi pada permukaannya yang

dapat mengikat protein, polisakarida, atau lipid. Sedangkan limfosit T hanya mengenal peptida yang berikatan dengan MHC pada permukaan sel penyaji. Respon imun diawali dengan peristiwa masuknya *imunogen* dan penyajian *imunogen* tersebut ke reseptor dari limfosit.

b. Fase Aktifasi

Fase aktifasi dari respon imun merupakan rangkaian kejadian dimana limfosit terinduksi sebagai konsekuensi dari pengenalan terhadap *imunogen* spesifik. Limfosit mengalami dua perubahan utama dalam respons terhadap *imunogen*. Pertama, limfosit spesifik berproliferasi sehingga jumlahnya bertambah. Kedua, limfosit tersebut berdiferensiasi menjadi sel yang berfungsi mengeliminasi imunogen asing.¹⁰ Interaksi makrofag yang menyajikan imunogen dengan limfosit T spesifik mengakibatkan makrofag mensekresikan IL-1 yang menstimulasi limfosit T *helper* sehingga menghasilkan IL-2. Limfosit T *helper* berproliferasi sebagai respons terhadap IL-2 tersebut. Limfosit T *helper* tersebut juga menghasilkan *interleukin* lain yang dapat menginduksi berbagai sel lain seperti limfosit B, makrofag, *prekursor* limfosit T sitotoksik, dan sel endotelial.

c. Fase Efektor

Fase Efektor dari respons imun adalah tahap pada waktu limfosit telah teraktifkan oleh Imunogen dan dalam keadaan yang dapat berfungsi mengeliminasi imunogen tersebut. Pada fase Efektor, imunogen tidak lagi berperan kecuali sebagai suatu target untuk dihancurkan²³⁻²⁹ Fungsi sistem imun adalah fungsi protektif dengan mengenal dan menghancurkan sel-sel

abnormal itu sebelum berkembang menjadi tumor atau membunuhnya kalau tumor itu sudah tumbuh. Peran sistem imun ini disebut *immune surveillance*, oleh karena itu maka sel-sel Efektor seperti limfosit B, T-sitotoksik dan sel NK harus mampu mengenal antigen tumor dan memperantarai/menyebabkan kematian sel-sel tumor.²³⁻²⁹

Dari beberapa penelitian diperoleh yang mendukung bahwa peran sistem imun dalam melawan tumor ganas, diantaranya yang mendukung teori itu adalah:

- 1) Banyak tumor mengandung infiltrasi sel-sel mononuklear yang terdiri atas sel T, Sel NK dan Makrofag;
- 2) Tumor dapat mengalami regresi secara spontan;
- 3) Tumor lebih sering berkembang pada individu dengan *imunodefisiensi* atau bila fungsi sistem imun tidak efektif; bahkan *imunosupresi* seringkali mendahului pertumbuhan tumor;
- 4) Dilain pihak tumor seringkali menyebabkan *imunosupresi* pada penderita.

Bukti lain yang juga mendukung bahwa tumor dapat merangsang *sistem* imun adalah ditemukannya limfosit berproliferasi dalam kelenjar getah bening yang merupakan *draining sites* dari pertumbuhan tumor disertai peningkatan ekspresi MHC dan *Interselluler adhesion molecule* (ICAM) yang mengindikasikan sistem imun yang aktif.

Sebaran limfosit disekitar sel tumor secara histologik mempunyai nilai *prognostik* yang baik karena kecepatan pertumbuhan sel tumor akan menurun. Secara *invitro*, beberapa sel imun disekitar sel tumor terbukti dapat membunuh sel tumor disekelilingnya^{26,30}. Hubungan antara banyaknya limfosit yang ditemukan diantara kelompok sel tumor secara histologi dengan prognosis penderita telah ditunjukkan pada tumor ganas leher rahim.³¹

Sel imun yang berada disekitar sel tumor yang berperan dalam perondaan terhadap tumor adalah limfosit T sitotoksik (CTL), Sel NK (*Natural Killer*) dan

makrofag. Setelah mengenal sel tumor sebagai sel asing, ketiga sel imun tersebut akan menghancurkan sel tumor

Sel CTL dan sel NK melakukan cara sitotoksitas yang sama yaitu dengan mengeluarkan perforin, sedangkan makrofag menggunakan cara fagositosis^{10,20,27}.

Dalam memproses antigen tumor *in vivo* akan melibatkan baik respon imun humoral maupun seluler. Sampai saat ini belum ada bukti antibodi secara sendiri dapat menghambat perkembangan / pertumbuhan sel tumor. Dengan demikian respon imun humoral dalam bentuk antibodi terhadap tumor selalu memerlukan bantuan efektor imun seluler^{10,20,26}.

Komponen efektor pada sistem imun yang memiliki kemampuan bereaksi dengan sel tumor ialah limfosit T, *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC), sel NK dan makrofag.²³⁻²⁹

2.2.2. Peran makrofag dalam respon antitumor.

Makrofag juga berperan dalam pertahanan melawan sel tumor baik bertindak sebagai APC dalam mengolah dan mempresentasikan antigen tumor kepada sel *T helper*, maupun bertindak langsung sebagai efektor dengan melisis sel tumor.

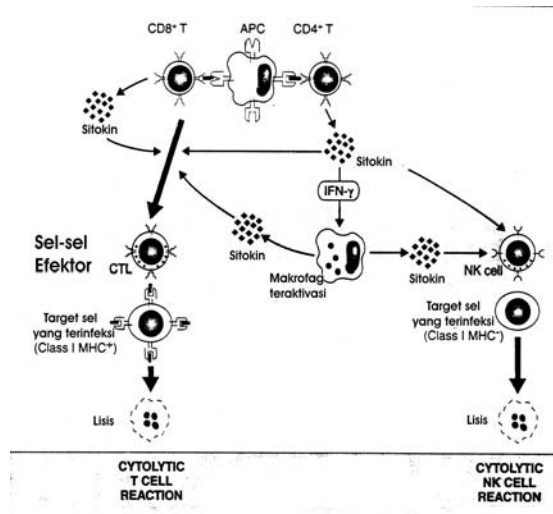
Makrofag yang berperan dalam mekanisme tersebut adalah makrofag aktif yaitu makrofag yang telah diaktifasi oleh *Macrophag Activating Factors* (MAF), suatu sitokin yang dihasilkan limfosit T yang distimulasi antigen. Makrofag yang tidak aktif telah dibuktikan tidak memiliki kemampuan melisis sel tumor.

Seperti juga pada sel NK, mekanisme pengenalan sel tumor sasaran oleh makrofag juga belum jelas. Sedangkan kemampuan untuk berikatan dengan sel tumor terjadi karena sel makrofag juga memiliki reseptor Fc dari IgG, sehingga dapat bekerja sama dengan IgG dalam melisis sel tumor. Penyebab terjadinya lisis sel tumor disebabkan oleh pengaruh enzim lisosomal, metabolit yang reaktif terhadap oksigen dan NO. Makrofag aktif juga mensekresi sitokin antara lain IL-12 dan *Tumor Necrosis Factor* (TNF). IL-12 berperan memacu proliferasi dan aktifasi sel T CD4⁺, sel T CD8⁺ serta sel NK. TNF, sesuai namanya mampu melisis sel tumor melalui cara : 1) TNF berikatan dengan reseptor permukaan dari sel tumor dan secara langsung melisis sel tumor, 2) TNF dapat menyebabkan apoptosis dari sel tumor dengan cara memobilisasi berbagai respon imun tubuh.²³⁻²⁹

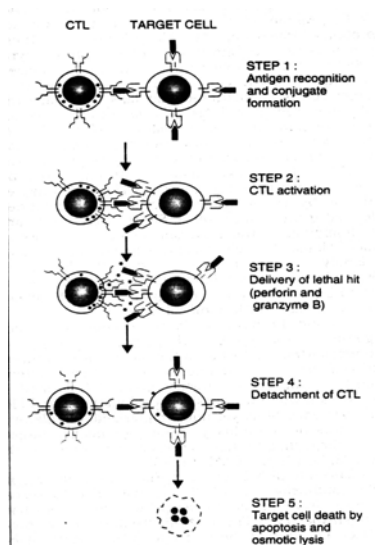
2.2.3. Limfosit T sebagai Efektor anti tumor

Subpopulasi limfosit T, limfosit T-*helper* dan T- sitotoksik sama-sama berperan dalam mengeliminasi antigen tumor. Sel yang mengandung antigen tumor akan mengekspresikan antigennya bersama molekul MHC kelas I yang kemudian membentuk kompleks melalui TCR (*T-cell Receptor*) dari sel T-sitotoksik (CD8), mengaktifasi sel T-sitotoksik untuk menghancurkan sel tumor tersebut. Sebagian kecil dari sel tumor juga mengekspresikan antigen tumor bersama molekul MHC kelas II, sehingga dapat dikenali dan membentuk kompleks dengan limfosit T-*helper* (CD4) dan mengaktifasi sel T-*helper* terutama *subset* Th1 untuk mensekresi *limfokin* IFN- γ dan TNF- α di mana keduanya akan merangsang sel tumor untuk lebih banyak lagi mengekspresikan molekul MHC kelas I, sehingga akan lebih mengoptimalkan sitotoksitas dari sel T-sitotoksik (CD8).²³⁻²⁹

Pada banyak penelitian terbukti bahwa sebagian besar sel efektor yang berperan dalam mekanisme anti tumor adalah sel T CD8, yang secara fenotip dan fungsional identik dengan CTL yang berperan dalam pembunuhan sel yang terinfeksi virus atau sel *alogenik*. CTL dapat melakukan fungsi *surveillance* dengan mengenal dan membunuh sel-sel potensial ganas yang mengekspresikan peptida yang berasal dari protein seluler mutant atau protein virus *onkogenik* yang dipresentasikan oleh molekul MHC kelas I. Limfosit T yang menginfiltrasi jaringan tumor (*Tumor Infiltrating Lymphocyte* = TIL) juga mengandung sel CTL yang memiliki kemampuan melisis sel tumor. Walaupun respon CTL mungkin tidak efektif untuk menghancurkan tumor, peningkatan respon CTL merupakan cara pendekatan terapi antitumor yang menjanjikan dimasa mendatang. Sel T CD4⁺ pada umumnya tidak bersifat sitotoksik bagi tumor, tetapi sel-sel itu dapat berperan dalam respon antitumor dengan memproduksi berbagai *sitokin* yang diperlukan untuk perkembangan sel-sel CTL menjadi sel Efektor. Di samping itu sel T CD4⁺ yang diaktifasi oleh antigen tumor dapat mensekresi TNF dan IFN γ yang mampu meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I dan sensitivitas tumor terhadap lisis oleh sel CTL (Gambar 1). Beberapa tumor yang antigennya diekspresikan bersama dengan MHC kelas II dapat mengaktifasi sel CD4⁺ spesifik tumor secara langsung, yang lebih sering terjadi adalah bahwa APC professional yang mengekspresikan molekul MHC kelas II memfagositosis, memproses dan menampilkan protein yang berasal dari sel-sel tumor yang mati kepada sel T CD4⁺, sehingga terjadi aktivasi sel-sel tersebut. Proses sitolitik CTLs terhadap sel target dengan mengaktifkan penggunaan enzim Perforin dan Granzym, ada beberapa langkah proses sitolitik CTLs terhadap sel target.²³⁻²⁹ (Gambar 2)



Gambar 1. Reaksi immune *T-Cell mediated* ²⁵.



Gambar 2. Tahapan sitolitik sel target oleh CTLs ²⁶.

2.2.4. Makrofag teraktifasi

Proses pengaktifan makrofag bukanlah proses tunggal. Untuk melihat apakah makrofag teraktifasi maka dilakukan pengukuran tertentu misalnya kemampuan *killing* terhadap mikroba. Pengukuran lain misalnya adalah kemampuan *killing* terhadap sel tumor. Aktifasi makrofag diakibatkan adanya peningkatan transkripsi gen-gen. Karena adanya peningkatan ekspresi gen-gen

tersebut maka makrofag dapat melakukan fungsi yang tidak dapat dilakukan oleh sel yang sama dalam keadaan istirahat. Fungsi tersebut antara lain adalah *killing* bakteri yang sudah difagositosis. Sitokin aktifator makrofag yang poten adalah IFN- γ . IFN- γ bukanlah satu-satunya sitokin yang mengaktifasi makrofag, tetapi makrofag juga diaktifkan oleh kontak dengan limfosit T melalui CD 40. Beberapa ciri yang menunjukkan makrofag teraktifasi diuraikan sebagai berikut:

1. Makrofag teraktifasi akan meningkat kemampuan *Killing*-nya terhadap mikroorganisme.

Killing terhadap bakteri menyangkut proses fagositosis dan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Sitokin seperti IFN- γ akan meningkatkan baik endositosis maupun fagositosis oleh monosit. Fagositosis terhadap partikel tertentu dapat ditingkatkan dengan opsonisasi bakteri yaitu dengan melapisi bakteri dengan molekul IgG atau komplemen. IFN- γ menyebabkan ekspresi reseptor dengan ikatan kuat terhadap bagian Fc dari IgG pada makrofag meningkat. Setelah bakteri masuk ke dalam fagolisosom sel maka makrofag akan melakukan pembunuhan dengan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) melalui jalur *Reactive Oxygen Intermediates* (ROI). Proses *killing* terhadap bakteri dibedakan menjadi 2 yaitu untuk bakteri ekstraseluler dan intraseluler. Pada bakteri ekstraseluler, setelah dicerna di dalam *fagolisosom* dengan menggunakan ROS termasuk NO sebagai zat toksik yang berperan dalam pembunuhan bakteri. Prosesnya makrofag ini akan mengenali antigen bakteri tersebut dan mengekspresikannya ke permukaan sel makrofag bersama dengan MHC II,

yang selanjutnya akan dikenali oleh sel T-Helper CD4 yang akan mensekresikan IFN- γ , IFN- γ ini akan mengaktifasi proses pencernaan dalam fagolisosom makrofag. Sedangkan pada bakteri intraseluler, setelah masuk di dalam fagolisosom bakteri ini akan masuk ke sitoplasma makrofag dan *survive* di dalam sel APC tersebut, Bakteri ini akan mempengaruhi sel host untuk mensintesa protein-protein tertentu, yang merupakan antigen yang akan dipresentasikan ke permukaan makrofag bersama MHC I, MHC I ini akan dikenali oleh CTL CD8 yang selanjutnya akan dilakukan proses *killing*.²⁶

2. Makrofag teraktifasi akan memacu inflamasi akut dengan mengeluarkan mediator-mediator inflamasi.

Beberapa mediator seperti *Platelet Activating Factor* (PAF), *prostaglandin* dan *leukotrien* adalah lipid. Beberapa disintesa oleh makrofag sendiri dan yang lainnya dihasilkan dari molekul-molekul plasma sebagai tanggapan atas enzim dan molekul-molekul terkait yang dihasilkan oleh makrofag. Sebagai contoh makrofag dapat menghasilkan *tissue factor* yang dapat menginisiasi *clotting cascade* ekstrinsik. Trombin sebagai protease darah yang teraktivasi selama *clotting cascade* akan menyebabkan netrofil dan sel endotel mensintesa PAF. Pemberian IFN- γ akan meningkatkan kapasitas biosintesis makrofag untuk membentuk mediator semacam *tissue factor*. Akibat mediator-mediator yang dilepaskan maka terjadilah inflamasi lokal.

3. Makrofag teraktifasi akan meningkat efisiensinya sebagai sel APC.

Peningkatan kapasitas presentasi antigen berhubungan dengan ekspresi molekul MHC I maupun MHC II pada permukaan sel makrofag setelah

mengenali/berinteraksi dengan antigen. IFN- γ diketahui sebagai aktifator untuk transkripsi gen-gen MHC kelas II untuk infeksi bakteri, dan MHC I untuk sel tumor dan virus. Fungsi kostimulator juga meningkat pada makrofag yang teraktifasi. Pada keadaan teraktifasi, makrofag akan mengekspresikan molekul-molekul keluarga B7 dan meningkatkan kadar ICAM-1 dan LFA-3. Pada akhirnya makrofag teraktifasi menghasilkan sitokin seperti IL-12 atau IFN- γ yang memacu diferensiasi limfosit. Apabila proses inflamasi dan aktifasi makrofag gagal mengeradikasi mikroba / tumor maka produk-produk makrofag teraktifasi yang frustrasi ini akan dapat menyebabkan reaksi hipersensitifitas tipe IV. Di mana produk ekspresi dari sitokin-sitokin makrofag tersebut akan memodifikasi lingkungan jaringan lokal, selanjutnya dimulailah penghancuran/perusakan jaringan lokal (*Delayed Type Hypersensititivity / T-cell mediated cytotoxicity*).²⁶

4. Makrofag teraktifasi akan membunuh sel-sel tumor.

Meskipun makrofag teraktifasi biasanya dihubungkan dengan mekanisme efektor pada pertahanan terhadap organisme infeksius tetapi dari pengamatan didapatkan bukti bahwa makrofag teraktifasi akan membunuh sel-sel ganas. Bagaimana aktifasi makrofag oleh sel tumor belum diketahui dengan pasti. Mekanisme yang mungkin terjadi adalah adanya pengenalan secara langsung antigen permukaan sel tumor dan aktifasi makrofag dengan IFN- γ . Secara tidak langsung makrofag dapat membunuh tumor dengan berbagai mekanisme, kemungkinan sama dengan mekanisme membunuh bakteri. Mekanisme ini meliputi pelepasan enzim lisosom, *Reactive Oxygen Intermediate (ROI)* dan NO. Makrofag yang teraktifasi mempunyai kemampuan fagositosis dan menghasilkan NO yang akan mencerna sel-sel tumor di fagolisosom seperti pada bakteri. Bedanya fagositosis bakteri dengan tumor adalah pada ekspresi antigen di permukaan sel, di mana pada bakteri antigen-nya akan diekspresikan bersama MHC II, sedangkan pada tumor diekspresikan bersama MHC I.²⁶

2.3. Nitric Oxide (NO)

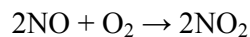
NO merupakan radikal bebas yang sangat reaktif. Bila bereaksi dengan oksigen akan terbentuk peroksinitrit (ONOO⁻). *Nitric Oxide (NO)* merupakan molekul yang relatif tidak stabil dan potensial menjadi *reactive nitrogen species*.



Gambar 3. Molekul NO.³²

NO dibentuk dari biosintesa *arginin* dan oksigen oleh berbagai enzim *Nitric Oxide Synthase (NOS)* dan dengan reduksi nitrat inorganik. Reaksi biologis yang penting pada pembentukan NO adalah *S-nitrosilation*, ikatan kovalen dari NO terhadap *thiol* yang merupakan grup *cysteine* pada protein.³² NOS merupakan enzim yang bertanggungjawab atas sintesa NO yang berasal dari atom nitrogen terminal dari *l-arginin* dengan adanya oksigen dan kofaktor [*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate \(NADPH\)*](#), [*flavin adenine dinucleotide \(FAD\)*](#), [*flavin mononucleotide \(FMN\)*](#), [*heme*](#), [*tetrahydrobiopterin \(BH₄\)*](#).³³

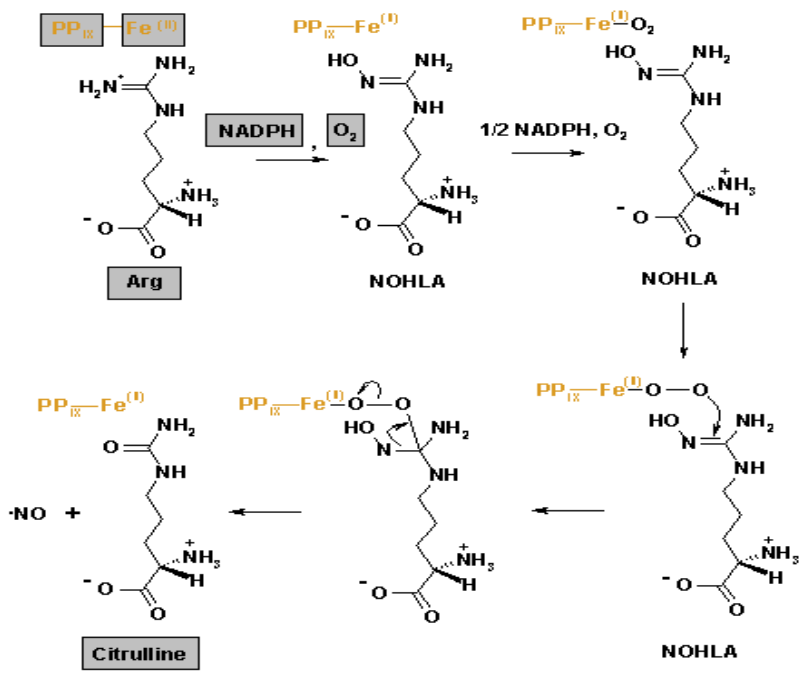
NO bila terekspos oksigen akan menjadi NO₂ :



Konversi ini diperkirakan terjadi melalui *ONOONO intermediate*, di mana pada reaksi ini dapat menghasilkan *reactive nitrogen species* seperti ONOO⁻.

NO juga diproduksi oleh makrofag dan netrofil, yang merupakan sarana penghancur bakteri, virus maupun sel tumor, sebagai bagian dari respon sistem imun seluler pada manusia. Konsentrasi NO dapat diperiksa dengan *ELISA*, di mana akan menghasilkan data dalam panjang gelombang cahaya tertentu.³²

Pada suatu penelitian yang dilakukan pada sel-sel adenokarsinoma *ovarium* SKOV-3, ekspresi NO dapat membunuh 100% sel, sedangkan pada sel adenokarsinoma *kolon* manusia DLD-1 dapat membunuh 54% sel.



Gambar 4. Reaksi kimia terbentuknya *Nitric Oxide* (NO).³²

Pada penelitian tersebut memperlihatkan bahwa tingkat ekspresi yang tinggi dari iNOS dapat sebagai sitostatika atau sitotoksik terhadap sel tumor. *Nitric Oxide* (NO) merupakan molekul yang relatif tidak stabil dan potensial menjadi *reactive nitrogen species* seperti $ONOO^-$, dan *reactive nitrogen*

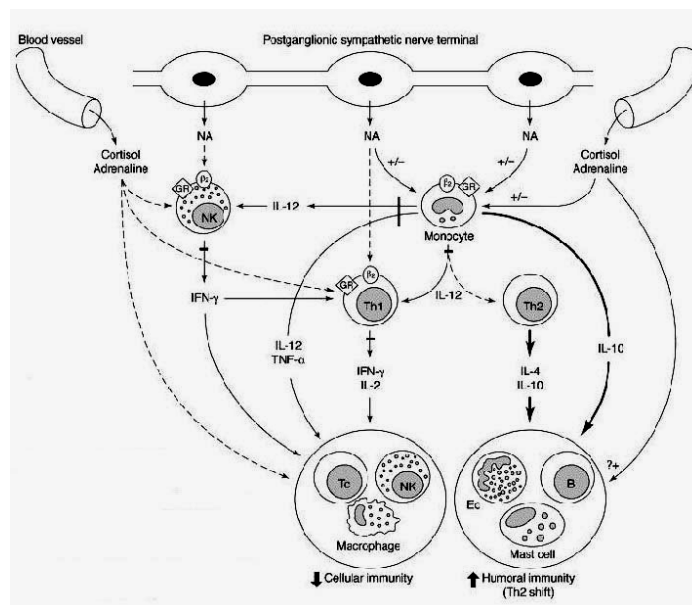
species ini yang mempunyai peran dalam killing sel tumor. Aktifitas makrofag dapat diukur dengan kemampuan fagositosis dan pengukuran kadar *Nitric Oxyde* (NO) makrofag.¹²

2.4. PENGARUH STRESS TERHADAP RESPON IMUNITAS

SELULER

Stress sangat berpengaruh terhadap imunitas tubuh melalui stimulasi sekresi *kortisol* dan *adrenalin* dari korteks dan *medula adrenal*. Juga berpengaruh terhadap pelepasan *noradrenalin* dari *postganglion* simpatik terminal saraf di pembuluh darah dan organ lymfoid. Efek sistemik dari glukokortikoid dan katekolamin ini mempengaruhi pengaturan sitokin tipe 1 dan tipe 2. Stress akan menurunkan produksi sitokin tipe 1 yang dibutuhkan dalam menanggapi infeksi bakterial melalui respon imunitas seluler.⁹

(Gambar 5)



Gambar 5. Mekanisme yang terjadi pada stress dan sistem imun⁹

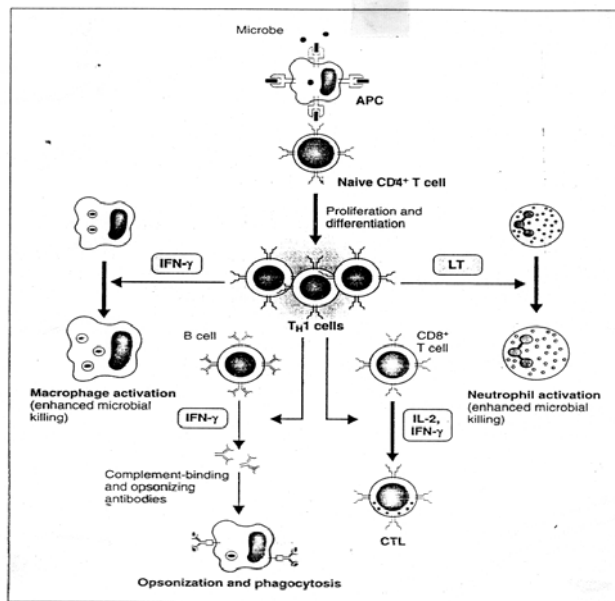
Sel T CD4+ yang telah teraktifasi akan berdiferensiasi tergantung tipe stimulan terutama adalah sitokin yang dihasilkan pada saat pengenalan antigen. Sitokin terpenting yang dihasilkan sel Th1 pada fase efektor adalah IFN- γ . IFN- γ akan memacu aktifitas pembunuhan mikroba sel-sel fagosit dengan meningkatkan destruksi intrasel pada mikroba yang difagositosis. Jadi fungsi pokok efektor Th1 adalah sebagai pertahanan infeksi dimana proses fagositosis sangat diperlukan. Th1 juga mengeluarkan IL-2 yang berfungsi sebagai faktor pertumbuhan autokrin dan memacu proliferasi dan diferensiasi sel T CD8+. Jadi Th1 berfungsi sebagai pembantu (helper) untuk pertumbuhan sel limfosit T sitotoksik yang juga meningkatkan imunitas terhadap mikroba intrasel. Sel-sel Th1 memproduksi LT yang meningkatkan pengambilan dan aktifasi netrofil.^{10,26} (gambar-6)

Karakteristik sitokin yang dihasilkan Th2 adalah IL-4 dan IL-5. Sehingga Th2 adalah mediator untuk reaksi alergi dan pertahanan infeksi terhadap cacing dan arthropoda. Th2 juga memproduksi sitokin seperti IL-4, IL-13 dan IL-10 yang bersifat antagonis terhadap IFN- γ dan menekan aktifasi makrofag. Jadi Th2 kemungkinan berfungsi sebagai regulator fisiologis pada respon imun dengan menghambat efek yang mungkin membahayakan dari respon Th1. Pertumbuhan yang berlebihan dan tak terkontrol dari Th2 berhubungan dengan berkurangnya imunitas seluler terhadap infeksi mikroba intraseluler seperti mikobakteria^{10,26}. (gambar 7)

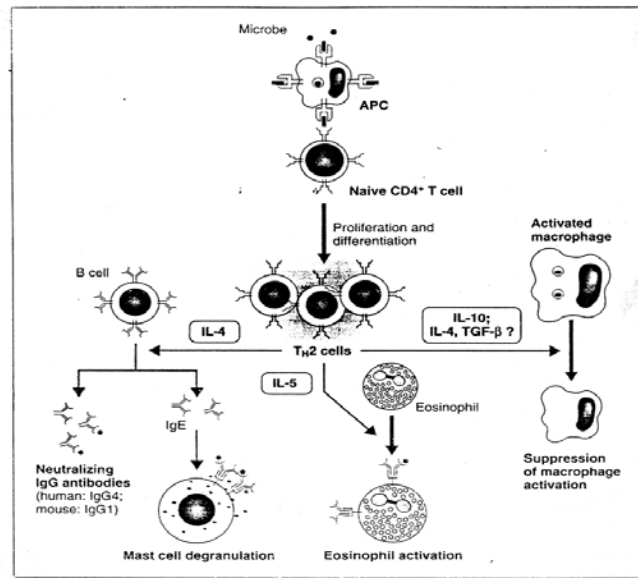
Diferensiasi Sel T CD4⁺ menjadi Th1 dan Th2 tergantung sitokin yang diproduksi pada saat merespon mikroba yang memacu reaksi imunitas. Beberapa bakteri intaseluler seperti *Listeria* dan *Mycobakteria* dan beberapa parasit seperti *Leishmania* menginfeksi makrofag dan makrofag merespon dengan mengeluarkan IL-12. Mikroba lain mungkin memacu produksi IL-12 secara tidak langsung. Misalnya virus dan beberapa parasit memacu sel NK untuk memproduksi IFN- γ yang memacu makrofag mengeluarkan IL-12. IL-12 berikatan dengan Sel T CD4⁺ sehingga memacu untuk menjadi sel Th1. IL-12 juga meningkatkan produksi IFN- γ dan aktifitas sitolitik yang dilakukan oleh sel T sitotoksik dan sel NK sehingga memacu imunitas seluler. IFN- γ yang diproduksi Th1 akan menghambat proliferasi sel Th2 sehingga meningkatkan dominasi sel Th1 ^{10,26}.

Diferensiasi Sel T CD4⁺ menjadi Th2 dipacu oleh IL-4. Peranan IL-4 untuk memacu diferensiasi sel T CD4⁺ menjadi Th2 menimbulkan pertanyaan, darimana datangnya IL-4 sebelum Th2 dipacu karena sel Th2 adalah sumber utama IL-4. Ternyata Sel T CD4⁺ mengeluarkan IL-4 dalam jumlah kecil pada saat aktivasi inisial. Apabila antigen bersifat persisten dan berada dalam konsentrasi tinggi maka konsentrasi lokal IL-4 perlahan-lahan akan meningkat. Jika antigen tidak memicu inflamasi dengan mengeluarkan IL-12 maka hasilnya adalah peningkatan diferensiasi Sel T ke subset Th2 dan terjadi penumpukan efektor Th2. Jadi respon terhadap parasit cacing dan alergen lingkungan yang menyebabkan bergeser ke Th2 adalah stimulasi sel T yang persisten dan berulang-ulang dengan inflamasi yang kecil atau

aktifasi makrofag. Keterangan lain yang diajukan adalah produksi IL-4 oleh tipe sel lain dan perbedaan struktur antigen atau signal yang melengkapi APC selain sitokin. Faktor genetik juga mempengaruhi apakah akan bergeser ke Sel Th1 atau Th2.^{10,26}



Gambar 6. Fungsi sel-sel Th1²⁶



Gambar 7. Fungsi sel-sel Th2 ²⁶

2.5. ECHINACEA Sp *SEBAGAI* IMUNOSTIMULATOR.

2.5.1. Latar belakang *echinacea sp*

Echinacea sp memegang peranan penting pada pengobatan tradisional di Amerika. Nama umumnya adalah *cone flower*, *black susan*, *black sampson*, *Rudbeckia*, *Missouri snakeroot*, *Red sunflower*, *coneflower* ungu dan *narrow-leafed coneflower*. Ekstrak *echinacea sp* sering diresepkan sampai diperkenalkan sulfa pada tahun 1930-an. Tanaman obat ini menjadi populer lagi pada tahun 1980-an.³⁴

Suplemen diet *echinacea sp* berisi ekstrak segar bagian tumbuhan yang berada diatas tanah dan dipanen pada musim berbunga, meskipun bagian lain tumbuhan itu telah digunakan untuk kepentingan medis. Dari 9 spesies, *E.angustifolia*, *E.purpurea* dan *E.pallida* sudah biasa digunakan untuk mengobati

common cold dan infeksi saluran pernafasan atas (ISPA). Meskipun sudah lama *E.angustifolia* diketahui mempunyai efek imunostimulasi yang besar tetapi sekarang tidak banyak digunakan.^{35,36,37} *E.purpurea* lebih mudah dibudidayakan secara komersial, sehingga merupakan spesies yang paling banyak digunakan di Amerika.

Kegunaan *echinacea sp* adalah untuk terapi suportif *common cold*, infeksi traktus respiratorius kronik, pengobatan infeksi *traktus urinarius* bawah dan pengobatan luka superfisial bila diberikan secara eksternal. Pada percobaan manusia dan hewan, sediaan diberikan secara oral atau parenteral untuk menghasilkan efek imunostimulasi. Diantara aksi-aksi fisiologik yang lain, jumlah sel-sel darah putih meningkat, fagositosis granulosit manusia meningkat dan peningkatan temperatur tubuh.³⁸ Aktifitas lainnya bisa bersifat antiviral, antiinflamasi, antibakterial yang secara terus-menerus dilaporkan pada percobaan-percobaan invitro. *Echinacea sp* telah digunakan dengan aman selama berabad-abad. *Echinacea sp* dapat meningkatkan jumlah sel darah putih dan meningkatkan daya tahan tubuh, merangsang sel-sel *killer* dan menunjukkan aktifitas antiviral.³⁹

2.5.2. Farmakologi

Komponen kimia yang terdapat pada *Echinacea sp* meliputi karbohidrat: polisakarida (*arabinogalaktan, xyloglycan, echinacin*), *inulin*; glikosida: asam kafeat dan derivatnya (*chichoric acid, echinacoside, chlorogenic acid*), *cynarin*; alkaloids: *isotussilagine, tussilagine*; alkylamides (alkamides) seperti *echinacein*; polyacetylenes; *germacrene sesquiterpene* alkohol; komponen lain: *glikoprotein, flavonoids, resin*, asam lemak, minyak esensial, *phytosterol* dan mineral. Derivat

asam kafeat, cynarin, polisakarida, dan glikoprotein bersifat polar sedangkan *alkylamides* dan *polyacetylenes* bersifat lipofilik.

Penelitian untuk mencari komponen aktif *Echinacea sp* telah dilakukan sejak lama, tetapi hasilnya masih belum pasti. Belum ada komponen fraksi polar maupun lipofilik dapat melakukan aktifitas imunomodulasi secara sendiri. Beberapa komponen seperti alkilamid, polisakarida dan glikoprotein memegang peranan sebagai “*active principle*”. Saat ini perhatian ditujukan pada 4 komponen sebagai bahan aktif, yaitu derivat asam kafeat, alkilamid, polisakarida dan glikoprotein. Menurut monograf dari *German expert-commission BANZ* No.43,1989, menyatakan *press juice* dari tanaman segar yang sedang berbunga telah dikenal sebagai komponen aktif *E. Purpurea* yang mempunyai nilai terapeutik, termasuk akar *E. purpurea, E. pallida, dan E. angustifolia*. Sampai saat ini penelitian untuk menerangkan komponen yang *-biological active principle-* pada *press juice* ini belum berhasil. Hubungan antara sejumlah bahan yang telah dapat diisolasi seperti *chicoric acid, polisakarida, dan arabinogalaktan* diperlukan untuk menginduksi efek biologik.

Karena komponen kimia yang begitu banyak terdapat pada *Echinacea sp* dan komposisinya berbeda-beda ditiap bagian tanaman dan tiap spesies, maka bahan aktif yang sebenarnya memiliki efek imunomodulasi belum diketahui. Banyak *herbalist* yang menyimpulkan bahwa efek yang muncul karena adanya interaksi diantara komponen-komponen tersebut, tetapi hal ini belum dievaluasi secara formal.⁴⁰

2.5.3. Mekanisme *Echinacea sp* sebagai Imunostimulator

Echinacea sp mempengaruhi sistem imun terutama sistem imun non spesifik. Pemberian *Echinacea sp* meningkatkan respon imun fase awal dan mempercepat terjadinya respon imun adaptif. Burger A. Roger dkk melakukan percobaan secara in vitro menggunakan *fresh pressed juice* dan *dried juice Echinacea sp* dengan konsentrasi 10µg/ml-0,012 µg/ml yang dicampur dengan makrofag darah tepi manusia yang telah diisolasi dan dibandingkan dengan kelompok kontrol (*endotoksin* yang distimulasi dan tidak distimulasi). Dilakukan penghitungan produksi sitokin rata-rata. Dari hasilnya didapatkan bahwa kultur makrofag yang telah dicampur dengan *Echinacea sp* bermakna meningkatkan produksi IL-1, IL-6, IL-10 dan TNF-α (P<0,05), pada semua konsentrasi yang digunakan. Bagaimana mekanisme aktivasi sistem imun melalui jalur sitokin ini oleh *Echinacea sp* belum diketahui. Disamping itu *Echinacea sp* juga diketahui dapat mengaktifasi *Natural Killer* (NK) sel dan *antibody-dependent cellular cytotoxicity* oleh sel mononuklear.⁴⁰

2.5.4. Hasil-hasil penelitian *echinacea sp*

Bahan aktif *echinacea sp* adalah *echinacoside*, polisakarida (*echinacin*), antibiotik *polyacetylenes*, *betaine*, *caffec acid glycosides*, *inulin*, *isobutyl amides*, minyak esensial (*humulene*, *caryophyllene*), *isobutyl+alkylamine*, *resin*, *flavonoid* (pada akar dan batang), ester *sesquiterpene* (*echinadiole*, *epoxyechinadiole*, *echinax-anthole* dan *dihydor-xynardole*).

Penelitian-penelitian terdahulu menunjukkan bahwa *echinacea sp* dapat meningkatkan produksi antibodi, jumlah dan aktifitas sel-sel darah putih sehingga dapat disimpulkan hal-hal inilah yang meningkatkan sistem kekebalan untuk

mencegah sakit.⁴¹⁻⁴⁶ Bahkan pada salah satu buku yang berjudul “*The AIDS Fighters*” menyebutkan bahwa *Echinacea sp* mungkin dapat membantu meningkatkan sistem kekebalan tubuh yang menurun pada penderita AIDS.⁴⁷

Pada tahun 1998 See D dkk. melaporkan studi fase 1 *Echinacea angustifolia* pada 14 pasien dengan HIV (+) yang memiliki nilai CD4 bervariasi dari 6-600/mm³ (rata-rata 269) dan jumlah virus (log 10) bervariasi dari 2,3-5,4 (rata-rata 4,68). Dari 14 partisipan ini, ada yang telah mendapatkan rejimen antiretroviral dan ada yang belum mendapatkan dalam 12 minggu terakhir. Masing-masing kemudian mendapatkan *Echinacea angustifolia* 1000 mg 3kali/hari selama 12 minggu. Setiap 2 minggu dilakukan penilaian terhadap jumlah virus, CD4, aktifitas sel *Natural Killer* (NK) terhadap sel target, penilaian klinis, dan laboratorium. Tidak ada efek hepatotoksik maupun gangguan metabolisme pada pemakaian lama baik secara klinis maupun laboratorium yang diamati selama penelitian. Pada minggu ke 12 tidak terdapat perbedaan bermakna jumlah CD4 dibandingkan nilai awal, akan tetapi terdapat penurunan jumlah virus 0,32 log 10 (rata-rata 4,36, P<0,05). Tidak ada perubahan aktifitas sel NK. Dari pilot study ini disimpulkan bahwa *Echinacea angustifolia* aman digunakan dan bermakna dalam menurunkan jumlah virus pada pasien dengan HIV (+).⁴⁰

2.5.5. Keamanan dan kemanjuran *echinacea sp*

Meskipun sekolah farmasi di *Richmond, Virginia* sudah menyatakan bahwa *echinacea sp* aman, namun para peneliti dalam edisi *Pharmacotherapy* pada bulan Juni 2000 menegaskan lagi bahwa *echinacea sp* aman untuk

digunakan. Pasien-pasien tanpa kontraindikasi tidak perlu dicegah bila akan menggunakan sediaan *echinacea sp* untuk mengobati *commom cold*.⁴⁸

Penelitian *RCT double blinded* tahun 1999 juga mendukung kemanjuran dan keamanan *echinacea sp*. Para peneliti Jerman meneliti 238 kasus *common cold*. Pasien –pasien diberi *echinacea sp* atau plasebo selama 7 sampai 9 hari dan ditanya beratnya gejala *common cold* menggunakan skala yang berjumlah 10. Dokter juga memeriksa pasien di hari ke-4 dan ke-8. Pasien-pasien yang menderita sakit dalam skala sedang pada awalnya menunjukkan perbaikan sebesar 55% pada kelompok yang mendapat *echinacea sp* dibandingkan 27% pada kelompok plasebo. Pasien yang mendapat terapi lebih awal akan menunjukkan perbaikan yang lebih cepat, pada umumnya pada hari ke-2, dilanjutkan sampai akhir pengobatan. Semua perbaikan terlihat pada 3 hari pertama pada kelompok yang mendapat *echinacea sp* dan tidak ada efek serius yang dilaporkan. Para peneliti menyimpulkan bahwa *echinacea sp* adalah aman digunakan. Mereka juga menggarisbawahi bahwa kegunaan terapetikanya adalah cepatnya onset penyembuhan gejala *common cold* dan perlunya menggunakan *echinacea sp* sesegera mungkin bila gejala-gejala *common cold* mulai dirasakan.⁴⁹

Keampuan *echinacea sp* mengatasi flu sudah banyak dibuktikan. Hasil uji invitro yang dilakukan A. Vogel bekerja sama dengan tim riset dari *Eidgenossische Technishe Hochschule* (Institut Tehnologi Federal Swiss), *echinacea sp* mengandung senyawa *alkilamid*. Senyawa ini menetap dalam reseptor CB2 dari sel imun. *Alkilamid* membantu megendalikan TNF- α , pengaktif sistem kekebalan tubuh. Senyawa lainnya antara lain asam *sikorat*, *polisakarida*,

glikoprotein, flavonoid dan minyak esensial. Senyawa-senyawa ini berperan menghambat peradangan, pertumbuhan bakteri, virus, dan cendawan. Produk *echinacea sp* yang dihasilkan A.Vogel diakui pemerintah Swiss sebagai obat karena telah teruji. Pengujian dilakukan pada 77 pasien dengan influenza yang dirawat di beberapa rumah sakit di Austria. Masing-masing pasien diberi asupan ekstrak *echinacea sp* cair 3 kali sehari masing-masing 30 tetes. Dua pekan kemudian kondisi pasien diperiksa. Hasilnya angka indeks gejala 76 pasien menurun secara signifikan. Ini menandakan kondisi pasien semakin membaik. Seorang pasien memburuk kondisinya karena menghentikan terapinya. *Echinacea sp* yang diolah dalam bentuk tablet juga teruji. Saat itu A. Vogel bersama dengan dr. R. Brinkeborn, dokter spesialis penyakit infeksi di rumah sakit Uppsala, Swedia. Dari 41 pasien flu yang diberi asupan ekstrak *echinacea sp* berdosisi 2 tablet (setara dengan 6,78 mg ekstrak *echinacea sp*) 3 kali sehari, 79 % pasien membaik setelah perlakuan 8 hari.⁵⁰

Di tanah air sendiri, *Echinacea purpurea* sebenarnya bukan pendatang baru. Pada penelitian yang dilakukan oleh Balai Penelitian Tanaman rempah dan aromatik (Balitro), tanaman asal Amerika Utara itu ternyata adaptif dikembangkan di Indonesia dengan ketinggian 450-1100 m diatas permukaan laut (dpl). PT. Sidomuncul menanamnya didaerah boyolali dengan ketinggian 450 dpl. *Echinachea sp* dipanen pada umur 3 bulan. Selain di boyolali *echinacea sp* juga ditanam di Tawangmangu Jawa Tengah. Kandungan *purple coneflower* tersebut sama dengan yang dibudidayakan di luar. Total *fenol*, misalnya, mencapai 4%, seperti yang dipersyaratkan Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM).

Echinacea sp selain sebagai imunostimulator juga sebagai antioksidan. Obat yang berperan sebagai antioksidan biasanya juga berkasiat sebagai hepatoprotektor. Sering dikombinasikan dengan tanaman obat lain seperti yang diproduksi oleh salah satu produsen obat, dengan komposisi *Echinacea sp* 150 mg, *Sylibum marianum* (35 mg), *Curcuma xanthorium* (20 mg). Perusahaan farmasi tersebut melakukan riset bekerja sama dengan baian hepatologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Penelitian dilakukan terhadap 30 pasien hepatitis C kronis. Masing-masing pasien perlakuan , kadar rata-rata SGOT pasien yang semula 91,2 u/L, turun menjadi 33,6 u/L, begitu juga dengan kadar SGPT dari 92,4 turun menjadi 35,9 u/L.

Pada penelitian yang dilakukan bagian hepatologi FKUI, menurunkan obat itu tidak mengurai jumlah virus hepatitis yang bersarang ditubuh pasien. Tetapi jumlah rata-rata sel T dan sel NK pasien meningkat meskipun tidak terlalu bermakna, namun aktifitas sel NK dan Sel T merupakan indikator sistem kekebalan tubuh.

Penelitian lain di Indonesia melalui uji klinis yang dilakukan terhadap 7 pasien bronkitis, 6 pasien tuberkulose, 5 pasien bronkhiektasis, 4 pasien COPD, 3 pasien Asma, dan 1 pasien bronkopneumonia di RS Pertamina, Jakarta. Setelah mendapatkan terapi *echinacea sp*, 76,9 % pasien menyatakan kondisi tubuhnya lebih segar, 57,7 % menjadi jarang batuk, 3,85 % nyeri dada berkurang, dan 15,4 % rongga dada membaik.⁵⁰

Keamanan penggunaan *Echinacea sp* selama kehamilan belum dapat dijelaskan, hanya sedikit data relevan yang menunjang. Michael Gallo dkk.

melaporkan *prospective controlled study* untuk menilai keamanan fetus pada penggunaan *Echinacea sp* selama kehamilan. Penelitian melibatkan wanita yang mengikuti *Motherisk Program* di Toronto, yang menggunakan *Echinacea sp* dalam kurun waktu 1996-1998. Wanita yang menggunakan *Echinacea sp* selama kehamilan (206 orang, 112 orang, (54%) menggunakan pada trimester pertama dan 17 (8%) menggunakan selama 3 trimester), dipantau secara prospektif dan dibandingkan dengan kelompok kontrol (wanita hamil yang mengikuti *Motherisk Program* yang tidak menggunakan *Echinacea sp* atau menggunakan antibiotik nonteratogenik), 206 orang. Dilakukan perbandingan terhadap kejadian malformasi mayor, minor, keguguran dan komplikasi neonatal pada kedua kelompok.

Pada perbandingan antara kelompok *Echinacea sp* dengan kelompok kontrol didapatkan jumlah kelahiran hidup (195:198), aborsi spontan (13:7), aborsi terapeutik (1:1) dan malformasi mayor dan minor (6:7). Tidak ada perbedaan secara statistik terlihat pada kedua kelompok baik dalam keluaran kehamilan, metode persalinan, penambahan berat badan ibu, usia kehamilan, berat lahir ataupun *distres fetus*. Angka kejadian malformasi antara kedua kelompok juga tidak berbeda bermakna secara statistik. Disimpulkan bahwa penggunaan *Echinacea sp* dalam kehamilan, selama *organogenesis*, tidak berhubungan dengan peningkatan risiko *malformasi* mayor.^{40,51}

Efek stimulasinya berubah bila digunakan berkepanjangan, seharusnya jangan digunakan secara terus-menerus selama 8 minggu. Setelah penghentian obat, bisa di *restart* lagi untuk pengobatan 8 minggu berikutnya.⁵²

2.5.6. Dosis

Preparat *echinacea sp* terdiri dari bermacam-macam bentuk sehingga dosisnya juga bervariasi. Dosis untuk berbagai jenis sediaan tersebut adalah: ⁵³

Akar kering = 0.5 – 1.0 gram diberikan 3X sehari

Tincture (1:5) = $\frac{1}{2}$ - 1 sendok teh diberikan 3X sehari

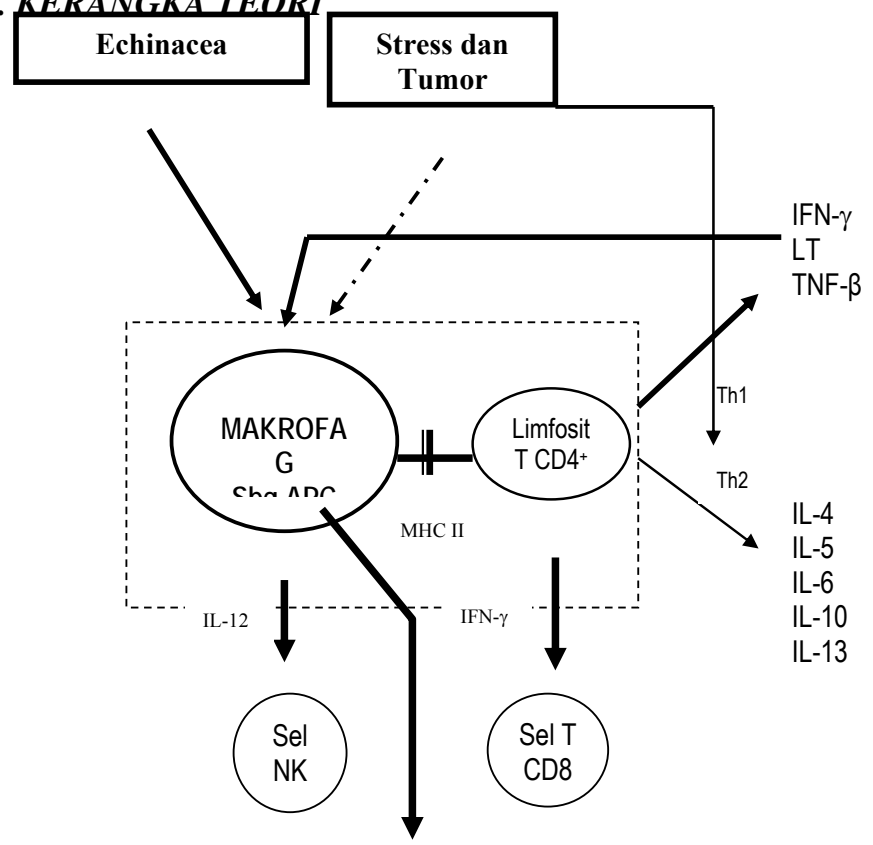
Ekstrak bubuk kering (standarisasi 3.5% echinacoside) = 300 mg diberikan 3X sehari

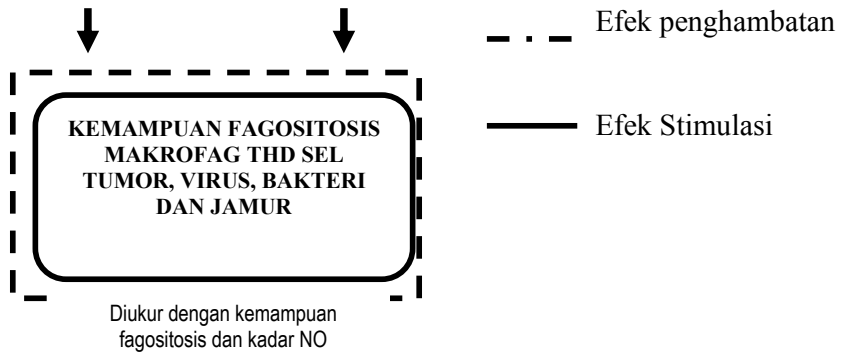
Ekstrak cair (1:1) = $\frac{1}{4}$ sampai $\frac{1}{2}$ sendok teh diberikan 3X sehari

Freeze dried = 1 sampai 2 kapsul atau tablet diberikan 3X sehari

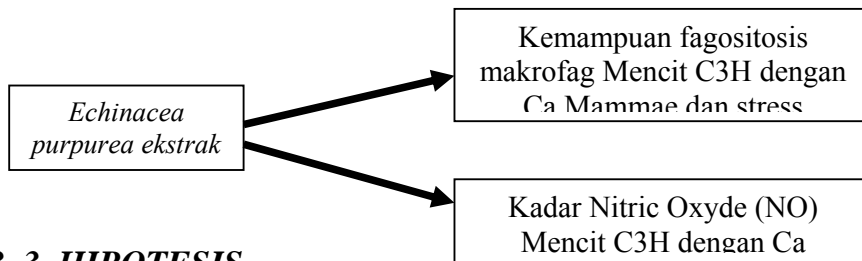
BAB 3
KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS.

3. 1. KERANGKA TEORI





3. 2. KERANGKA KONSEP



3. 3. HIPOTESIS

3.3.1. Akan terjadi perbedaan kemampuan fagositosis makrofag pada kelompok mencit adenokarsinoma mamma C3H yang mendapatkan stress, antara yang diberi *Echinacea sp.*

3.3.2. Akan terjadi perbedaan kadar NO makrofag pada kelompok mencit adenokarsinoma mamma C3H yang mendapatkan stress yang diberi *Echinacea sp.*

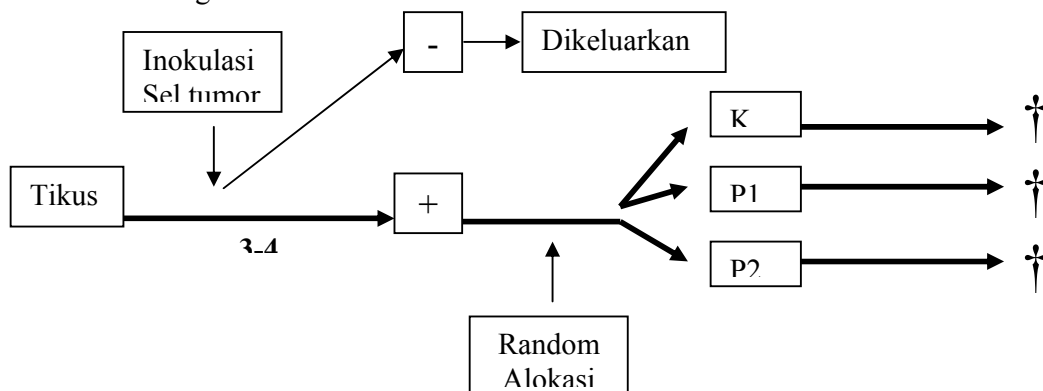
BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan *The Post Test – Only Control Group Design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian.⁵⁴ Percobaan dilakukan dengan rancangan acak lengkap (*Completely Randomized Design*), randomisasi sederhana dilakukan menggunakan komputer. Kelompok penelitian dibagi menjadi 3 yaitu kelompok kontrol (K), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2). Adapun pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

- K : Kelompok kontrol, mencit yang diinokulasi sel tumor
- P1 : Kelompok perlakuan 1, mencit yang diinokulasi sel tumor, setelah timbul benjolan, mendapat stressor renjatan listrik.
- P2 : Kelompok perlakuan 2, mencit yang diinokulasi sel tumor, setelah timbul benjolan, selain mendapat stressor renjatan listrik juga mendapat ekstrak *Echinacea purpurea*

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut: Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



4.2. POPULASI DAN SAMPEL

4.2.1. POPULASI

Populasi penelitian ini adalah mencit betina strain C3H Strain ini dipilih karena selain sudah sering digunakan untuk penelitian tumor juga dapat diamati respon imunologiknya. Sedang penentuan jenis kelamin mencit yang dipakai pada penelitian ini adalah karena faktor hormonal karena tumor yang digunakan pada penelitian ini adenokarsinoma mammae.

4.2.2. SAMPEL

Hewan coba adalah mencit strain C3H yang diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Kriteria Inklusi:

- a. Mencit betina
- b. Strain C3H
- c. Berat badan 20-30 gram setelah aklimatisasi.
- d. Tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak

Kriteria Eksklusi:

- a. Tidak tumbuh tumor setelah dilakukan inokulasi
- b. Selama inokulasi dan perlakuan mencit tampak sakit (gerakan tidak aktif)

Besar sampel menurut WHO tiap kelompok minimal 5 ekor, dengan cadangan 1 ekor⁵⁵, pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok 6 ekor mencit.

Sebelum digunakan dalam penelitian, 18 ekor mencit diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu. Selama dalam pemeliharaan mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Untuk menghindari bias terhadap berat badan maka dilakukan penimbangan mencit sebelum mendapat perlakuan.

4.3. VARIABEL PENELITIAN

4.3.1. Variabel bebas:

Sebagai variabel bebas dalam penelitian ini adalah

1. Pemberian ekstrak *Echinacea purpurea*

4.3.2. Variabel tergantung:

1. Kemampuan fagositosis makrofag
2. Kadar *Nitric Oxide* makrofag

4.4. Definisi Operasional:

1. *Electric foot shock* dilakukan dengan cara mengalirkan arus listrik pada lempeng tembaga di dasar kandang perlakuan tempat kaki mencit berpijak. Aliran listrik akan mengejutkan mencit. Besar arus listrik 220 VAC antara 1 – 3mA.

Jumlah renjatan adalah sebagai berikut:

Hari ke-	Renjatan	sesi
1	4	2
2	8	2
3	10	3
4	12	3
5	14	4
6	16	4
7	18	5
8	20	5
9	22	6
10	24	6

Lama 1 kali renjatan = 1 kejut, diberikan interval 4 menit untuk tiap sesi.

Hari pertama diberikan 4 renjatan-2 sesi, hari kedua diberikan 8 renjatan-2 sesi bukannya 6 renjatan-2sesi, karena peningkatan sebanyak 2 renjatan x 2 sesi untuk hari kedua dianggap terlalu kecil.

Pemilihan stressor berupa renjatan listrik pada alas kaki dengan *electric foot shock* karena intensitas dapat terukur dengan tepat, penjalaran arus listrik dari kaki ke seluruh tubuh termasuk ke otak berjalan cepat dan pemulihan setelah renjatan tidak ada efek ikutan. Banyak penelitian telah dilakukan dengan renjatan listrik sebagai stressor untuk menimbulkan stress dan memberi dampak pada target spesifik, telah terbukti dan menunjukkan akurasi yang tepat. Sedangkan pemilihan lama waktu 10 hari adalah berdasarkan penelitian terdahulu bahwa kadar kortisol mulai meningkat pada hari ke-4, mencapai puncak pada hari ke-7 dan mulai

menurun pada hari ke-14. Sehingga dapat diharapkan pengambilan unit sampel pada hari ke-11 sudah terjadi modulasi sistem imun.⁵⁶

2. Pemberian *Echinacea purpurea* (ekstrak bubuk kering dengan 3.5% echinacoside) dilakukan melalui sonde dengan dosis 0,195 mg/gramBB/hari atau 5,85 gram/hari untuk mencit dengan BB 30 gram yang dilarutkan dalam 2 ml aquadest steril.
3. Kemampuan fagositosis makrofag adalah prosentase sel yang memfagosit partikel *latex beads* dihitung dari 200 sel yang diperiksa dengan mikroskop cahaya, dengan 3x penghitungan, dan hasilnya dirata-rata.
4. Kadar *Nitric Oxide* makrofag diukur dengan metoda ELISA dengan satuan ng/ml.

4.5. BAHAN DAN ALAT

- Mencit betina *strain* C3H dengan umur 6 bulan, dan berat 20 - 30 gram. Mencit diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Adenokarsinoma diperoleh dari mencit donor. Tumor yang mengandung sel adenokarsinoma dari mencit donor akan ditransplantasikan ke mencit resipien. Sebelum ditransplantasikan, tumor dari mencit donor akan diincisi biopsi dan dilakukan pemeriksaan histologi untuk mengkonfirmasi jenis tumornya

- Bahan-bahan untuk pemeriksaan imunologi:

- *Peritoneal Exudate Cells* (PEC) dari mencit betina strain C3H (hewan percobaan).
- Ekstrak *Echinacea sp* yang diperoleh langsung dari perusahaan farmasi yang memproduksi *echinacea sp*.
- RPMI 1640.
- *Foetal Bovine Serum* (FBS)
- *Phosphate Buffer Saline* (PBS)
- Metanol, Larutan *Giemsa*, *Tripan Blue*
- Aquadest steril
- Bahan transplantasi jaringan tumor pada mencit
 - Alkohol 70 %
 - Larutan Garam fisiologik
 - Es batu
 - Mencit donor bertumor
 - Mencit resipien

4.6. ALAT/ INSTRUMEN PENELITIAN.

- | | |
|--------------------|------------------------------|
| ● Mikroskop | ● Inkubator buatan Schwabach |
| ● Spuit 1cc, 10 cc | ● Termometer |

- Tabung Sentrifus 15 cc, 50 cc
- Lampu Bunsen
- Cawan Petri
- Gunting bengkok dan lurus
- Kanul mulut
- Pipet Pasteur & Pipet Eppendorf
- ELISA reader
- *Laminar Flow*
- Timbangan elektronik dan biasa
- 18 buah kandang hewan coba individual
- Alat sentrifugasi yang dilengkapi pengatur suhu
- Tabung reaksi dengan alas datar
- Tabung reaksi biasa
- Kaca benda
- Trokar
- Pinset, scalpel
- *Yellow & Blue tape*
- Autoclav
- *Colony Counter*
- Cover slip bulat Ø 13mm

4.7. TEMPAT PENELITIAN

Penelitian dilakukan di:

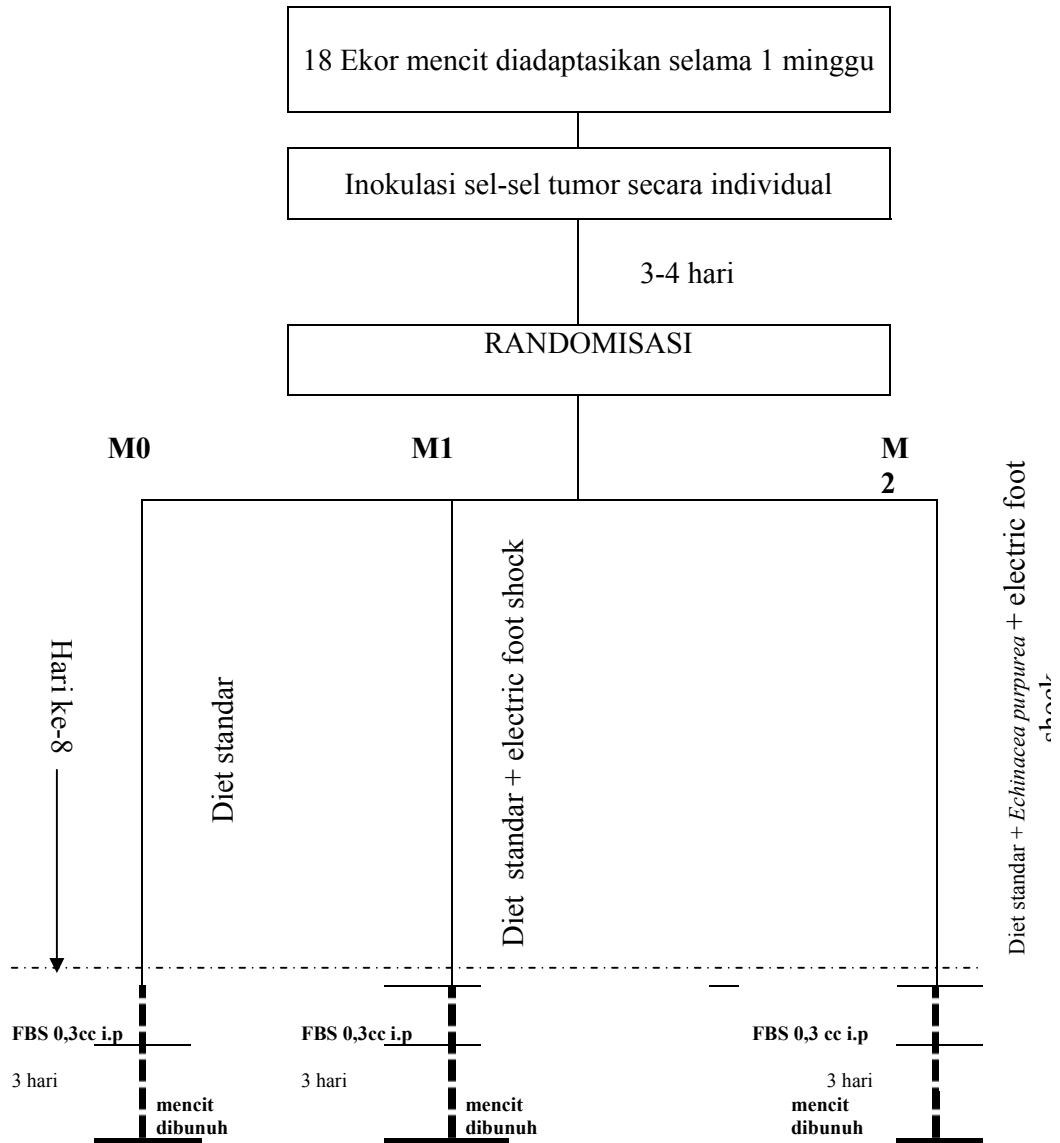
- Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Undip.
- Laboratorium Fisika Medik Fakultas Kedokteran Undip.
- Laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran Undip.

4.8. PROSEDUR PENGUMPULAN DATA

- 18 ekor mencit betina *strain* C3H dengan umur 6 bulan, dan berat 20 - 30 gram diaklimatisasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi pakan standar selama satu minggu secara ad libitum.
- Dilakukan inokulasi sel-sel tumor pada masing-masing mencit kemudian ditunggu selama 3-4 hari.

- 18 ekor mencit yang telah terpapar tumor tersebut kemudian dibagi menjadi 3 kelompok masing-masing 6 ekor yang ditentukan secara acak dengan komputer, masing-masing kelompok dikandangkan secara individual.
- Masing masing kelompok mendapatkan pakan standar yang sama.
- Kelompok pertama hanya mendapatkan makanan standar, pada hari ke-8 disuntikkan *Foetal Bovine Serum (FBS)* 0,3cc secara i.p. 3 hari kemudian mencit dibunuh untuk diperiksa kemampuan fagositosis dan kadar *Nitric Oxide (NO)* makrofag.
- Kelompok kedua selain mendapatkan makanan standar juga mendapatkan stressor renjatan listrik menggunakan *electric foot shock*, pada hari ke-8 disuntikkan *Foetal Bovine Serum (FBS)* 0,3cc secara i.p. 3 hari kemudian mencit dibunuh untuk diperiksa kemampuan fagositosis dan kadar *Nitric Oxide (NO)* makrofag.
- Kelompok ketiga selain mendapatkan stressor renjatan listrik menggunakan *electric foot shock* juga mendapatkan ekstrak *Echinacea purpurea*, pada hari ke-8 disuntikkan *Foetal Bovine Serum (FBS)* 0,3cc secara i.p. 3 hari kemudian mencit dibunuh untuk diperiksa kemampuan fagositosis dan kadar *Nitric Oxide (NO)* makrofag.

4.9. ALUR KERJA



4.10. ANALISIS DATA

Data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan boxplot.

Untuk mengetahui normalitas data dilakukan uji normalitas menggunakan

Shapiro-Wilk test. Karena data berdistribusi normal maka dilakukan uji *One Way Anova* untuk melihat adanya perbedaan pada ketiga kelompok perlakuan. Besarnya perbedaan masing-masing kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan *Post Hoc Test Bonferoni*. Semua analisis statistik tersebut dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS 10.05 for windows. Nilai signifikansi pada penelitian ini adalah apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai $p < 0,05$.

4.11. PERSYARATAN ETIK

Implikasi etik pada hewan, pengelolaan binatang coba pada penelitian ini mengikuti animal ethics. Hal yang perlu dilaksanakan sesuai dengan etik antara lain perawatan dalam kandang, pemberian makan minum (*ad libitum*), aliran udara dalam ruang kandang, perlakuan saat penelitian, menghilangkan rasa sakit, pengambilan unit analisis penelitian, dan pemusnahannya.

BAB 5

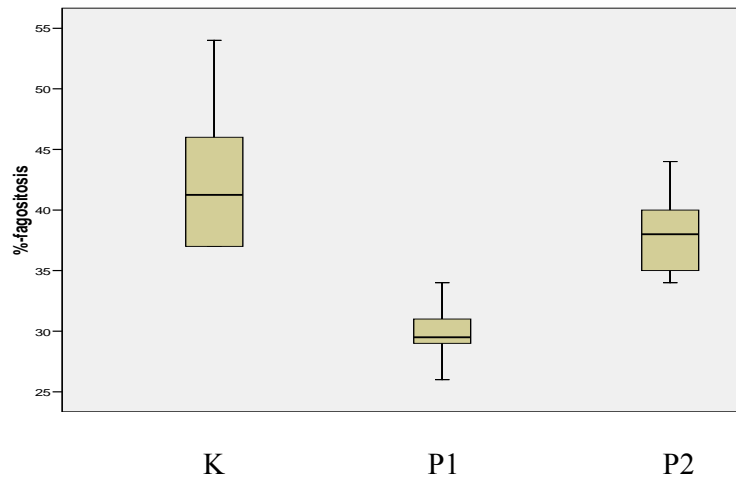
HASIL

5.1. Kemampuan fagositosis dan Produksi NO makrofag

Kemampuan fagositosis makrofag diukur dari kemampuan makrofag memfagositosis *Latex beads*. Kemampuan ini diukur dengan persentase jumlah makrofag yang memfagositosis *Latex beads*. Sedangkan aktifitas *Nitric Oxyde* (NO) makrofag diukur dari produksi NO makrofag. Hasil pengukuran persentase fagositosis makrofag dan produksi NO makrofag dapat dilihat pada tabel-2.

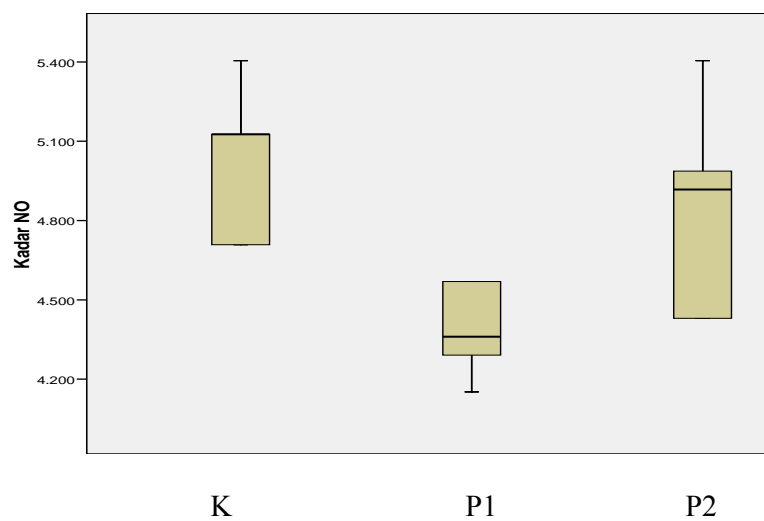
Tabel-2. Nilai rata-rata hasil penghitungan kemampuan fagositosis dan produksi NO makrofag pada tiap kelompok percobaan

	Kontrol	Perlakuan 1	Perlakuan 2
% fagositosis; rerata (SD); median	42,75; (6,49);41,25	29,83; (2,64);29,50	38,17; (3,66);38,00
Produksi NO; rerata (SD); median	5,034; (0,274);5,126	4,384; (0,169);4,360	4,848; (0,374);4,917



Gambar-8. Grafik Box plot kemampuan fagositosis Makrofag

Nilai median yang digambarkan pada grafik box plot menunjukkan bahwa median kemampuan fagositosis makrofag paling tinggi pada kelompok K, diikuti kelompok P2 dan paling rendah pada kelompok P1. (Gambar -8)



Gambar-9. Grafik Box plot Kadar NO

Nilai median yang digambarkan pada grafik box plot menunjukkan bahwa median kadar NO makrofag paling tinggi pada kelompok K, diikuti kelompok P2 dan paling rendah pada kelompok P1.(Gambar-9)

5.2. Uji Statistik

Pada eksplorasi data, uji normalitas data masing-masing kelompok dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro Wilk* .

Tabel-3 . Uji normalitas data kemampuan fagositosis makrofag pada tiap kelompok percobaan

Variabel	Kelompok	Shapiro-Wilk
%	Kontrol	.321
	P1	.890
	P2	.737

Tabel-4 . Uji normalitas data kadar NO makrofag pada tiap kelompok percobaan

Variabel	Kelompok	Shapiro-Wilk
Kadar NO	Kontrol	.177
	P1	.366
	P2	.390

Dari tabel di atas terlihat bahwa distribusi data tiap kelompok perlakuan pada tabel kemampuan fagositosis dan kadar NO adalah normal.

Kemudian untuk uji homogenitas data tiap kelompok perlakuan dilakukan dengan *Levene's test*. Didapatkan pada uji tersebut bahwa pada kemampuan

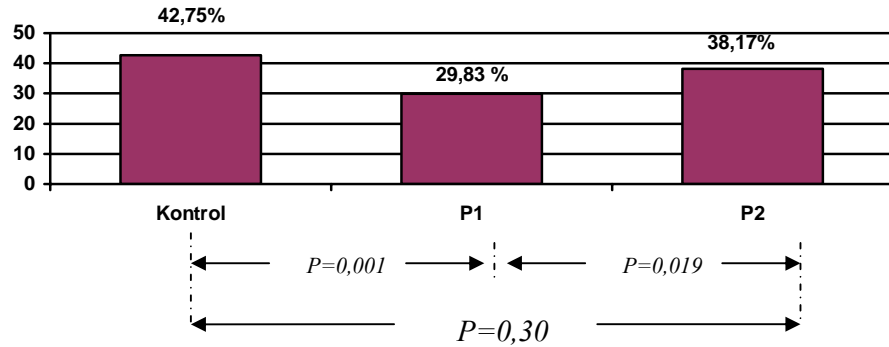
fagositosis $p=0,167$ dan pada kadar NO $p=0,316$ maka dikatakan bahwa data tiap kelompok perlakuan adalah homogen

Oleh karena skala variabel independen maupun dependennya numerik dan distribusi datanya normal, maka analisis statistik untuk uji beda semua kelompoknya menggunakan *One way ANOVA*. Uji beda untuk masing-masing kelompok menggunakan *Bonferoni test*.

Hasil uji *ANOVA* didapatkan bahwa keseluruhan kelompok dari variabel kemampuan fagositosis makrofag mempunyai perbedaan yang bermakna secara statistik dengan nilai $p<0,05$ ($p=0,001$). Begitu juga dengan variabel produksi NO makrofag pada uji tersebut juga menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna secara statistik dengan nilai $p<0,05$ ($p=0,004$).

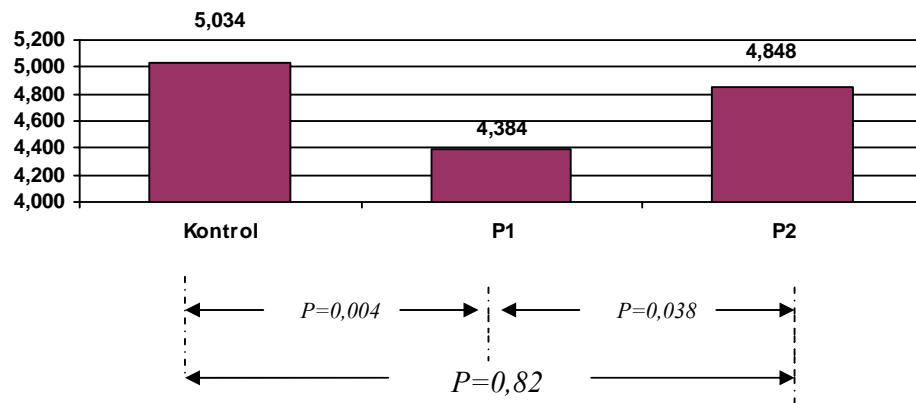
Variable	Signifikan
% fagositosis	K*P1 P1*P2 K*P2
Kadar NO	K*P1 P1*P2 K*P2

Uji *Bonferoni* pada variabel kemampuan fagositosis makrofag menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,001$) antara kelompok kontrol (K) ($42,75 \pm 6,49$) dan perlakuan 1 (P1) ($29,83 \pm 2,64$), dan terdapat perbedaan yang bermakna juga ($p=0,019$) antara kelompok perlakuan 1 (P1) ($29,83 \pm 2,64$) dan perlakuan 2 (P2) ($38,17 \pm 3,66$). Sedangkan antara kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan 2 (P2) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,307$)(gambar.-11)

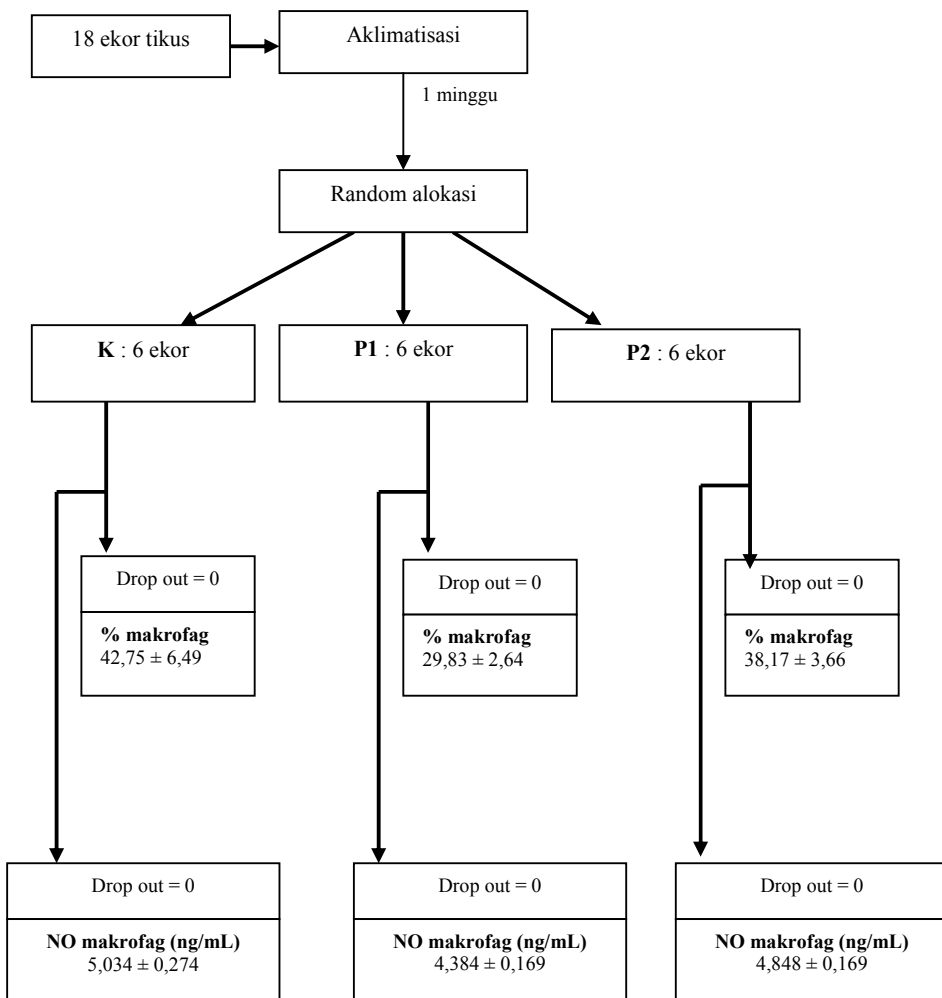


Gambar-10. Hasil *Post Hoc* test kemampuan fagositosis makrofag dengan menggunakan uji *Bonferroni* .

Uji *Bonferroni* pada variabel produksi NO makrofag menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,004$) antara kelompok kontrol (K) ($5,034 \pm 0,274$) dan perlakuan 1 (P1) ($4,384 \pm 0,169$), dan terjadi perbedaan bermakna ($p=0,038$) juga antara kelompok perlakuan 1 (P1) ($4,384 \pm 0,169$) dan perlakuan 2 (P2) ($4,848 \pm 0,169$). Sedangkan antara kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan 2 (P2) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,829$).



Gambar-11. Hasil *Post Hoc* test produksi NO makrofag dengan menggunakan uji *Bonferroni* .



Gambar-12. **Diagram skematik hasil penelitian**

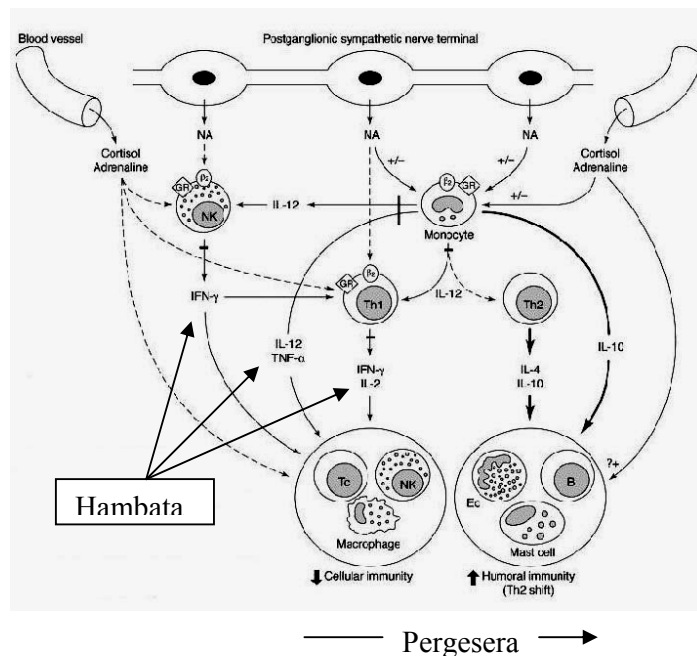
BAB 6

PEMBAHASAN

Dari 18 ekor tikus dalam penelitian, ternyata tidak ada satu pun dari ketiga kelompok perlakuan yang mengalami drop out. Pada kelompok kontrol terlihat bahwa jumlah rerata makrofag yang mem-fagosit *Latex beads* adalah sejumlah $42,75 \pm 6,49$ %. Jumlah ini menggambarkan kemampuan fagositosis makrofag pada mencit yang menderita adenokarsinoma mamma. Pada kelompok perlakuan 1 (P1) terlihat bahwa kemampuan fagositosis makrofag menurun secara sangat signifikan ($p=0,001$) dibandingkan kelompok kontrol, yaitu dari $42,75 \pm 6,49$ % pada kelompok kontrol menjadi $29,83 \pm 2,64$ % pada kelompok P1.

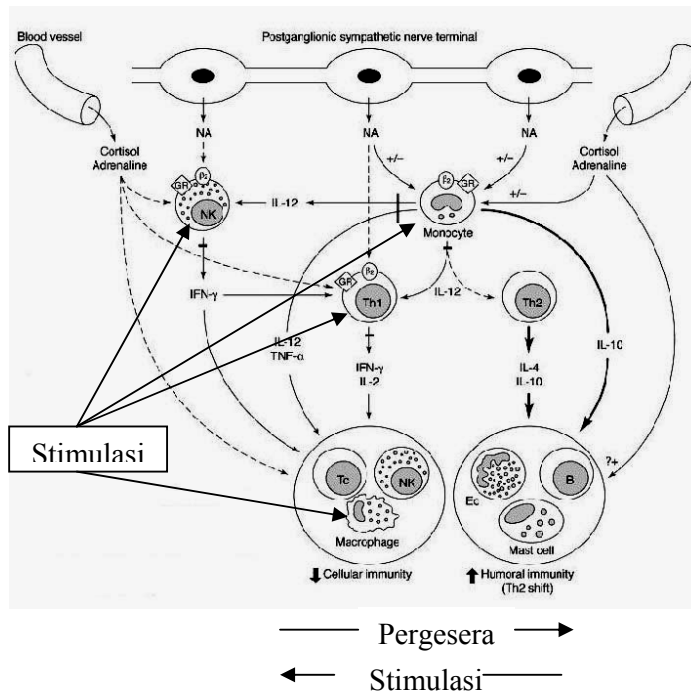
Penurunan kemampuan fagositosis makrofag pada kelompok P1 ini disebabkan karena stress yang diberikan pada kelompok ini. Adanya stress ini akan berpengaruh terhadap imunitas tubuh melalui stimulasi sekresi *kortisol* dan

adrenalin dari korteks dan medula adrenal. Juga berpengaruh terhadap pelepasan noradrenalin dari postganglion simpatik terminal saraf di pembuluh darah dan organ *lymfoid*. Efek sistemik dari glukokortikoid dan katekolamin ini mempengaruhi pengaturan sitokin yang diproduksi monosit. Stress akan menurunkan produksi sitokin yang dibutuhkan dalam respon imunitas seluler.⁹ Pada saat disekresikan cortisol dan adrenalin akan terjadi hambatan ekspresi IL-2, IFN- γ , dan IL-12, di mana IL-12 dan IFN- γ sangat penting untuk stimulasi sel-sel efektor sistem imun seluler seperti Makrofag, *Cytotoxic T-cell Lymphocyt (CTL)*, dan sel *Natural Killer (NK)*. Pada saat mendapatkan stress, makrofag mengalami anergi, sehingga kemampuan fagositosisnya menurun. Hal ini dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 13. Mekanisme yang terjadi pada stress dan sistem imun⁹

Pada kelompok perlakuan 2 (P2) di mana pada kelompok ini mendapatkan imunostimulator, terlihat bahwa kemampuan fagositosis makrofag juga menurun tetapi tidak signifikan ($p=0,307$) dibandingkan kelompok kontrol, yaitu dari $42,75 \pm 6,49$ % pada kelompok kontrol menjadi $38,17 \pm 3,66$ % pada kelompok P2. Dibandingkan dengan kelompok P1 yang mendapatkan stress tetapi tidak mendapat imunostimulator, maka pada kelompok P2 yang mendapat imunostimulator, penurunan kemampuan fagositosis makrofagnya berbeda bermakna ($p=0,019$). Penurunan kemampuan fagositosis makrofag pada kelompok P2 dibandingkan dengan kelompok kontrol adalah tidak bermakna ($p=0,307$), hal ini membuktikan bahwa pemberian imunostimulator pada mencit adenokarsinoma mamma dengan stress akan memperbaiki kemampuan fagositosis makrofag. Hal ini terjadi karena Imunostimulator *Echinacea sp* yang diberikan akan mengaktifasi makrofag sehingga makrofag yang ada, baik sebagai APC maupun sebagai efektor akan aktif dan menghasilkan sitokin-sitokin yang penting untuk aktifitas imunitas seluler, terutama IL-12 dan IFN- γ ⁴⁰⁻⁴⁵.



Gambar-14. Mekanisme yang terjadi pada stress dan sistem imun⁹

Produksi NO makrofag pada kelompok kontrol terlihat sejumlah $5,034 \pm 0,274$ ng/mL. Jumlah ini menggambarkan produksi NO makrofag pada mencit yang menderita adenokarsinoma mamma. Pada kelompok perlakuan 1 (P1) terlihat bahwa produksi NO makrofag menurun secara sangat signifikan ($p=0,004$) dibandingkan kelompok kontrol, yaitu dari $5,034 \pm 0,274$ ng/mL pada kelompok kontrol menjadi $4,384 \pm 0,169$ ng/mL pada kelompok P1.

Penurunan produksi NO makrofag pada kelompok P1 disebabkan karena stress yang diberikan pada kelompok ini. Adanya stress ini akan berpengaruh terhadap imunitas tubuh melalui stimulasi sekresi *kortisol* dan *adrenalin* dari *korteks* dan *medula adrenal*. Juga berpengaruh terhadap pelepasan noradrenalin dari *postganglion simpatik* terminal saraf di pembuluh darah dan organ *lymfoid*. Pelepasan *kortisol* dan adrenalin ini akan menyebabkan penurunan stimulasi

sistem imun seluler. Hal ini berpengaruh pada penurunan produksi NO makrofag. Hal ini dapat dilihat pada gambar -10.

Pada kelompok perlakuan 2 (P2) di mana pada kelompok ini mendapatkan imunostimulator *Echinacea purpurea*, terlihat bahwa produksi NO makrofag juga menurun tetapi tidak signifikan ($p=0,829$) dibandingkan kelompok kontrol, yaitu dari $5,034 \pm 0,274$ ng/mL pada kelompok kontrol menjadi $4,848 \pm 0,374$ ng/mL pada kelompok P2. Dibandingkan dengan kelompok P1 yang mendapatkan stress tetapi tidak mendapat imunostimulator, maka pada kelompok P2 yang mendapat imunostimulator, penurunan produksi NO makrofag berbeda bermakna ($p=0,038$). Penurunan produksi NO makrofag pada kelompok P2 dibandingkan dengan kelompok kontrol adalah tidak bermakna ($p=0,829$), hal ini membuktikan bahwa pemberian imunostimulator pada mencit adenokarsinoma mamma dengan stress akan memperbaiki produksi NO makrofag. Hal ini terjadi karena Imunostimulator *Echinacea purpurea* yang diberikan akan mengaktifasi makrofag sehingga makrofag yang ada, baik sebagai APC maupun sebagai efektor akan aktif dan menghasilkan sitokin-sitokin terutama IL-12 dan IFN- γ yang penting untuk aktifitas imunitas seluler³⁷⁻⁴². Hal ini dapat dilihat pada gambar-11.

BAB 7

SIMPULAN DAN SARAN

7.1. Simpulan

1. Terdapat perbedaan kemampuan fagositosis makrofag pada mencit C3H yang menderita adenokarsinoma mamma dan stress dengan pemberian imunostimulator *Echinacea purpurea* yaitu $29,83 \pm 2,64$ dengan $38,17 \pm 3,66$.
2. Terdapat perbedaan produksi NO makrofag pada mencit C3H yang menderita adenokarsinoma mamma dan stress dengan pemberian

imunostimulator *Echinacea purpurea* yaitu $4,384 \pm 0,169$ dengan $4,848 \pm 0,169$.

7.2. Saran

- 1. Untuk membuktikan bahwa peningkatan aktifitas makrofag adalah akibat dari peningkatan sitokin IL-12 dan IFN- γ , maka perlu dilakukan penelitian pada kadar IL-12 dan IFN- γ dari mencit C3H dengan adenokarsinoma mamma yang diberi *Echinacea purpurea*.**
- 2. Bila *Echinacea purpurea* mempunyai efek yang baik terhadap peningkatan aktifitas makrofag pada mencit C3H dengan adenokarsinoma dan stress, maka perlu dipikirkan pengembangan untuk kelanjutan uji klinik terhadap manusia.**

DAFTAR PUSTAKA

1. Deteksi dini kanker payudara. Republika online; 2 April 2006. Available from : URL http://www.republika.co.id/cetak_berita.asp
2. Smigal C, Siegel R. Breast cancer facts and figure 2005-2006. American cancer society; 2005:1-3
3. Kardinah. Kanker Payudara : Bagaimana Hindari Berbagai Ancaman. DEPKES-RI ; April 2007. Available from : URL <http://www.depkas.go.id/kanker.htm>
4. M. Farid Aziz. Masalah pada Kanker Serviks. Cermin Dunia Kedokteran. 2001;133:15-8. Available from : URL http://www.kalbefarma.com/files/cdk/files/cdk_133_obstetri_dan_ginekologi.pdf
5. Sugito H. Kanker di Indonesia Tahun 1994 Data Histopatologik. Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia. Dirjen YanMed Dep. Kes RI ; 1994 : 3-6.
6. Profil Kesehatan Provinsi Jawa Tengah Tahun 2005. Pencapaian Program Kesehatan Menuju Jawa Tengah Sehat. Dinas kesehatan Pemerintah provinsi

jawa tengah ; 2005. Available from : URL
<http://www.dinkesjateng.org/profil2005/bab4.htm>

7. Shirley IM, MD. Epidemiologi kanker payudara dan pengendaliannya. *Medika* 2000;5:326-9
8. **Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT). Jakarta (INA): Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan RI dan Biro Pusat Statistik; 2004:23.**
9. Elemkov IJ and Chrousos GP. Stress hormones, Th1/th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and susceptibility to disease. *TEM*. 1999;10(9):359-68.
10. Burger R, Torres A, Warren R, Caldwell V, Hughes B. Echinacea-induced cytokine production by human macrophages. *Int J Immunopharmacol*. 1997; 19(7): 371-9.
11. Torres AV, Carson JJ, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang GC. Antimicrobial Action of the NADPH Phagocyte Oxidase and Inducible Nitric Oxide Synthase in experimental Salmonellosis. I. Effects on microbial killing by Activated Peritoneal Macrophage in Vitro. *J Exp Med* 2000;192(2):227-236
12. Weiming X, Lizhi L, Ian GC. Microencapsulated iNOS-expressing cells cause tumor suppression in mice. *The FASEB Journal express*. 2001;10:1096.
13. Mishima S, Saito K, Maruyama H, Inoue M, Yamashita T, Ishida T, Gu Y. Antioxidant and immuno-enhancing effects of Echinacea purpurea. *Biol Pharm Bull*. 2004;27(7):1004-9.
14. See D, Broumand N, Sahl L, Tilles J. In vitro effects of echinacea and ginseng on natural killer and anti-body-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. *Immunopharmacology*. 1997; 35(3): 229-35.
15. Bratman S, Kroll D. *Natural Health Bible*. Prima Publishing. 1999: 179-81.
16. Currier NL, Miller SC. Natural Killer cells from aging mice treated with extracts from echinacea purpurea are quantitatively and functionally rejuvenated. *Exp Gerontol*. 2000;35(5): 627-39.
17. Goel V, Chang C, Slama J, Barton R, Bauer R, Gahler R, Basu T. Echinacea stimulates macrophage function in lung and spleen of normal rats. *J Nutr Biochem*. 2002;13(8):487
18. Virginia KL, Colin AP, Raman Q, Edwin DS. Breast cancer. In: Philip R, Sandra M, Raman Q, editors. *Clinical oncology*. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1993: 187-94
19. Dickson R B., Lippman M E. Cancer Of The Breast. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, Vincent T. DeVita, Jr. M.D., Samuel Hellman, M.D., Steven A. Rosenberg, M.D. Ph.D. Eds; 5th Ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997, 36 : 1541-1616

20. Kumpulan Naskah Ilmiah. Perhimpunan Ahli Bedah Onkologi Indonesia (PERABOI). Mukhtar Nasional VI : 2003.
21. Sobin LH, Wittekind CH ed. Classification of Malignant Tumours TNM. International Union Against Cancer UICC ; 6th ed. A John Wiley & Sons Inc.2002 : 131-41.
22. Hayes Malcolm, MD. Reporting Pathology Specimen for Breast Cancer. British Columbia Cancer Agency; Vancouver Canada. Available from : URL : <http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/enyptzz527vtdpy2qov5ngwe5wdre7vpr6nss5lmr2ohyqmpbyg32zgi25y4kqcyysnukvreieo7pk/PathologychecklistBREASTREPORTING4.doc>
23. Wunderlich J R., Restifo N P.. Essentials Of Immunology . Cancer: Principles & Practice of Oncology, Fifth Edition Vincent T. DeVita, Jr. M.D., Samuel Hellman, M.D., Steven A. Rosenberg, M.D. Ph.D. Philadelphia 1997, 3 : 47-75
24. Conran RS, Kumar V, Robbins SL. Robin Pathologic basis of Disease. 5th ed. Philadelphia : WB Saunders, 1994
25. Stites DP, Terr Abba I, Parslow TP, .Medical Immunology, 9th ed, Stamford Connecticut, USA: Appleton & Lange, 1997
26. **Abbas A, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders; 2005. p. 4-15,22-3,65-80,81-103,182-7,247-53,258-9,266,268-9,279-80,290-5.**
27. Roitt IM, 1988. Essentiale Immunology, 6th ed. Blackwell sci. publ. London.
28. Goodman JW. The Immune Response, in Basic and Clinical Immunologi. 8th ed. Stites DP, Terr A I eds.,Prentice-Hall Int.Inc.,USA.
29. Kresno SB. Aspek imunologi pada kanker. Nelwan et al eds. Simposium 4th Jakarta Antimicrobial Update 2003. Sub Bagian Penyakit Tropik dan Infeksi Bagian Ilmu penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Rumah Sakit Umum Pusat Nasional Dr Cipto Mangunkusumo. Jakarta. 2003: 59 – 77.
30. Constatinides P. General Pathobiologi. Connecticut: Appleton & Lange,1994 : 173 – 90.
31. Sarjadi. Karsinoma epidermoid serviks uteri (Beberapa aspek epidemiologi serta peran histopatologi dan petanda tumor dalam penentuan prognosis). Disertasi doktor Universitas Diponegoro. Semarang,1985
32. The Wikipedia free encyclopedia. Nitric oxide. Adelaide: Wikimedia Foundation Inc; 2007. p. 1-3. Available from: [URL:http://en.wikipedia.org/nitric_oxide](http://en.wikipedia.org/nitric_oxide)
33. The Wikipedia free encyclopedia. Nitric oxide synthase. Adelaide: Wikimedia Foundation Inc; 2007. p. 1-5. Available from: URL:http://en.wikipedia.org/nitric_oxide_synthase

34. Giles JT, Palat CT, Chien Susan H, Chang ZG, Kennedy DT. Evaluation of Echinacea for Treatment of the Common Cold. *Pharmacotherapy*, 2000; 20(6):690-7
35. Murray MT. Echinacea: pharmacology and clinical applications. *Am J Nat Med* 1995;2:18-24.
36. Bauer R, Jurcic K, Puhlmann J, Wagner H. Immunological in vivo and in vitro examinations of echinacea extracts. *Arzneimittelforschung* 1988;38(2):276-81.
37. Schumacher A, Friedberg KD. Analysis of the effect of Echinacea angustifolia on unspecified immunity of the mouse. *Arzneimittelforschung* 1991;41:141-7.
38. Blumenthal M, Riggins C. Popular herbs in the U.S. market: therapeutic monographs. Austin, TX: American Botanical Council 1997:1-68.
39. Bartram T. *Encyclopedia of Herbal Medicine*. Grace Publishers, Dorset, England. 1995: 161-2.
40. Pemberian Terapi Imunomodulator Herbal. HTA Indonesia,2004. Available from :URL : <http://www.yanmedikdepkes.net/hta/Hasil%2520Kajian%2520HTA/2004/>
41. Echinacea species as potential immunostimulatory drugs. *Econ Med Plant Res*. 1991; 5: 253-321.
42. Wagner V. Immunostimulating polysaccharides (heteroglycans) of higher plants. *Arzneimittelforschung*. 1985; 35: 1069-75
43. Stimpel M. Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant Echinacea purpurea. *Infect Immun*. 1984; 46:845-49
44. Luettig B. Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of Echinacea purpurea. *J Natl Cancer Inst*. 1989; 81: 669-75
45. Mose J. Effect of echinacina on phagocytosis and natural killer cells. *Med Welt*. 1983; 34: 1463-7
46. Vomel V. Influence of a non-specific immune stimulant on phagocytosis of erythrocytes and ink by the reticuloendothelial system of isolated perfused rat livers of different ages. *Arzneimittelforschung*. 1984; 34: 691-95
47. Brichthope I, Fitzgerald P. *The AIDS Fighters*. Keats Publishing, New Canaan, Conn. 1987; 10: 134
48. Giles J, Palat C, Chien S, Chang Z, Kennedy D. Evaluation of echinacea for treatment of the common cold. *Pharmacotherapy*. 2000; 20(6): 690-7.
49. Henneicke-von Z, Hentschel C, Schnitker J, Kohnen R, Kohler G, Wustenberg P. Efficacy and safety of a fixed combination phytomedicine in the treatment of the common cold (acute viral respiratory tract infection): results of a randomised, double blind, placebo controlled, multicentre study. *Curr Med Res Opin*. 1999; 15(3): 214-27.

50. Trubus. Echinacea harapan baru pendamba kesehatan. PT. Trubus Swadaya. September 2007;454:102-4.
51. Gallo M, Sarkar M, Au W, Pietrzak K, Comas B, Smith M, Jaeger TV, Einarson A, Koren G. Pregnancy outcome following gestational exposure to echinacea: a prospective controlled study. Arch Intern Med. 2000;160(20):3141-3.
52. Tyler V. Herbs of Choice. Pharmaceutical Products Press, an imprint of The Haworth Press, Binghamton, NY. 1994; 12: 182-4.
53. Collins E, Berkoff N. Everything You Need to Know About Echinacea and Immunity. Roseville, CA:Prima Publishing;1999:85-6
54. Pratiknya AW. Dasar-dasar Metodologi Penelitian kedokteran dan kesehatan. Cetakan I. Jakarta: CV Rajawali, 1986: 147-65.
55. World Health Organization. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. 1993: 44.
56. Elyana Asnar. Peran perubahan limfosit penghasil sitokin dan peptida motilitas usus terhadap modulasi respon imun mukosal tikus yang stress akibat stressor renjatan listrik. Suatu pendekatan psikoneuroimunologi. (Disertasi). Program Pasca Sarjana Unair. 2001

LAMPIRAN

PROSEDUR-PROSEDUR LABORATORIUM

1. PROSEDUR TRANSPLANTASI TUMOR

1. Mencit donor dimatikan dengan eter, kemudian diletakkan terlentang pada tatakan / alas fiksasi dan keempat kakinya difiksasi dengan jarum.
2. Kulit dibagian yang bertumor diusap dengan alkohol 70 %, kemudian dibuat sayatan dengan gunting lurus, untuk mengeluarkan tumor.
3. Tumor diletakkan di cawan petri kecil yang telah terlebih dahulu dicuci dengan garam fisiologis dan diletakkan diatas es.
4. Amati bentuk dan keadaan tumor, kemudian ambil/potong jaringan tumor yang masih baik yaitu bagian yang tanpa nekrosis (biasanya di daerah tepi jika tumor besar) sebanyak kira-kira yang dapat menghasilkan bubur tumor paling sedikit 1 ml dan taruh dicawan petri kecil lainnya. Bersihkan dari jaringan ikat (simpai), jaringan nekrotik dan darah, kemudian cacah/potong-potong sampai halus dengan gunting hingga akhirnya terbentuk “bubur tumor” yang partikelnya dapat melewati jarum trokar.

Tambahkan garam fisiologis lebih kurang sama banyak dengan volume tumor.

5. Bubur tumor disuntikkan subkutan di aksila kanan mencit dengan dosis 0,2 ml.
6. Sisa tumor yang padat dimasukkan ke dalam botol formalin untuk dibuat sediaan mikroskopik.
7. Masing-masing mencit diberi nomor ditelinganya (lihat bagan) dan dimasukkan ke dalam kandang berbeda yang diberi label berisi : jenis kelompok perlakuan, tanggal transplantasi

2. PROSEDUR PENGAMBILAN SAMPEL DARI HEWAN

PERCOBAAN

1. Mencit dibunuh dengan dislokasi leher setelah dinarkose menggunakan chloroform. Mencit diletakan dalam posisi terlentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneumnya dengan alkohol 70%.
2. Suntikkan 5 ml medium *RPMI* yang mengandung 2% *FBS* ke dalam rongga peritoneum, tunggu 2 menit sambil ditekan-tekan secara perlahan.
3. Cairan peritoneal diaspirasi dari rongga peritoneum dengan cara menekan organ dalam dengan 2 jari, cairan diaspirasi dengan spuit injeksi, dipilih bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus. Aspirat yang didapat ditampung dalam tabung sentrifus.
 - a. Aspirat yang didapat kemudian disentrifus pada 400G, 4°C selama 10'.

- b. Supernatan dibuang, cuci 2X dengan *RPMI* yang mengandung 2% FBS.
- c. Kemudian ditambahkan 2 ml medium *RPMI* komplet (*RPMI* 1640 yang mengandung *L-glutamin* (1mM), *Foetal Bovine Serum* (FBS)5% dan ditambah antibiotika *Penicillin* 50 unit dan *streptomycin* 50µg per ml) dan disentrifus pada 400g, 4°C selama 10'.
- d. Buang supernatan dan bila perlu larutkan dengan 3% asam asetat dalam PBS untuk melisiskan sel darah merah kemudian disentrifus pada 400g, 4°C selama 10'.
- e. Cuci dengan *RPMI* yang mengandung 2% FBS.
- f. Resuspensikan dengan medium komplet.
- g. Jumlah sel yang didapat dihitung menggunakan bilik hitung *Neubauer* setelah diwarnai dengan *Tripan Blue* sehingga didapatkan suspensi sel dengan kepadatan 10^6 / ml.
- h. Sel yang didapatkan ini dibagi dua untuk pemeriksaan produksi NO (3X100µl) masukkan ke plate 96 wells dan untuk pemeriksaan fagositosis dengan *Latex beads* diambil 2x100µl (diencerkan menjadi 200µl)→ masukkan ke plate 24 wells yang telah diberi cover slip..

3. PROSEDUR PEMERIKSAAN NO

- a. Masukkan 100 μl suspensi $1-1,2 \times 10^6$ sel/ ml dalam setiap *plate* kultur yang berisi 96 *wells* atau 24 *wells*.
- b. Inkubasikan selama 2-3 jam pada 37°C , 5% CO_2 untuk makrofag adheren.
- c. Buang sel-sel non adheren dengan aspirasi.
- d. Ganti medium
- e. Kultur sel dalam medium komplet selama 24 jam dalam inkubator CO_2 5% pada suhu 37°C .
- f. Lakukan pengukuran akumulasi nitrit pada kultur supernatan sebagai berikut:
 - Untuk memeriksa produksi nitrit digunakan 96 *wells microplate* ELISA dengan dasar rata.
 - Masukkan 100 μl Reagen chromogenic dalam *microplate* ELISA dengan dasar rata.
 - Pipet 100 μl supernatan yang hendak ditest atau standar NaNO_2 dalam *plate* dengan duplikasi atau triplikasi. Gunakan medium kontrol sebagai blanko.
 - Tunggu selama 5 menit pada suhu ruang untuk pembentukan *chromophore* dan stabilisasi.
 - Ukur absorbansi pada 550 nm menggunakan *automated microplate reader* (SLT LABINSTRUMENS Model 16 570)

- Buat kurva standar menggunakan analisis regresi linier sederhana/ simpel dari pembacaan standar NaNO_2 . Hitung konsentrasi sampel berdasarkan kurva standar atau rumus regresi.

Keterangan:

Reagen chromogenic

Merupakan campuran 1 volume Reagen I dan 1 volume Reagen II sebagai berikut:

Reagen I. N-(-1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED) 0,1gram dilarutkan dalam 100 cc air suling

Reagen II. Sulfanilic Acid 0,2 gram dilarutkan dalam 100 ml HCL 4N.

Reagen I dan II tersebut harus disimpan di dalam almari pendingin, ruangan gelap dan digunakan sebelum 6 minggu/ sebelum reagen berubah menjadi gelap. Setiap kali pemeriksaan harus disiapkan fresh (segar).

Standar

Larutkan 69mg NaNO_2 dalam 500ml air suling (stok 2mM).

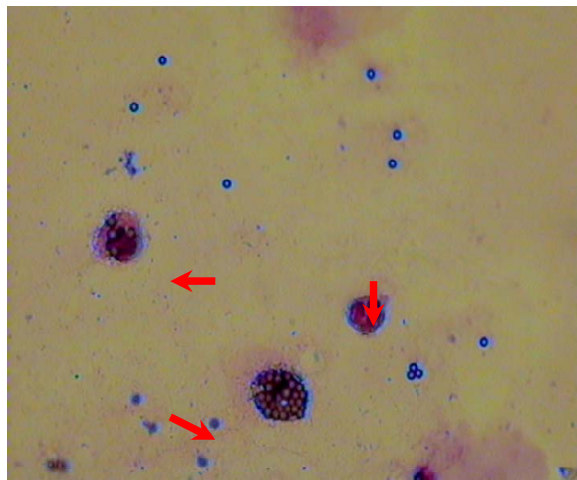
Buat pengenceran bertingkat dari 0 - 200 μM dengan cara melarutkan larutan stok dengan medium yang sama dengan medium kultur.

4. PROSEDUR PEMERIKSAAN FAGOSITOSIS MAKROFAG DENGAN *LATEX BEADS*

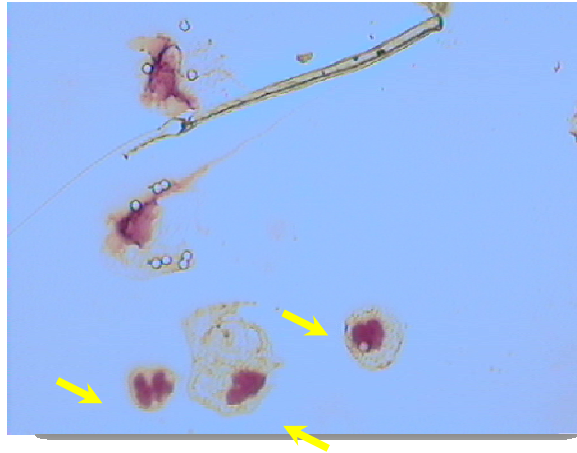
- a. Suspensi makrofag yang telah dihitung dikultur pada microplate 24 well yang telah diberi coverslips bulat, setiap sumuran 200 μ l (5×10^5 sel), inkubasikan dalam inkubator CO₂ 5%, 37°C selama 30 menit,
- b. Tambahkan medium komplet 1 ml/sumuran, inkubasikan selama 2 jam.
- c. Sel dicuci dengan *RPMI* 2 x , kemudian tambahkan medium komplet 1 ml/ sumuran, inkubasikan sampai 24 jam.
- d. Makrofag peritoneum yang dikultur sehari sebelumnya, dicuci 2 x dengan *RPMI*.
- e. *Latex beads* diresuspensikan sehingga mendapat konsentrasi $2,5 \times 10^7$ /ml
- f. Tambahkan suspensi *latex* 200 μ l/sumuran, inkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C, CO₂.
- g. Cuci 3 x dengan *PBS* untuk menghilangkan partikel yang tak difagosit,
- h. Keringkan pada suhu ruang, fiksasi dengan metanol absolut,
- i. Setelah kering, *coverslips* dipulas dengan Giemsa 20% selama 30 menit.

- j. Cuci dengan aquadest, angkat dari sumuran kultur dan keringkan pada suhu kamar.
- k. Setelah kering dimounting pada object glass.
- l. Prosentase sel yang memfagosit partikel *latex* dihitung dari 200 sel yang diperiksa dengan mikroskop cahaya, dengan replikasi penghitungan 3x.

Makrofag memfagosit *Latex beads* (pembesaran 40X)



Makrofag tidak memfagosit
Latex beads (pembesaran 40X)



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



ETHICAL CLEARANCE
No. 75 /EC/FK/RSDK/2007

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

**EFEK ECHINACEA TERHADAP KEMAMPUAN FAGOSITOSIS DAN AKTIFITAS
NITRIC OXIDE (NO) MAKROFAG PADA ADENOKARSINOMA
MAMMA MENCIT C3H YANG MENGALAMI STRESS**

Data Penelitian

Kelompok perlakuan	Rerata % Makrofag yang memfagosit latex beads	Kadar NO rerata makrofag (ng/ml)
1	40	5.126
1	54	4.709
1	37	5.126
1	43	5.405
1	46	4.709
1	37	5.126
2	29	4.569
2	30	4.291
2	31	4.569
2	34	4.430

2	29	4.152
2	26	4.291
3	37	4.430
3	44	4.987
3	35	5.405
3	40	4.430
3	39	4.987
3	34	4.848

Statistik

Case Processing Summary

Klpk perlakuan		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
%fagositosis	kontrol	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	P1	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	P2	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
Kadar NO	kontrol	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	P1	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	P2	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%

Tests of Normality

Klpk perlakuan		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
%fagositosis	kontrol	.188	6	.200*	.882	6	.321
	P1	.209	6	.200*	.973	6	.890
	P2	.141	6	.200*	.955	6	.737
Kadar NO	kontrol	.299	6	.100	.845	6	.177
	P1	.209	6	.200*	.893	6	.366
	P2	.202	6	.200*	.899	6	.390

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
%fagositosis	Based on Mean	2.018	2	15	.167
	Based on Median	1.605	2	15	.233
	Based on Median and with adjusted df	1.605	2	8.912	.254
	Based on trimmed mean	1.806	2	15	.198
Kadar NO	Based on Mean	1.245	2	15	.316
	Based on Median	.886	2	15	.433
	Based on Median and with adjusted df	.886	2	11.079	.440
	Based on trimmed mean	1.330	2	15	.294

Descriptives

Klpk perlakuan				Statistic	Std. Error			
%fagositosis	kontrol	Mean		42.75	2.65			
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	35.93				
			Upper Bound	49.57				
		5% Trimmed Mean		42.44				
		Median		41.25				
		Variance		42.175				
		Std. Deviation		6.49				
		Minimum		37				
		Maximum		54				
		Range		17				
		Interquartile Range		11.00				
		Skewness		1.158		.845		
		Kurtosis		.981		1.741		
		P1		Mean			29.83	1.08
				95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	27.06	
	Upper Bound			32.60				
5% Trimmed Mean				29.81				
Median				29.50				
Variance				6.967				
Std. Deviation				2.64				
Minimum				26				
Maximum				34				
Range				8				
Interquartile Range				3.50				
Skewness				.268	.845			
Kurtosis				1.252	1.741			
P2				Mean		38.17	1.49	
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	34.33		
			Upper Bound	42.00				
		5% Trimmed Mean		38.07				
		Median		38.00				
		Variance		13.367				
		Std. Deviation		3.66				
		Minimum		34				
		Maximum		44				
		Range		10				
		Interquartile Range		6.25				
		Skewness		.611	.845			
		Kurtosis		-.085	1.741			
		Kadar NO	kontrol	Mean		5.03350		.11177
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	4.74617		
	Upper Bound			5.32082				
5% Trimmed Mean				5.03092				
Median				5.12632				
Variance				7.496E-02				
Std. Deviation				.27379				
Minimum				4.709				
Maximum				5.405				
Range				.696				
Interquartile Range				.48732				
Skewness				-.219	.845			
Kurtosis				-1.079	1.741			
P1				Mean		4.38374	.0688	
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	4.20678		
			Upper Bound	4.56070				
		5% Trimmed Mean		4.38632				
		Median		4.36053				
		Variance		2.843E-02				
		Std. Deviation		.16862				
		Minimum		4.152				
		Maximum		4.569				
		Range		.418				
		Interquartile Range		.31328				
		Skewness		-.075	.845			
		Kurtosis		-1.550	1.741			
		P2		Mean		4.84785		.15252
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	4.45578		
	Upper Bound			5.23993				
5% Trimmed Mean				4.84012				
Median				4.91747				
Variance				.140				
Std. Deviation				.37360				
Minimum				4.430				
Maximum				5.405				
Range				.975				
Interquartile Range				.66136				
Skewness				.186	.845			
Kurtosis				-.579	1.741			

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
%-fagositosis	2.018	2	15	.167
Kadar NO	1.245	2	15	.316

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
%fagositosis	Between Groups	514.583	2	257.292	12.348	.001
	Within Groups	312.542	15	20.836		
	Total	827.125	17			
Kadar NO	Between Groups	1.344	2	.672	8.298	.004
	Within Groups	1.215	15	8.099E-02		
	Total	2.559	17			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable		(I) Klpk perlakuan	(J) Klpk perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
							Lower Bound	Upper Bound
%fagositosis	Bonferroni	kontrol	P1	12.92*	2.64	.001	5.82	20.02
			P2	4.58	2.64	.307	-2.52	11.68
		P1	kontrol	-12.92*	2.64	.001	-20.02	-5.82
			P2	-8.33*	2.64	.019	-15.43	-1.23
		P2	kontrol	-4.58	2.64	.307	-11.68	2.52
			P1	8.33*	2.64	.019	1.23	15.43
	Tamhane	kontrol	P1	12.92*	2.64	.010	3.84	21.99
			P2	4.58	2.64	.430	-4.59	13.76
		P1	kontrol	-12.92*	2.64	.010	-21.99	-3.84
			P2	-8.33*	2.64	.004	-13.70	-2.97
		P2	kontrol	-4.58	2.64	.430	-13.76	4.59
			P1	8.33*	2.64	.004	2.97	13.70
Kadar NO	Bonferroni	kontrol	P1	.64976*	.16431	.004	.20716	1.09236
			P2	.18565	.16431	.829	-.25696	.62825
		P1	kontrol	-.64976*	.16431	.004	-1.09236	-.20716
			P2	-.46411*	.16431	.038	-.90671	-.22E-02
		P2	kontrol	-.18565	.16431	.829	-.62825	.25696
			P1	.46411*	.16431	.038	2.151E-02	.90671
	Tamhane	kontrol	P1	.64976*	.16431	.003	.25907	1.04045
			P2	.18565	.16431	.727	-.36484	.73613
		P1	kontrol	-.64976*	.16431	.003	-1.04045	-.25907
			P2	-.46411	.16431	.081	-.98641	5.82E-02
		P2	kontrol	-.18565	.16431	.727	-.73613	.36484
			P1	.46411	.16431	.081	-5.82E-02	.98641

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