



**PENGARUH PEMBERIAN ECHINACEA TERHADAP
KEMAMPUAN FAGOSITOSIS MAKROFAG
MENCIT BALB/C YANG DIBERI DIET OMEGA-3 DAN
DIINFEKSI *Listeria monocytogenes***

ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH

**Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi syarat dalam
menempuh Program Pendidikan Sarjana
Fakultas Kedokteran**

**Disusun oleh :
BAMBANG SULISTYO
NIM : G2A 004 039**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2008**

HALAMAN PENGESAHAN

Telah diujikan, Proposal Karya Tulis Ilmiah dari:

Nama : Bambang Sulistyono

NIM : G2A004039

Fakultas : Kedokteran

Universitas : Universitas Diponegoro

Tingkat : Program Pendidikan Sarjana

Bagian : Fisika Medik

Judul : Pengaruh Pemberian Echinacea Terhadap Kemampuan Fagositosis
Makrofag Mencit Balb/C yang Diberi Diet Omega-3

Pembimbing : dr. Dwi Pudjonarko M.Kes, SpS

Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi syarat dalam menempuh program pendidikan sarjana.

Semarang, 19 Februari 2008

Penguji

Pembimbing

dr. Neni Susilaningsih M.Si
NIP. 131 832 243

dr.Dwi Pudjonarko M.Kes, SpS
NIP. 132 137 931

**THE EFFECT OF ADMINISTERED ECHINACEA ON THE MACROPHAGE
PHAGOCYTOSIS ABILITY OF BALB/c MICE WITH OMEGA-3 DIETARY AND
Listeria monocytogenes INFECTION**

¹⁾Bambang Sulistyono, ²⁾Dwi Pudjonarko

ABSTRACT

Background : Previous research proved that mice with Omega-3 dietary had worse cellular immunity response than control. One of immune stimulator, Echinacea perhaps increases cellular immunity response at phagocytosis. This research was aimed to know effect of omega-3 dietary suppressing immune response and influence of echinacea to diminish impairment of cellular immunity at macrophage's phagocytosis ability.

Objective : The purpose of this research is to observe effect of echinacea as a trigger macrophage's phagocytosis ability in BALB/c mice with omega-3 dietary compared with BALB/c mice with omega-3 dietary without administered echinacea.

Method : An experiment using The Post Test Only Control Group Design was implemented to BALB/c mice. 24 male BALB/c mice were divided into four groups. K group were received no additional treatment, O group were given dietary omega-3 in their food, E group were given echinacea supplementation, and OE group were given dietary omega-3 and echinacea supplementation. At the 28th day, all groups were intravenously injected with live *Listeria monocytogenes*. Phagocytosis ability was measured with phagocytosis index. Data were analyzed using One Way ANOVA and Post Hoc Test Bonferroni on 0,05 of significant degree.

Result : There was significant difference in macrophage phagocytosis ability between OE group and O3 group ($p < 0,05$). Phagocytosis ability in O3 group is lower than O3E group.

Conclusion : There was significant difference, that omega-3 dietary can suppress cellular immune response at phagocytosis ability and administered echinacea is useful to repair this immune response.

Keywords : Macrophage, Phagocytosis, Omega-3, Echinacea.

¹⁾ Undergraduate student of Medical Faculty, Diponegoro University, Semarang

²⁾ Medical Physic Department, Medical Faculty, Diponegoro University, Semarang

**PENGARUH PEMBERIAN ECHINACEA TERHADAP KEMAMPUAN
FAGOSITOSIS MAKROFAG MENCIT BALB/C YANG DIBERI DIET
OMEGA-3 DAN DIIBFEKSI *Listeria monocytogenes***

Bambang Sulisty¹⁾, Dwi Pudjonarko²⁾

ABSTRAK

Latar Belakang : Penelitian sebelumnya membuktikan pada mencit yang diberi diet minyak ikan tinggi Omega-3 terjadi penurunan immunitas seluler. Salah satu immunostimulator yaitu Echinacea yang pada penelitian sebelumnya mampu memacu respon immunitas seluler, namun penelitian yang dilakukan masih terbatas.

Tujuan : Penelitian ini bertujuan untuk melihat efek Echinacea dalam meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag pada mencit yang diberi diet Omega-3 dibanding dengan mencit yang diberi diet Omega-3 tanpa suplemen Echinacea.

Metode : Suatu penelitian eksperimental yang menggunakan desain *The Post Test Only Control Group Design* dilakukan terhadap mencit BALB/c. Sebanyak 24 ekor mencit BALB/c jantan dibagi dalam 4 kelompok. Kelompok K tidak diberi perlakuan, kelompok O diberi diet Omega-3, kelompok E diberi suplemen Echinacea, kelompok OE mendapatkan diet Omega-3 dan Echinacea. Pada hari ke-28 semua kelompok diinjeksi intravena dengan *Listeria monocytogenes* hidup. Kemampuan fagositosis dihitung menggunakan index fagositosis. Data dianalisis dengan uji One-Way ANOVA untuk melihat perbedaan pada keempat kelompok. Perbedaan pada masing-masing kelompok dianalisis dengan uji Post Hoc Test Bonferroni pada derajat kemaknaan 0,05.

Hasil : Didapatkan perbedaan bermakna pada kemampuan fagositosis makrofag mencit BALB/c yang diberi diet Omega-3 dan suplemen Echinacea dibanding yang tidak mendapat suplemen Echinacea ($p < 0,05$). Kemampuan fagositosis makrofag mencit pada kelompok O lebih rendah dibanding pada kelompok OE

Kesimpulan : Adanya perbedaan bermakna dimana pemberian diet Omega-3 dapat membuat respon immunitas seluler lebih rendah serta pemberian suplemen echinacea dapat memperbaiki respon tersebut dilihat dari tingginya kemampuan fagositosis makrofag.

Kata Kunci : Makrofag, Fagositosis, Omega-3, Echinacea.

¹⁾ Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

²⁾ Staff Pengajar Bagian Fisika Medik Universitas Diponegoro, Semarang

PENDAHULUAN

Omega-3 adalah asam lemak tak jenuh rantai panjang. Asam lemak ini banyak terdapat pada berbagai sumber makanan, terutama minyak ikan.^{1,2} Minyak ikan banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai sumber makanan karena dipercaya dapat meningkatkan kesehatan tubuh, namun beberapa penelitian pada hewan coba membuktikan bahwa terjadi penurunan respons imunitas seluler, sehingga dapat meningkatkan risiko terpapar penyakit atau infeksi.^{1,2,3,4,5,6,7,8}

Listeria monocytogenes adalah bakteri intraseluler yang banyak digunakan dalam penelitian mengenai infeksi bakteri intrasel karena kemampuannya bertahan dan menghindari mekanisme bakterisidal dalam makrofag. Bakteri ini mampu menginduksi sistem imunitas seluler yang dilakukan oleh makrofag dengan proses T-cell mediated immunity.^{9,10,11}

Salah satu herbal yang berfungsi sebagai immunomodulator adalah ekstrak tanaman *Echinacea sp.*^{12,13} Polisakarida dari *Echinacea* memiliki efek stimulasi aktivitas makrofag dan meningkatkan fagositosis.¹³ Penelitian secara *in vivo* pada mencit menunjukkan adanya peningkatan aktivitas makrofag dengan pemberian *Echinacea*.¹⁴ Reaksi immunomodulasi juga terlihat pada percobaan terhadap darah manusia secara *invitro*.¹³

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan fagositosis makrofag pada mencit yang diinokulasi *Listeria monocytogenes*, diberi diet omega-3 dan diberi suplemen *echinacea* dibanding yang tidak diberi *echinacea*. Binatang coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit BALB/c. Kemampuan fagositosis makrofag mencit BALB/c yang menurun karena diet omega-3 mungkin dapat diatasi dengan pemberian suplemen *Echinacea*. Karena penelitian ini menggunakan hewan coba, diharapkan penelitian ini dapat menjadi landasan penelitian lebih lanjut pada manusia.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan pendekatan *The Post Test Only Control Group Design* dengan menggunakan hewan coba yaitu mencit BALB/C sebagai objek penelitian.^{15,16}

Sampel untuk penelitian ini adalah 24 ekor mencit jantan strain BALB/c yang diperoleh dari PUSVETMA (Pusat Veterinaria Farma) Surabaya. Dalam pemilihan mencit untuk percobaan harus diperhatikan dalam hal keturunan (strain BALB/c), umur mencit (10 minggu), jenis kelamin (jantan), berat badan 20-30 gram, tidak ada cacat fisik dan mencit bergerak aktif.^{17,18,19}

Mencit diadaptasi dalam laboratorium dengan dikandangkan secara individual selama 1 minggu dan diberi pakan standar pada waktu yang sama dan takaran yang sama pula. Kebersihan kandang, ventilasi dan pencahayaan harus selalu diperhatikan. Sebelum perlakuan berat badan mencit ditimbang untuk memastikan agar sesuai dengan kriteria yang telah disebutkan. Setelah adaptasi, 24 ekor mencit dibagi secara acak menjadi 4 kelompok yang terdiri dari 6 ekor mencit per kelompok.

Kelompok Kontrol (K) hanya memperoleh makanan standar. Kelompok Omega-3 (O) selain mendapat makanan standar juga mendapat suplemen minyak ikan kaya omega-3 produksi Sigma Menhaden dengan kode produksi F8020 yang dicampur dalam makanan sebanyak 5% (w/w) selama 33 hari. Kelompok Echinacea (E) selain makanan standar juga diberi suplemen Echinacea produksi Natural Health sebanyak 2 mg yang dilarutkan dalam aquadest sampai 0,4 ml (dosis maksimal mencit 20 g = 2,34 mg, berdasarkan tabel konversi perhitungan dosis Laurence and Bacharach) melalui sonde lambung. Kelompok Omega-3-echinacea (OE) mendapat gabungan suplemen minyak ikan dan Echinacea selain pakan standar dengan cara pemberian seperti kelompok sebelumnya. Pada hari ke-28 semua kelompok perlakuan diinjeksi dengan 10^4 *Listeria monocytogenes* hidup dalam 0,5 ml

aquadest yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro secara intra vena. Pada hari ke-33, semua mencit dibunuh dengan dislokasi leher. Pemilihan kuman *Listeria monocytogenes* karena kuman ini telah banyak digunakan dalam mempelajari sistim immunitas seluler. Hal ini disebabkan karena bakteri ini dapat bertahan hidup dalam makrofag dan terhindar dari mekanisme bakterisid makrofag. Antibodi, komplemen dan netrofil sulit membunuh mereka karena hidupnya yang berada di dalam sel. Makrofag adalah pertahanan pertahanan utama terhadap kuman ini, meskipun antibodi berperan dalam pencegahan infeksi.^{9,11} Mekanisme imun yang berperan dalam melawan infeksi *Listeria monocytogenes* adalah T-cell mediated immunity. Dosis *Listeria monocytogenes* sebanyak 10^4 ($LD_{50} = 2 \times 10^5$) dapat menginduksi sistim immunitas seluler dalam penelitian ini. Mekanisme yang diperhatikan dalam penelitian ini adalah stimulasi limfosit T dan aktivasi makrofag dimana fungsi makrofag sebagai APC yang melibatkan MHC kelas II.^{9,11,20}

Cairan peritoneal mencit yang diambil untuk mengisolasi makrofag dibuat suspensi dengan kepadatan sel 10^6 / ml. Suspensi tersebut dikultur dalam microplate berisi coverslip. Setelah inkubasi selama 30 menit ditambah medium komplet, lalu diinkubasi selama 24 jam. Setelah kultur sehari ditambahkan suspensi lateks $2,5 \times 10^7$ /ml sebanyak 200 μ l per sumuran. Kemudian diinkubasi lagi selama 60 menit. Setelah itu dicuci dengan PBS, difiksasi dengan methanol absolute (96%). Setelah fiksasi cukup baik dan methanol sudah mengering dicat dengan giemsa 20% selama 30 menit. Setelah kering dimounting pada object glass.

Pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000 kali dengan rumus indeks fagositosis.²⁸

$$\left[\frac{\Sigma \text{makrofag yang memfagosit}}{200 \text{ makrofag}} \times 100\% \right] \times \left[\frac{\Sigma \text{partikel latex dalam makrofag}}{\Sigma \text{makrofag yang memfagosit}} \right]$$

Data diolah dengan menggunakan *SPSS for Windows Release 15.0*. Dari data yang diperoleh didapatkan sebaran distribusi yang normal, sehingga data dianalisis dengan uji One-Way ANOVA untuk melihat perbedaan pada keempat kelompok dilanjutkan dengan uji Post Hoc Test Bonferroni untuk melihat perbedaan masing-masing kelompok pada derajat kemaknaan $0,05$.

HASIL PENELITIAN

Hasil dari pemeriksaan indeks fagositosis dapat dilihat dalam tabel berikut

Tabel 1. Indeks fagositosis makrofag mencit Balb/C

Kelompok	N	Maksimum	Minimum	Mean	SD
K	6	537,24	418,86	473,13	49,40
O3	6	331,24	240,98	283,17	31,39
E	6	709,74	603,68	667,26	37,57
O3E	6	754,59	606,06	674,20	53,02

One-Way ANOVA; $p=0,001$. signifikan ($p<0,05$).

Analisis statistik menggunakan uji One Way ANOVA didapatkan perbedaan yang bermakna ($p = 0,001$) pada prosentase makrofag yang memfagosit partikel lateks antar kelompok percobaan dimana terdapat 4 kelompok.^{21,22,23}

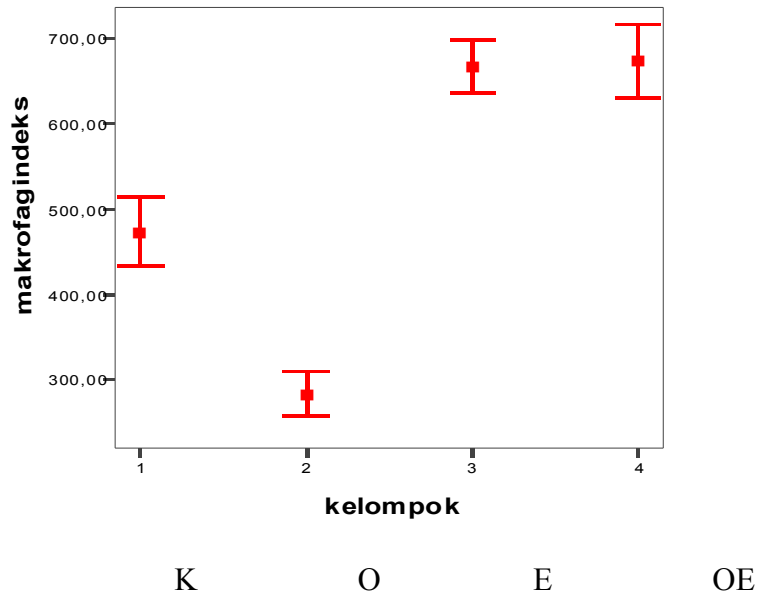
Perbedaan lebih lanjut untuk masing-masing kelompok percobaan dianalisis dengan uji Post Hoc Test Bonferroni.^{21,22}

Tabel 2. Uji Bonferroni Kemampuan Fagositosis Makrofag

Kelompok	Mean Difference	95% Confidence Lower	95% Confidence Upper	p
----------	-----------------	----------------------	----------------------	-----

K	O	189,96	116,06	263,86	0,001
	E	-194,13	-268,02	-120,23	0,001
	OE	-201,07	-274,97	-127,17	0,001
O	K	-189,96	-263,86	-116,06	0,001
	E	-384,09	-457,98	-310,19	0,001
	OE	-391,03	-464,92	-317,13	0,001
E	K	194,13	120,23	268,02	0,001
	O	384,09	310,19	457,98	0,001
	OE	-6,94	-80,84	66,95	1,000
OE	K	201,07	127,17	274,97	0,001
	O	391,03	317,13	464,92	0,001
	E	6,941	-66,95	80,84	1,000

Indeks fagositosis makrofag yang memfagosit partikel lateks pada kelompok O3E tidak berbeda secara bermakna bila dibandingkan dengan kelompok E ($p \text{ value} = 1,000$) . Namun terdapat perbedaan bermakna bila dibandingkan dengan kontrol ($p \text{ value} = 0,001$) dan O3 ($p \text{ value} = 0,001$). Dapat dilihat adanya perbedaan bermakna antara indeks fagositosis makrofag yang memfagosit partikel lateks pada mencit BALB/C kelompok O3E dibanding kelompok O3 dimana terdapat indeks fagositosis yang lebih rendah pada kelompok mencit yang mendapat diet omega-3 tanpa suplemen echinacea dibanding dengan yang diberi suplemen Echinacea ($p = 0,000$).



Gambar 1. Error Barr Empat Kelompok Perlakuan

PEMBAHASAN

Pertahanan tubuh pertama terhadap infeksi kuman *Listeria monocytogenes* adalah respon fagositosis dari makrofag sebagai pertahanan alami tubuh. Hanya makrofag yang teraktivasi saja yang bisa menjalankan fungsinya dalam membunuh bakteri ini dan mempresentasikannya pada limfosit. Hal ini dikarenakan bakteri ini dapat lolos dari mekanisme pencernaan makrofag.^{9,11,20} Pada pemberian diet omega-3 pada mencit BALB/c jantan terbukti secara bermakna menurunkan kemampuan fagositosis makrofag sehingga kemampuan pertahanan terhadap kuman *Listeria monocytogenes* menurun.

Pada kelompok percobaan lain dimana pada mencit BALB/c jantan diberikan suplementasi echinacea disamping pemberian diet omega-3 ternyata didapatkan perbedaan yang bermakna antara yang diberi suplemen Echinacea dan omega-3 dengan yang hanya diberi diet omega-3 saja. Indeks fagositosis makrofag yang memakan partikel lateks lebih tinggi pada kelompok yang diberi echinacea dan omega-3 dibanding yang diberi omega-3 saja.

Penurunan kemampuan fagositosis makrofag pada mencit BALB/c yang mendapat diet omega-3 mungkin dipengaruhi oleh beberapa faktor. Penelitian yang dilakukan oleh Frietsche yang memberikan diet minyak ikan selama 4 minggu pada mencit dan menyuntikkan kuman *Listeria monocytogenes* menunjukkan penurunan aktivasi makrofag terhadap kuman tersebut dan didapatkan penurunan kadar IFN- γ dan IL-12 dimana keduanya berpengaruh terhadap pengaturan aktivasi makrofag.^{8,24} Calder menyatakan diet omega-3 1,5 gram pada mencit dan ayam menunjukkan penurunan adhesi molekul pada permukaan monosit dan makrofag. Hal ini disebabkan karena penurunan level ekspresi antigen pada permukaan sel yang distimulir oleh IFN- γ yang levelnya juga menurun.⁶ Penelitian lain juga menunjukkan penurunan kemampuan sitolisis sel pada makrofag tikus yang diberi diet minyak ikan dan juga terlihat penurunan produksi NO dan TNF α .² Sijben dalam penelitiannya menunjukkan adanya pergeseran keseimbangan limfosit TH1/TH2 ke arah TH2 yang melemahkan imunitas seluler. Hal ini disebabkan karena siklus dari sel TH1 tergantung dari metabolisme lemak dimana kadar omega-3 yang tinggi memacu kematian sel itu, sehingga terjadi penurunan sitokin yang dihasilkan oleh TH1 yang dapat menurunkan kemampuan imunitas seluler.^{1,25}

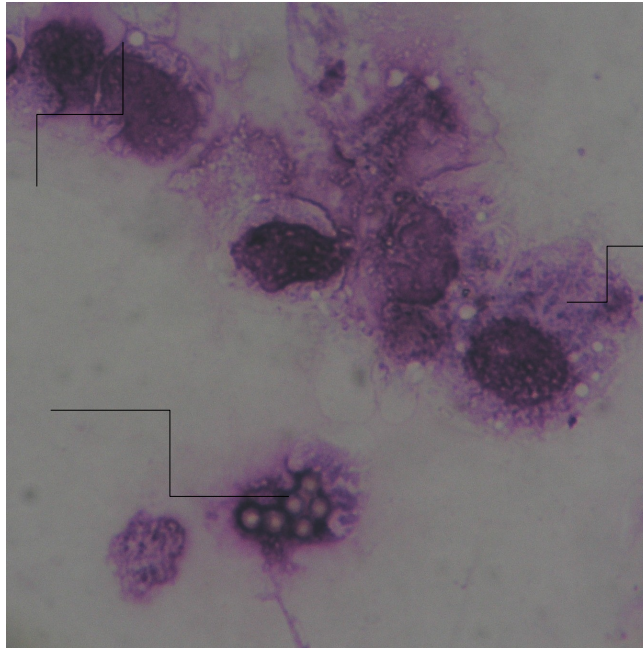
Lebih besarnya kemampuan makrofag memakan partikel lateks pada kelompok O3E dibanding kelompok O3, begitu pula pada kelompok E bila dibandingkan dengan K mungkin disebabkan oleh meningkatnya kemampuan sistim imunitas seluler mencit BALB/c yang dipengaruhi beberapa hal. Penelitian Wagner pada ekstrak tanaman *E.purpurea* dan *E.anguistifolia* menemukan 2 polisakarida yaitu heteroxylyan dan acidic arabinogalactan yang dapat menstimulasi fagositosis makrofag dan menginduksi produksi monokin yaitu IL-1. Selain itu, kedua polisakarida tersebut juga menstimulir produksi TNF- α , IFN- β 2 dan oksigen radikal.²⁶ Sehingga kemampuan memakan partikel asing oleh makrofag meningkat. (Gambar 2)

Rinniger yang meneliti Echinacea dilihat dari kemampuan fagositosis makrofag murine dan monosit darah perifer manusia secara *in vitro* menyatakan Echinacea dapat digunakan sebagai aktivator innate immunity. Dari data yang diperoleh, Echinacea menginduksi transient stimulasi sel imun non spesifik yakni makrofag memproduksi TNF- α , IL-1, IL-6 dan NO yang dapat digunakan untuk melawan invasi patogen. Sitokin yang dihasilkan makrofag berfungsi untuk memperlancar jalur imunitas seluler seperti sel limfosit T untuk meningkatkan regulasi ekspresi major histocompatibility complex (MHC) dan memproduksi IFN- γ .¹³ Hal yang sama juga dikemukakan oleh Stimpell yang meneliti kemampuan fagositosis makrofag mencit C57Bl/10 dan mencit C3H *nu/nu*.¹⁴ Parker juga menambahkan bahwa makrofag yang teraktivasi dapat mengaktifkan sel NK sehingga sistim imunitas seluler bisa berjalan dengan baik.²⁷

Pada grafik Error Barr dapat dilihat bahwa kemampuan fagositosis makrofag kelompok OE lebih tinggi sedikit dari kelompok E, namun tidak ada perbedaan yang signifikan karena adanya kemampuan fagositosis makrofag kelompok OE yang lebih rendah dari kelompok E. Hal ini mungkin disebabkan oleh adanya interaksi antara omega-3 dan Echinacea dimana pengaruh negatif dari omega-3 dapat dinetralkan oleh echinacea. Namun mekanisme interaksi antara echinacea dan omega-3 masih dipertanyakan. Lebih tingginya kemampuan fagositosis makrofag mencit pada beberapa anggota kelompok OE dibanding kelompok E mungkin disebabkan karena omega-3 mempengaruhi regulasi membran sel baik pembuluh darah, sel lemak peritoneum, serta sel makrofag sehingga makrofag sebagai pertahanan awal dapat bergerak lebih bebas dalam memfagosit benda asing.

Penelitian ini masih cukup terbatas mengingat dosis yang digunakan tidak bertingkat dan sampel percobaan yang digunakan kurang beragam. Diharapkan adanya penelitian lanjutan mengenai echinacea dan omega-3 dengan dosis bertingkat serta penggunaan sampel

percobaan yang lebih beragam. Diharapkan pula adanya penelitian observasional mengenai pemakaian echinacea dan omega-3 pada manusia.



Gambar 2. Makrofag yang sedang memfagosit partikel latex (panah putih)
Panah merah = partikel lateks.

KESIMPULAN

Adanya perbedaan bermakna dimana pemberian diet omega-3 membuat lebih rendah kemampuan fagositosis makrofag serta pemberian suplemen Echinacea meminimalkan efek negatif tersebut dilihat dari tingginya kemampuan fagositosis makrofag yang diukur dari indeks fagositosis makrofag yang memakan partikel lateks.

SARAN

Diharapkan adanya penelitian lanjutan mengenai echinacea dan omega-3 dengan dosis bertingkat serta penggunaan sampel percobaan yang lebih beragam. Bila mungkin dapat

diadakan penelitian observasional mengenai pemakaian echinacea dan omega-3 pada manusia serta dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai interaksi antara echinacea dan omega-3 secara molekuler.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala dan Staff Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Kepala dan Staff Pusat Riset Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Kepala dan Staff Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Staff Ruang D dan Ruang F, serta semua pihak yang telah membantu sehingga penelitian ini dapat terselesaikan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ergas David, Eilat Eran, Mendlovic Shlomo, Sthoeger Zeef M. n-3 Fatty Acid and The Immune System in Autoimmunity. IMAJ 2002 Jan;4:34-8.
2. Jeyarajah DR, Kielar M, Panfield J, Lu CY. Doxohexanoic Acid a Component of Fish Oil, Inhibits Nitric Oxide Production In Vitro. J Surg Res 1999 May 15;83(2):147-50.
3. Ambasht PK. Omega-3 Fatty Acid :A Boon to Human Being. Department of Biochemistry, School of Life Sciences, North Eastern Hill University. India; 2006. vol 90 p.908-9.
4. Pompos Lisa J, Fritsche Kevin L. Antigen-Driven Murine CD4⁺ T Lymphocyte Proliferation and Interleukin-2 Production Are Disminished by Dietary (n-3) Polysaturated Fatty Acids. American Society for Nutritional Sciences 2002:3293-300.
5. Hughes David A, Pinder Andrew. n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Inhibit The Antigen Presenting Function of Human Monocytes. American Journal of Clinical Nutrition 2000;7:357-60.
6. Calder Philp C. N-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Inflammation and Inflammatory Diseases. Am J Clin Nutr 2006;83(supl):1505S-19S.
7. Lee TH, Hoover RL, William JD, et al. Effects of dietary enrichment with eicosaentaenoic and docosahexaenoic acids on invitro neutrophil function. N Engl J Med 1985;312:1217-24.

8. Fritsche KL, Shahbazian LM, Feng C, Berg JN. Dietary Fish Oil reduces survival and impairs bacterial clearance in C3H/ Hen mice challenged with *Listeria Monocytogenes*. *Clin Sci (Colch)* 1997Jan;92(1):95-101.
9. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brook GF, Butel JS, Ornstor LN. In: Irawati S, editor. *Mikrobiologi Kedokteran*. 20th ed. Jakarta : EGC ; 1996 .p. 116-39, 208-9, 243-5.
10. Baratawidjaja KG. *Imunologi Dasar* 5th ed. Jakarta: Balai Penerbitan FKUI ; 2002.p. 39-62,190-2.
11. Stites Daniel. *Basic and Clinical Immunology*. 8th ed. USA : Lange Medical Publications ; 1991.p. 11-21, 620.
12. Anonymous. *Echinacea*. Yayasan Spiritia 2005 [cited 2007 November 23]: 726. Available from : URL : <http://www.spiritia.or.id/>
13. Rinniger Joseph A, Kickner Shirley, Chigurupati P, McLean A, Franck Z. Immunopharmacological Activity of Echinacea preparations Following Stimulated Digestion on Murine Macrophages and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Journal of Leukocyte Biology* 2000 Oct;68:503-10.
14. Stimpel M, Proksch A, Wagner H, Lohmann-Matthes ML. Macrophage Activation and Induction of Macrophage Cytotoxicity by Purified Polysaccharide Fractions from the Plant *Echinacea purpurea*. *Infection and Immunity* 1984 Dec;46(3):845-9.
15. Pratiknya AW. *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan*. 1st ed. Jakarta : CV Rajawali; 1986.p. 147-65.
16. Sastroasmoro S, Ismael S. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis*. 2nd ed. Jakarta : CV. Sagung Seto; 2002.p. 52, 240-58.
17. Sanderson P, Yaqoob P, Calder PC. Effects of dietary lipid manipulation upon rat spleen lymphocyte functions and the expression of lymphocyte surface molekul. *Journal of Nutritional and Environmental Medicine* 1995;5:119-32.
18. Cathcart ES, Leslie CA, Meydani SN, Hayes KC. A Fish Oil diet retard experimental amyloidosis, modulates lymphocyte function and decrease macrophage arachidonate metabolism in mice. *J Immunol* 1987;139:1850-4.
19. Hadi Sutrisno. *Metodologi Penelitian Jilid 4*. 8th ed. Yogyakarta : Andi Offset; 1995.p. 433-6.
20. Abbas AK, LichtmanAH, Pillai Shiv. *Cellular and Molecular Immunology* 6th ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 2007.p. 3-17,19-47, 75-149, 153-241, 267-320.
21. Sugianto Mikael. *36 Jam Belajar Komputer SPSS 15*. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo; 2007 .p. 71-88, 143-7, 192-7.

22. Dahlan Sopiudin. *Statistika Untuk Kedokteran dan Kesehatan*. 1st ed. Jakarta: PT. ARKANS; 2004.p. 48-71, 89-101.
23. Pramesti Getut. *Solusi Ekspres SPSS 15*. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo; 2008.p. 1-7, 11-25, 34-109.
24. Fritsche KL, Byrge M, Feng C. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil reduces interleukin-12 and interferon-gamma production in mice. *Immunol Lett*. 1999 Feb;65(3):167-73.
25. Sijben JWC, Nieuwland MGB, Kemp B, Permentier HK, Schrama JW. Interactions and Antigen Dependence of Dietary n-3 and n-6 Polyunsaturated Fatty Acids on Antibody Responsiveness in Growing Layer Hens. *Poultry Science Association, Inc.* 2001;80:885-93.
26. Wagner H. Search for Plant Derived Natural Product With Immunostimulatory Activity (Recent Advances). *Pure and Appl. Chem IUPAC*. 1990; 62(7):1217-22.
27. Parker Juliet. *Echinacea and The Immune System*. Biosciences The University of Notingham. 2005:1-8.
28. Colligan John E, Krusbeek Ada M, Marguiles David H, Shevach M Ethan, Stober Warren. In: Richard Coico, editor. *Current Protocols in Immunology Volume 2*. New York : Medical School City University of New York; 2001.p. 14.6.2-3.
29. Wibowo, Suryo Adi. Pengaruh Pemberian Diet Minyak Ikan Terhadap Kemampuan Fagositosis Makrofag pada Mencit Jantan Tua BALB/C yang diinfeksi *Listeria monocytogenes*. *Bagian Fisika Medik Fakultas Kedokteran Undip*. 2004 :1-14.