

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Gambaran Umum Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dimulai dengan menentukan subyek penelitian. Pada penelitian ini digunakan 30 ekor mencit galur BALB/c jantan, umur 8 minggu dan berat  $\pm$  20 gram yang diperoleh dari Unit Pengelolaan Hewan Percobaan (UPHP). Mencit yang dipilih adalah mencit galur BALB/c karena mencit ini biasa digunakan dalam studi mengenai imunologi (Johnson, 2012). Penelitian ini menggunakan mencit umur 8 minggu karena kadar hormonalnya sudah stabil seperti manusia pada usia dewasa. Mencit jantan dipilih karena respon imun yang ditimbulkan tidak dipengaruhi hormon. Pada mencit betina yang mengalami penurunan estrogen akan menimbulkan efek imunostimulasi. Hal ini dapat menyebabkan pengaburan efek imunosupresi ekstrak etanol *Citrullus lanatus* (Gunawan, 2007).

Setelah didapatkan mencit sesuai kriteria, dilakukan aklimatisasi selama 1 minggu, dipelihara dalam kondisi kandang dan pencahayaan yang sama, diberi pakan standar BR I dan minum akuades. Tujuan aklimatisasi agar mencit terbiasa dengan tempat tinggal yang baru dan tidak stres. Selama penelitian dilakukan pengukuran berat badan mencit secara teratur setiap minggu. Secara umum berat badan mencit mengalami peningkatan. Setelah diaklimatisasi selama 1 minggu, mencit dibagi ke dalam 6 kelompok secara *simple random sampling* yang masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit. Terdapat kelompok kontrol normal, kelompok kontrol negatif (hanya disensitisasi menggunakan Ovalbumin), kelompok kontrol positif (disensitisasi OVA dan diberi Metilprednisolon) dan tiga kelompok

perlakuan (disensitisasi OVA dan diberi ekstrak etanol *C. lanatus* dengan dosis 175 mg/kgbb/hari, 350 mg/kgbb/hari, 700 mg/kgbb/hari selama 28 hari).

Tahap selanjutnya adalah pengujian taksonomi terhadap buah semangka di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada untuk menghindari kesalahan dalam pengambilan objek penelitian. Berdasarkan surat keterangan uji taksonomi nomor 0644/S.Tb./II/2015, dapat dipastikan bahwa objek yang diuji benar *Citrullus lanatus*.

Dilakukan pembuatan ekstrak etanol buah semangka di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada. Ekstrak etanol buah *C. lanatus* didapatkan dari buah semangka matang yang diperoleh dari Sentolo, Kulon Progo yang dibuat menjadi simplisia, dimaserasi selama 7 hari menggunakan larutan penyari etanol 80% dan diuapkan hingga didapatkan ekstrak kental. Pelarut etanol 80% digunakan karena etanol merupakan pelarut yang sifatnya *universal* dengan indeks polaritas sebesar 5.2 sehingga senyawa polar maupun polar dapat terekstraksi secara maksimal (Normansyah, 2013; Poeloengan, 2007).

Ekstrak etanol *C. lanatus* tersebut diberikan pada mencit dengan bantuan sonde dengan dosis 175 mg/kgbb/hari (K-P1), 350 mg/kgbb/hari (K-P2), dan 700 mg/kgbb/hari (K-P3) selama 28 hari. Dosis tersebut didapatkan dari konversi dosis ekstrak pepaya yang memberikan efek hepatoproteksi pada tikus (Kantham, 2009). Kandungan flavonoid yang terdapat dalam pepaya adalah sebesar  $57.70 \pm 2.11$  mg rutin/100g berat kering (Asmah, 2012). Kandungan flavonoid dalam mg/100g pada buah semangka sebanyak  $58.10 \pm 0.33$  (Johnson *et al.*, 2012).

Kandungan flavonoid pada kedua buah tersebut hampir sama sehingga dilakukan konversi dosis dari ekstrak pepaya tersebut.

Pada kelompok kontrol positif (K-MP), mencit diberi Metilprednisolon dengan dosis 0.13 mg/hari selama 28 hari. Pemilihan kortikosteroid sebagai kontrol positif dikarenakan obat tersebut mudah ditemukan dan penggunaannya di klinik sangat luas. Prednisolon merupakan golongan kortikosteroid oral yang sering digunakan untuk terapi supresi penyakit dalam jangka waktu panjang (Novia, 2015). Konversi dosis ekstrak semangka dan Metilprednisolon dapat dilihat di Lampiran 3.

Tahap selanjutnya adalah pembuatan mencit BALB/c model alergi saluran pencernaan dengan cara sensitisasi secara intraperitoneal pada hari ke-15 dengan 0.15 cc OVA dalam  $\text{Al}(\text{OH})_3$ /mencit dari 2.5 mg OVA yang dilarutkan pada 7.75 ml aluminium hidroksida dan pada hari ke-22 dengan 0.15 cc OVA dalam akuades/mencit dari 2.5 mg OVA yang dilarutkan pada 10 ml akuades. Sensitisasi OVA intraperitoneal memiliki kelebihan dalam hal ketepatan dosis dan pemberian tidak perlu dilakukan setiap hari (Kartikawati, 2003). Pada hari ke-23 hingga hari ke-28, mencit dipapar lagi peroral dengan 0.15 cc OVA dalam akuades yang dibuat dari 2.5 mg OVA dalam 2.5 ml akuades. Pemaparan OVA berulang dilakukan agar timbul respon imunitas yang sistemik (Subijanto, 2008; Meilandani, 2014).

Tahap berikutnya adalah pembedahan mencit yang dilakukan pada hari ke-29. Mencit dikorbankan, diambil organ limpanya lalu diletakkan dalam formalin 10%. Bagian lengkungan limpa dihilangkan, bagian tengah yang lurus diambil

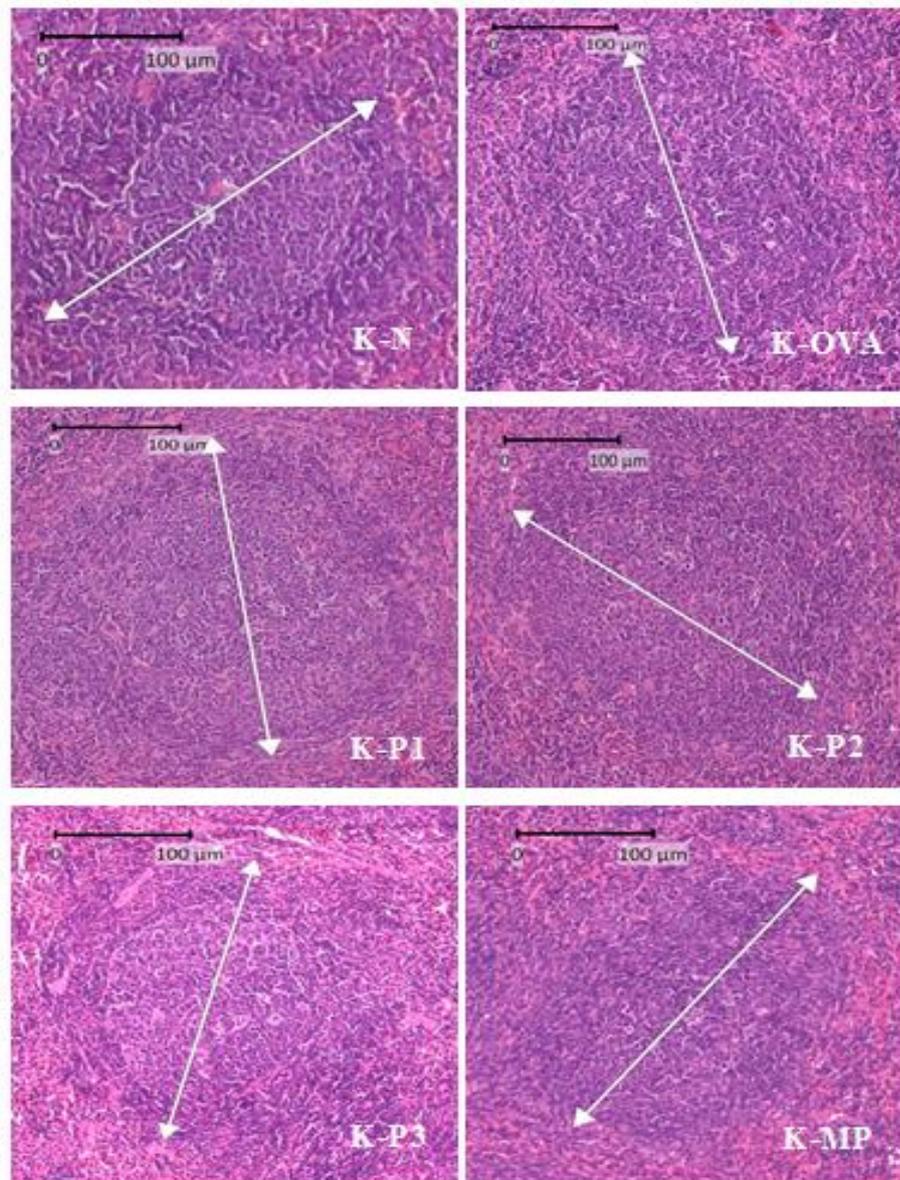
kemudian dipotong membujur. Potongan tersebut lalu ditanam dalam media parafin. Blok parafin yang mengandung jaringan dipotong dengan tebal 3-4  $\mu\text{m}$  menggunakan mikrotom. Jaringan yang terpotong dikembangkan di atas air (*waterbath*) lalu ditangkap dengan gelas objek. Potongan direkatkan pada gelas objek dengan perekat *Ewith*.

Tahap selanjutnya adalah pewarnaan preparat dengan *Hematoxylin-Eosin* (HE). *Hematoxylin* akan mewarnai komponen inti sel dengan warna biru kehitaman, sedangkan pewarnaan *Eosin* akan membuat organela-organela sitoplasma berwarna merah muda, merah, atau oranye.

Tahap berikutnya adalah pengamatan diameter pulpa alba limpa mencit menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 10x10 pada 10 lapang pandang. Pulpa alba yang diamati setiap preparat berjumlah 15 pulpa. Diameter didapatkan dari diameter maksimum pulpa yang dirata-rata dengan diameter maksimum tegak lurus nya. Tahap terakhir adalah analisis data. Uji statistik yang dipilih adalah uji non parametrik *Kruskal-Wallis* dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

## **B. Hasil Penelitian**

Gambaran histologi pulpa alba limpa mencit BALB/c yang diamati dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Histologi pulpa alba limpa mencit BALB/c dengan perwarnaan HE perbesaran 10x pada kelompok normal (K-N), kontrol negatif (K-OVA), kontrol positif (K-MP), dan kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol *C. lanatus* dosis 175 mg/kgbb (K-P1), 350 mg/kgbb (K-P2), 700 mg/kgbb selama 28 hari. Keterangan: ↔ : Diameter pulpa alba limpa

Setelah dilakukan pengukuran diameter pulpa alba limpa pada keenam kelompok, dilakukan penghitungan rata-rata diameter pulpa alba limpa mencit yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata diameter pulpa alba limpa mencit BALB/c ( $x \pm SD$ ) dalam satuan  $\mu\text{m}$  pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah 28 hari perlakuan

No.	Kelompok	Diameter Pulpa Alba Limpa ( $\mu\text{m}$ )
1	K-N	$276.67 \pm 67.43^a$
2	K-OVA	$286.48 \pm 59.85^{ab}$
3	K-P1	$306.05 \pm 72.65^{bc}$
4	K-P2	$318.57 \pm 80.86^c$
5	K-P3	$258.63 \pm 51.92^{ad}$
6	K-MP	$256.05 \pm 45.01^{ad}$

Keterangan: SD: standar deviasi; <sup>a,b,c,d</sup>: angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda yang nyata antar kelompoknya.

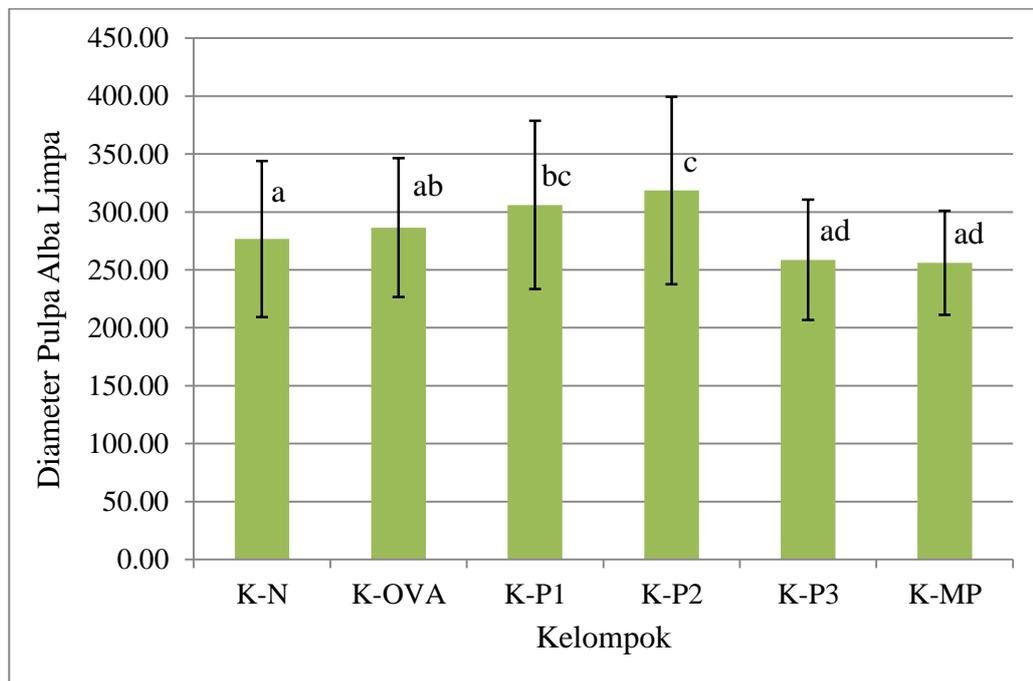
Kelompok perlakuan ekstrak etanol buah *Citrullus lanatus* dosis 350 mg/kgbb dan disentisisasi dengan OVA (K-P2) memiliki rata-rata diameter pulpa alba yang paling tinggi yaitu  $318.57 \pm 80.86 \mu\text{m}$ , sedangkan kelompok kontrol positif dengan pemberian Metilprednisolon peroral dengan dosis 0.13 mg dan disentisisasi dengan OVA (K-MP) memiliki rata-rata diameter pulpa alba paling rendah yakni  $256.05 \pm 45.01 \mu\text{m}$ . Pada kelompok perlakuan ekstrak etanol *C. lanatus* hanya kelompok ekstrak etanol buah *C. lanatus* dosis 700 mg/kgbb yang menunjukkan penurunan rata-rata diameter pulpa alba yakni  $258.63 \pm 51.92 \mu\text{m}$ . Kelompok ini memiliki rata-rata lebih rendah dibanding kelompok kontrol normal dan hampir sama dengan kelompok kontrol Metilprednisolon.

Setelah pengukuran rata-rata, dilakukan pengujian normalitas data menggunakan *Kolmogorov-Smirnov* karena jumlah sampel lebih dari 50. Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa K-P1 memiliki nilai  $p=0.007$  ( $p < 0.05$ ) sehingga

distribusi data pada kelompok ini tidak normal. Sedangkan pada kelompok lain didapatkan nilai  $p > 0.05$  sehingga distribusi datanya normal. Pada uji homogenitas varians didapatkan hasil  $p < 0.05$ , menunjukkan bahwa data memiliki varians yang tidak sama. Data memiliki distribusi yang tidak normal dan varians yang berbeda maka tidak memenuhi syarat uji parametrik. Uji statistik yang dipilih adalah uji non prametrik *Kruskal-Wallis*. Hasil uji *Kruskal-Wallis* didapatkan  $p = 0.00$  ( $p < 0.05$ ) berarti rata-rata diameter pulpa alba limpa pada keenam kelompok perlakuan memiliki perbedaan. Kemudian dilakukan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui kelompok mana dari keenam kelompok tersebut yang memiliki perbedaan.

Hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa K-N tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan K-P3 dan K-MP ( $p > 0.05$ ). Sedangkan antara K-OVA dengan K-P3 dan K-MP menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0.05$ ). Hasil pengujian K-P3 dengan K-MP menunjukkan nilai  $p = 0.959$  ( $p > 0.05$ ) sehingga kedua kelompok ini tidak memiliki perbedaan rata-rata diameter pulpa alba yang signifikan.

Pada Gambar 8 dapat dilihat perbandingan rata-rata diameter pulpa alba limpa dari keenam kelompok. Hasil pengujian *Mann-Whitney* dapat dilihat pada grafik tersebut, diagram batang yang diikuti keterangan huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata antar kelompoknya.



Gambar 8. Rata-rata diameter pulpa alba mencit BALB/c tiap kelompok menunjukkan perbedaan. Keterangan: <sup>a,b,c,d</sup>: Diagram batang yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda yang nyata antar kelompoknya.

### C. Pembahasan

Pada penelitian ini, dilakukan uji efek imunomodulator ekstrak etanol *Citrullus lanatus* pada mencit BALB/c yang diinduksi oleh Ovalbumin. Seluruh mencit, kecuali kelompok kontrol normal, disensitisasi menggunakan OVA. Rata-rata diameter pulpa alba pada kelompok kontrol negatif (K-OVA) lebih tinggi dibandingkan dengan rata-rata pada kelompok kontrol normal (K-N). Hal ini disebabkan karena OVA mampu merangsang pembentukan respon imun ke arah sel Th2 dimana akan terjadi reaksi hipersensitivitas tipe I (Kartikawati, 2003). OVA akan meningkatkan sel Th2 untuk mensekresikan berbagai macam interleukin (IL-4, IL-5, IL-9 dan IL-13) yang dapat meningkatkan tingkat inflamasi (Prasetyo, 2007). IL-4 merangsang sel B untuk membentuk IgE. IgE

akan diikat oleh sel yang memiliki reseptor untuk IgE seperti sel mast, basofil dan eosinofil. Apabila tubuh terpajan ulang oleh alergen sel mast akan mengalami degranulasi sehingga mensekresikan histamin, prostaglandin, dan leukotrien (Baratawidjaja, 2009; Abbas dan Litchman, 2009).

Antigen asing dapat masuk ke dalam tubuh melalui lapisan epitel saluran pencernaan. Sel-sel dendritik di epitel akan mengikat antigen tersebut lalu masuk ke dalam saluran limfe untuk dibawa ke kelenjar getah bening regional agar diproses oleh limfosit T. Sedangkan antigen yang tidak terikat sel dendritik di lapisan epitel akan bersirkulasi dalam aliran darah sehingga akan ditangkap oleh APC di dalam limpa untuk selanjutnya diproses oleh limfosit (Baratawidjaja, 2006).

Limpa adalah organ sistem imun sekunder terbesar yang mempunyai fungsi untuk melawan antigen yang terdapat pada aliran darah serta menyaring darah dari benda asing dan sel darah merah yang rusak atau tua (Cesta, 2006). Pada limpa, limfosit mengenal fragmen antigen *non-self* yang dipresentasikan makrofag, sel dendritik, dan fagosit. Presentasi fragmen antigen *non-self* diikuti oleh sekresi IL-12 dan IL-18 yang akan menstimulasi sel T menghasilkan interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) yang mengaktivasi sel NK (*natural killer*) dan CD8+ (Novia, 2015). Salah satu komponen limpa adalah pulpa putih (*alba*). Pulpa *alba* berperan untuk menghasilkan limfosit. Respon imun limpa terhadap OVA adalah dengan meningkatkan aktivitas proliferasi sel-sel limfosit pada pulpa *alba* sehingga terjadi peningkatan ukuran diameter pulpa *alba*.

Peningkatan diameter pulpa alba pada K-OVA ini sesuai dengan penelitian oleh Makiyah (2004) tentang peningkatan diameter pulpa alba akibat paparan Ultraviolet C pada mencit. Sinar ultraviolet dianggap sebagai antigen sehingga terjadi proliferasi sel-sel limfosit pada pulpa alba limpa mencit.

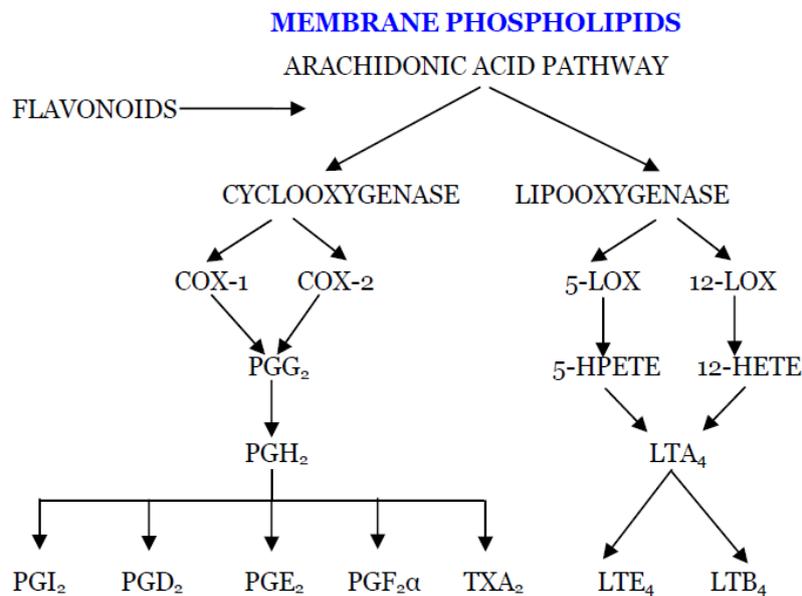
Kelompok kontrol positif (K-MP) menunjukkan rata-rata diameter pulpa alba paling rendah. Mencit diberi Metilprednisolon dosis 0.13 mg/hari selama 28 hari. Metilprednisolon adalah obat golongan kortikosteroid. Manfaatnya antara lain mengatasi radang (antiinflamasi), menekan sistem imun dalam proses alergi, mengatur metabolisme protein dan karbohidrat, mempengaruhi kadar natrium dalam darah, dan lain-lain (Novia, 2015). Cara kerja obat tersebut sebagai agen antiinflamasi dan immunosupresan adalah dengan cara induksi limfositopenia dan menghambat diferensiasi dan proliferasi limfosit. Obat ini akan mengganggu komunikasi intraselular antara leukosit dengan produksi limfokin (IL-1, IL-2 dan TNF) sehingga fungsi makrofag akan terganggu. Namun obat ini juga memiliki efek samping yang membahayakan tubuh jika digunakan dalam jangka waktu lama. Selama penelitian berlangsung terdapat dua mencit yang mati dari kelompok tersebut. Hal ini dapat disebabkan oleh efek samping Metilprednisolon seperti atrofi otot, osteoporosis, *moon face*, *buffalo hump*, lemak ekstremitas berkurang, gangguan reabsorpsi  $\text{Na}^+$  serta sekresi  $\text{K}^+$  dan  $\text{H}^+$  di ginjal, gangguan absorpsi  $\text{Ca}^{2+}$  di usus, dan gangguan neuropsikiatri (Sudir, 2007).

Pemberian ekstrak etanol *Citrullus lanatus* dosis 700 mg/kgbb/hari terbukti dapat menurunkan diameter pulpa alba limpa. Hasil uji statistik menunjukkan kelompok ekstrak etanol *C. lanatus* dosis 700 mg/kgbb memiliki

rata-rata diameter yang tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol normal dan kelompok kontrol Metilprednisolon. Hal ini disebabkan karena ekstrak tersebut mengandung flavonoid. Pada semangka terdapat kandungan flavonoid, alkaloid, saponin, glikosid, tannin, dan fenol (Deshmukh, 2015).

Salah satu senyawa penting yang terkandung pada semangka ini adalah flavonoid. Flavonoid adalah senyawa fenol yang dapat berperan sebagai agen antiinflamasi. Dari berbagai penelitian terdapat banyak mekanisme kerja senyawa tersebut. Pertama, flavonoid dapat menghambat enzim yang mengatur respon inflamasi, terutama tirosin dan serin-threonin protein kinase yang berperan dalam transduksi dan aktivasi sel dalam proses proliferasi sel T, aktivasi limfosit B, dan produksi sitokin oleh monosit. Kedua, flavonoid dapat mengurangi produksi asam arakidonat, prostaglandin, leukotriene, dan NO (nitrit oksida) dengan cara menghambat enzim fosfolipase A2, siklooksigenase (COX), lipooksigenase, dan nitrit oksida sintase (NOS) (García-Lafuente *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2004).

Penurunan diameter pulpa alba disebabkan efek antiinflamasi flavonoid yang menghambat proliferasi sel limfosit. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian oleh Gupta (2016) yang meneliti aktivitas antiinflamasi dan immunosupresi kandungan flavonoid pada *Santalum album*, *Butea frondosa*, *Emblica officinalis*. Kandungan flavonoid tersebut terbukti menekan proliferasi, menurunkan produksi NO dan CD14 *surface marker*.



Gambar 9. Mekanisme kerja flavonoid pada inflamasi (Rang, 2007)

Selain memiliki efek immunosupresi, flavonoid juga memiliki efek immunostimulasi. Terlihat dari hasil rata-rata diameter kelompok ekstrak etanol *C. lanatus* dosis 175 mg/kgbb (K-P1) dan kelompok ekstrak etanol *C. lanatus* dosis 350 mg/kgbb (K-P2) yang lebih tinggi dibanding kelompok lain, termasuk K-OVA. Hal ini dapat terjadi melalui mekanisme peningkatan IL-2 dan proliferasi limfosit. Penelitian Jiao *et al.* (2001) menyebutkan bahwa senyawa flavonoid pada daun dan batang *Astragalus membranaceus* dapat meningkatkan proliferasi limfosit dan meningkatkan aktivitas sel NK.