

Pengaruh pemberian ekstrak patikan kebo (*Euphorbia hirta*) terhadap derajat inflamasi bronkus pada mencit Balb/C model asma alergi

Effect of patikan kebo (*Euphorbia hirta*) extract with bronchial inflammation grade on Balb/C mice asthma allergic model

KUNTORO, SRI SUTATI, R. PRIHANDJOJO ANDRI PUTRANTO

Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 22 Januari 2010. Revisi disetujui: 24 Februari 2010.

Abstract. Kuntoro, Sutarti S, Putranto RPA. 2010. Effect of patikan kebo (*Euphorbia hirta*) extract with bronchial inflammation grade on Balb/C mice with asthma allergic model. *Biofarmasi* 8: 37-40. This research aimed to determine the effect of patikan kebo extract towards bronchial inflammation grade on Balb/C mice asthma allergic model. This research used a laboratory experiment with a post-test only control group design by using 24 Balb/C male mice, divided into four groups (control group, asthma allergic group, patikan kebo 10 mg/mice, patikan kebo 20 mg/mice). Samples were sensitized on day-0 and day-14 intraperitoneally, and continued in day-21, 23, 25 and 27 aerosol in 30 minutes. In day-28, the bronchus samples were collected, and the bronchial inflammation grade was observed with Hematoxylin-Eosin staining. The obtained data were analyzed statistically with Kruskal-Wallis continued with Mann-Whitney using the program of SPSS for Windows Release 12.0. The data were analyzed with a margin of significance $p < 0.05$. The grading the inflammation of control group was grade 2 (83.33%) and grade 3 (16.67%). Asthma allergic group was grade 3 (16.67%) and grade 4 (83.33%). Patikan kebo 10 mg/mice group was grade 2 (33.33%) and grade 3 (66.67%). Patikan kebo 20 mg/mice group was grade 2 (33.33%) and grade 3 (66.67%). There was a significant difference between asthma allergic group with patikan kebo 10 mg/mice and patikan kebo 20 mg/mice group in a grade inflammation ($p = 0.009$). There was no significant difference in a grade inflammation between patikan kebo 10 mg/mice group with patikan kebo 20 mg/mice ($p = 1,000$). Patikan kebo extract 10 mg/mice and 20 mg/mice reduced the bronchial inflammation grade in Balb/C mice asthma allergic model.

Keywords: Asthma allergic, bronchus, grade inflammation, patikan kebo

PENDAHULUAN

Alergi adalah suatu kondisi hipersensitivitas yang diinduksi oleh pajanan terhadap antigen tertentu yang menimbulkan reaksi imunologi berbahaya pada pajanan berikutnya (Dorland 2002). Degranulasi mastosit merupakan komponen sentral pada penyakit alergi, sedangkan manifestasi klinis dan patologisnya bergantung pada letak dan kronisitasnya (Abbas dan Lichtman 2003).

Alergi pada saluran pernapasan diawali dengan masuknya alergen ke dalam tubuh. Alergen selanjutnya akan diolah oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) dan hasil olahan alergen akan dikomunikasikan kepada sel $CD4^+$ Th2 (*T-helper 2*) (Heru dan Sukanto 2006). Sel $CD4^+$ sangat berperan dalam menimbulkan inflamasi yang menjadi dasar dari penyakit asma (Blease et al. 2000). Selanjutnya, sel $CD4^+$ Th2 akan memacu sel B untuk menghasilkan Ig E (Imunoglobulin E). Kemudian, Ig E yang terbentuk akan menempel pada sel mast dalam saluran pernapasan. Pada pemaparan ulang oleh alergen yang sama, alergen tersebut akan diikat oleh Ig E yang terdapat di saluran pernapasan (Abbas dan Litchman 2003). Ikatan tersebut akan memacu degranulasi dari sel mast yang menghasilkan mediator-mediator inflamasi seperti histamin, leukotrien, tromboksan, prostaglandin, dan *Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis* (ECF-

A). Mediator-mediator inflamasi tersebut akan memacu infiltrasi sel-sel radang seperti eosinofil, limfosit, makrofag, neutrofil, dan basofil ke dalam jaringan bronkus (Abbas dan Litchman 2003). Infiltrasi sel-sel radang tersebut akan menyebabkan peradangan pada bronkus.

Patikan kebo (*Euphorbia hirta* L.) merupakan jenis tumbuhan yang banyak tumbuh di sekitar kita, tetapi pemanfaatannya masih sangat kurang. Patikan kebo mengandung banyak senyawa kimia yang dapat menunjukkan aktivitas antihistamin, antiinflamasi, antilipoksigenase, serta menghambat enzim siklo-oksigenase dan menghambat Ca^{2+} influx (Duke 2009). Senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak patikan kebo diharapkan mampu memperkecil kerusakan jaringan (inflamasi) yang diakibatkan oleh pelepasan mediator lipid (leukotrien), prostaglandin, dan histamin pada peristiwa asma alergi. Dari permasalahan tersebut maka perlu untuk dilakukan penelitian mengenai pengaruh ekstrak patikan kebo terhadap derajat inflamasi bronkus pada mencit Balb/C model asma alergi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak patikan kebo (*Euphorbia hirta* L.) terhadap derajat inflamasi bronkus mencit Balb/C model asma alergi.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret.

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kandang hewan ukuran 35x20x15 cm³, spuit injeksi 1 mL, sonde 1 mL, tabung ukur 10 mL dan 50 mL, *Beaker glass* 100 mL, mikroskop cahaya, timbangan listrik merek *Mettle Toledo*, dan Nebulizer.

Sementara itu, bahan-bahan yang digunakan meliputi ekstrak patikan kebo, akuabides, BR1, ovalbumin, saluran pernapasan hewan percobaan (bronkus), formalin *buffer* 10%, blok parafin 2 buah, dan pewarna HE.

Jenis penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik, dengan *post-test only control group design*.

Subjek penelitian

Subjek penelitian berupa 24 ekor mencit Balb/C jantan, dengan berat badan antara 20-30 gram, dan berumur 6-8 minggu. Mencit Balb/C diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Setyabudi, Surakarta. Bahan makanan untuk mencit berupa pakan mencit BR1.

Teknik sampling

Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan metode *accidental sampling*. Jumlah sampel ditentukan berdasarkan rumus Federer, yaitu:

$$(k-1)(n-1) \geq 15$$

Keterangan:

k = jumlah kelompok

n = jumlah sampel tiap kelompok (Purawisastra 2001)

Dalam penelitian ini, subjek penelitian dibagi menjadi 4 kelompok, sehingga berdasarkan rumus Federer didapatkan jumlah subjek masing-masing kelompok sebagai berikut:

$$(k-1)(n-1) \geq 15$$

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Jadi, minimal tiap kelompok terdiri dari 6 ekor mencit Balb/C. Pada penelitian ini digunakan 6 ekor mencit untuk tiap kelompok perlakuan.

Penentuan dosis perlakuan

Dosis ekstrak patikan kebo

Berdasarkan penelitian, dosis patikan kebo yang digunakan 500-1000 mg/kg BB/hari, atau 0,5-1 mg/gr BB/hari. Dengan demikian, dengan mengambil rata-rata berat badan mencit 20 g maka dosis patika kebo yang digunakan menjadi 10-20 mg/20 g/hari. Dosis per oral patikan kebo kelompok 3 yang digunakan sebesar 0,1 mL yang mengandung 10 mg ekstrak patikan kebo, sehingga untuk kelompok 4 digunakan 0,2 mL.

Pemberian ekstrak patikan kebo secara per oral pada mencit menggunakan dosis 10 mg/mencit/hari pada

kelompok 3 dan 20 mg/mencit/hari pada kelompok 4. Dosis yang disondekan pada mencit kelompok 3 adalah 0,1 mL dan pada kelompok 4 adalah 0,2 mL. Jumlah ekstrak patikan kebo yang diperlukan selama penelitian adalah:

$$(10 + 20) \text{ mg/mencit/hari} \times 6 \text{ mencit} \times 27 \text{ hari} = 4860 \text{ mg} \leftrightarrow 5000 \text{ mg}$$

Volume akuabides yang digunakan sebagai pelarut ekstrak patikan kebo adalah:

$$5000 \text{ mg}/10 \text{ mg} = V (\text{mL})/0,1 \text{ mL} = 5000 \text{ mg} \times 0,1 \text{ mL}$$

$$V = 50 \text{ mL}$$

Dosis ovalbumin

Pada penelitian ini, sensitisasi pada mencit dilakukan dengan melalui injeksi ovalbumin dengan dosis: (i) Pada hari ke-0 dan ke-14, sebanyak 0,15 cc OVA dalam Al(OH)₃/mencit dari 2,5 mg OVA yang dilarutkan dalam 7,75 mL Al(OH)₃. (ii) Pada hari ke-21, 23, 25, dan 27, ovalbumin aerosol 50 mg dilarutkan ke dalam 5 mL akuabides selama 30 menit.

Cara kerja

Sebelum perlakuan

Kandang mencit disiapkan. Satu kandang berisi satu kelompok mencit. Mencit diadaptasikan terlebih dahulu dengan lingkungan selama 7 hari. Sebanyak 30 ekor mencit dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit dengan rincian sebagai berikut: (i) Kelompok 1: sebagai kontrol negatif, mencit hanya diberi diet standar tanpa perlakuan. (ii) Kelompok 2: mencit diberi diet standar + paparan ovalbumin. (iii) Kelompok 3: mencit diberi diet standar + paparan ovalbumin + ekstrak patikan kebo 10 mg/mencit/hari secara per oral. (iv) Kelompok 4: mencit diberi diet standar + paparan ovalbumin + ekstrak patikan kebo 20 mg/mencit/hari secara per oral.

Hewan percobaan model asma alergi

Pada hari ke-0 dan ke-14, mencit disensitisasi melalui intraperitoneal dengan 0,15 cc dalam Al(OH)₃/mencit dari 2,5 mg ovalbumin yang dilarutkan dalam 7,75 mL Al(OH)₃. Selanjutnya, pada hari ke-21, ke-23, ke-25, dan ke-27, mencit dipaparkan dengan ovalbumin aerosol dari 50 mg ovalbumin yang dilarutkan dalam 5 mL akuabides dengan alat *nebulezer* dengan kecepatan 6 L/menit selama 30 menit.

Setelah perlakuan

Setelah 24 jam pada akhir paparan ovalbumin, semua mencit dikorbankan dengan menggunakan teknik *cervical dislocation*. Selanjutnya diambil bronkusnya dan dibuat preparat dengan pengecatan Hematoksin-Eosin (HE). Pada tahap berikutnya dilihat gambaran histologist preparat dengan mikroskop cahaya untuk ditentukan tingkatan reaksi inflamasinya.

Analisis data

Data hasil penelitian berupa *grade* histologis saluran pernapasan yang diperoleh pada hari ke-28. Data dikumpulkan secara serempak kemudian dianalisis

menggunakan uji Kruskal-Wallis dan dilanjutkan dengan Mann-Whitney menggunakan Program SPSS for Windows Release 12.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian

Setelah perlakuan, ditentukan infiltrasi sel-sel radang dengan teknik pewarnaan Hematoksin-Eosin. Selanjutnya, preparat bronkus diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali dalam satu bidang pandang dan diamati infiltrasi sel-sel radang ke dalam jaringan bronkus (Gambar 1).

Dari data yang diperoleh selanjutnya diuji dengan uji statistik menggunakan software Program SPSS for Windows Release 12.0. Uji pertama yang dilakukan adalah uji *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui adanya perbedaan dalam seluruh kelompok populasi. Dari hasil perhitungan statistik dengan uji *Kruskal-Wallis* diperoleh perbedaan yang signifikan di antara keempat kelompok sampel dengan $p=0,002$.

Oleh karena terdapat perbedaan yang signifikan di antara keempat kelompok sampel maka uji statistik dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney. Dari hasil uji Mann-Whitney ($\alpha=0,05$), terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok 1 dengan kelompok 2, serta kelompok 2 dengan kelompok 3 dan 4. Adapun untuk kelompok 1 dengan kelompok 3 dan 4, serta kelompok 3 dengan kelompok 4 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Data selengkapnya disajikan dalam Tabel 1, Gambar 2.

Pembahasan

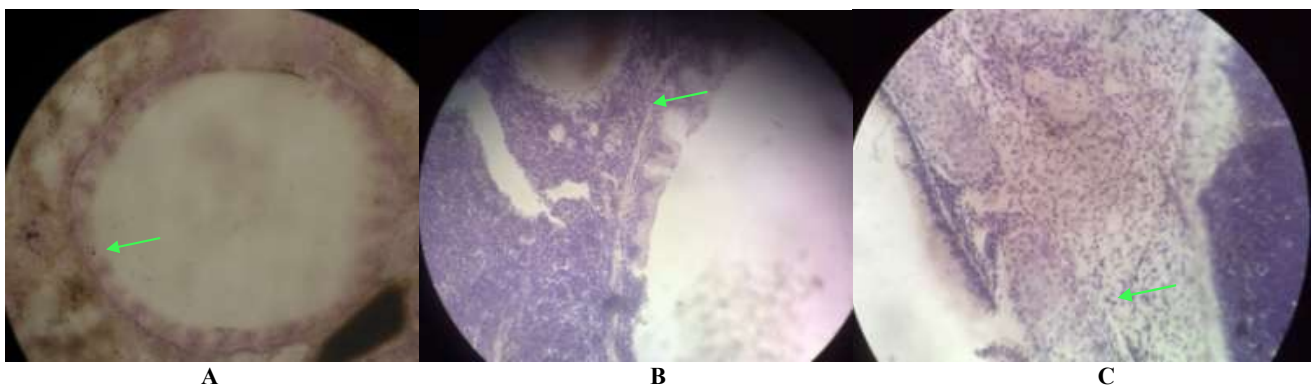
Ovalbumin yang berfungsi sebagai alergen akan diproses oleh APC dan selanjutnya akan memacu diferensiasi sel CD4 *naive* menjadi sel CD4⁺ Th2. Sel CD4⁺ Th2 tersebut melalui IL-4 dan IL-5 yang dihasilkan akan memacu sel B untuk memproduksi Ig E yang spesifik

terhadap ovalbumin. Ig E yang diproduksi akan berikatan dengan reseptor FcεRI pada permukaan sel mast dan basofil.

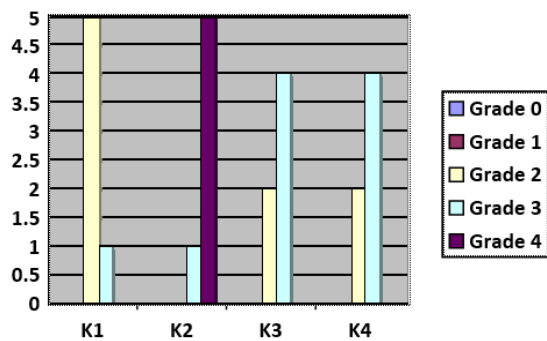
Terjadi paparan ulang oleh alergen yang sama (OVA), akibatnya terjadi *cross-linking* yang akan memicu respons sel mast, meliputi reaksi fase cepat dan reaksi fase lambat. Reaksi cepat tersebut diakibatkan oleh mediator primer, utamanya histamin, yang menyebabkan terjadinya vasodilatasi pembuluh darah bronkus dan konstriksi otot polos bronkus. Sementara itu, reaksi fase lambat yang terjadi beberapa jam kemudian diperantarai oleh mediator sekunder yang terdiri atas mediator lipid (leukotrien, prostaglandin, dan PAF) serta sitokin dan kemokin proinflamasi. Mediator-mediator proinflamasi tersebut akan menyebabkan infiltrasi sel-sel radang ke jaringan bronkus. Hasil penelitian memperlihatkan pemaparan OVA secara inhalasi mampu meningkatkan derajat inflamasi pada jaringan bronkus, hal ini terlihat dari hasil *scoring* infiltrasi sel radang pada kelompok OVA yang menunjukkan *grade* 3 sebanyak 1 sampel (16,67%) dan *grade* 4 sebanyak 5 sampel (83,33%), yang berbeda secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol negatif dengan $p=0,002$ (Tabel 1). Hal ini sesuai dengan penelitian Diding et al. (2007) dimana pemaparan OVA secara intraperitoneal dan dilanjutkan secara aerosol dapat menimbulkan reaksi alergi pada saluran pernapasan mencit yang ditunjukkan dengan derajat inflamasi bronkus.

Tabel 1. Hasil perhitungan uji Mann-Whitney ($\alpha=0,05$) antar kelompok perlakuan

Kelompok	z	p Value	Makna
K ₁ -K ₂	-3,028	0,002	Signifikan
K ₁ -K ₃	-1,682	0,180	Tidak signifikan
K ₁ -K ₄	-1,682	0,180	Tidak signifikan
K ₂ -K ₃	-2,768	0,009	Signifikan
K ₂ -K ₄	-2,768	0,009	Signifikan
K ₃ -K ₄	0,000	1,000	Tidak signifikan



Gambar 1. A. Gambaran mikroskopis pengumpulan kandungan HCN selama fermentasi tempe koro babi. B. Gambaran mikroskopis derajat inflamasi bronkus mencit Balb/C grade 3. Sel radang ditunjukkan dengan tanda panah hijau. C. Gambaran mikroskopis derajat inflamasi bronkus mencit Balb/C grade 4. Sel radang ditunjukkan dengan tanda panah hijau



Gambar 2. Grading inflamasi dari masing-masing kelompok perlakuan

Menurut Duke (2009), patikan kebo memiliki kandungan kimia yang sangat berguna bagi pengobatan asma alergi, seperti *ascorbic acid*, *caffeic acid*, flavonoid, dan *quercetin*. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak patikan kebo dosis 10 mg/mencit/hari dan dosis 20 mg/mencit/hari dapat menurunkan derajat inflamasi bronkus secara signifikan ($p=0,009$) dibandingkan kelompok asma alergi. Adapun antara kelompok patikan kebo dosis 10 mg/mencit/hari dengan kelompok patikan kebo dosis 20 mg/mencit/hari tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p=1,000$) dalam menurunkan derajat inflamasi bronkus. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak patikan kebo dosis 10 mg/mencit/hari memiliki kemampuan yang tidak jauh berbeda dengan ekstrak patikan kebo dosis 20 mg/mencit/hari dalam menurunkan derajat inflamasi bronkus. Penurunan derajat inflamasi diduga terjadi akibat adanya kandungan-kandungan senyawa kimia yang dimiliki oleh patikan kebo seperti *ascorbic acid* dan *caffeic acid* yang memiliki efek antagonis terhadap kalsium. Efek antagonis terhadap kalsium tersebut akan menghambat masuknya kalsium ke dalam sel mast, sehingga proses degranulasi sel mast menjadi terhambat. Dengan dihambatnya degranulasi sel mast maka pelepasan mediator-mediator inflamasi, seperti prostaglandin, leukotrien, dan histamin, juga akan dihambat. Selanjutnya dengan dihambatnya pelepasan mediator-mediator inflamasi tersebut akan menurunkan derajat inflamasi bronkus. Pemberian ekstrak patikan kebo yang mengandung *kaempferol* dan *quercetin* dengan aktivitas antihistamin akan menurunkan produksi histamin. Menurunnya produksi histamin akan menurunkan juga sekresi sejumlah sitokin yang berperan penting dalam

memediatori terjadinya reaksi alergi-inflamasi. Hal ini dikarenakan pelepasan histamin akan mengakibatkan respons imun alergi-inflamasi, termasuk meningkatkan produksi sitokin-sitokin IL-4, IL-5, IL-10, dan IL-13 (Janeway et al. 2005). Menurut Kimata et al. (2000) dan Theoharides et al. (2001), *quercetin* juga dapat menghambat leukotrin, PGD₂, dan GM-CSF yang dilepaskan oleh sel mast. Dengan demikian, ekstrak patikan kebo dapat menurunkan derajat inflamasi bronkus pada asma alergi.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak patikan kebo dengan dosis 10 mg/mencit/hari dan dosis 20 mg/mencit/hari dapat menurunkan secara signifikan derajat inflamasi bronkus pada mencit Balb/C model asma alergi. Perbedaan dosis tidak menyebabkan perbedaan penurunan derajat inflamasi bronkus.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH. 2003. Cellular and molecular immunology. Elsevier Science, USA.
- Blease K, Lukacs NW, Hogaboam CM et al. 2000. Chemokines and their role in airway hyper-reactivity. *Respir Res* 1(1): 54-61.
- Diding HP, Sasono, Hartati S. 2007. Aerosolized ovalbumin exposure facilities change in the airway histologic pattern in mouse. *Symposium Nasional Reuni Akbar. Fakultas Kedokteran, UNS, Surakarta, 18 Maret 2007.*
- Dorland WA. 2002. Kamus Kedokteran Dorland. Penerbit Buku Kedokteran ECG, Jakarta.
- Duke JA. 2009. List of chemicals of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels. *Phytochemical and Ethnobotanic Database. www.natrindex.com.*
- Heru SS, Sukamto. 2006. Asma bronchial. In: Sudoyo AW et al. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jilid I, Edisi IV.* Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Janeway CA, Paul T, Mark W et al. 2005. *Immunobiology the immune system in health and disease*, 6th edition. Garland Science Publishing, New York.
- Kimata M, Shichijo M, Miura T et al. 2000. Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells. *Clin Exp Allergy* 30: 501-508.
- Purawisastra S. 2001. Penelitian pengaruh isolat galaktomanan kelapa terhadap penurunan kadar kolesterol serum kelinci. *digilib.ekologi.litbang.depkes.go.id.*
- Theoharides TC, Alexandraki M, Kempuraj D et al. 2001. Anti-inflammatory actions of flavonoids and structural requirements for new design. *Int J Immunopathol Pharmacol* 14: 119-127.