

THE EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* (L) URBAN ADMINISTRATION TOWARDS THE THICKNESS OF PYRAMIDAL LAYER IN THE CA1 REGION OF HIPPOCAMPUS OF SPRAGUE DAWLEY RATS AFTER CHRONIC RESTRAIN STRESS

Anggraeni Janar Wulan¹, Brian Wasita², Nanang Wiyono³

¹Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Universitas Lampung

²Faculty of Medicine, Universitas Sebelas Maret

Abstract

Background: Stress has been shown can change the structure of the brain, especially in the cornu ammonic (CA) I region of hippocampus. *Centella asiatica* or pegagan as herbal neuroprotector was investigated. The study aimed to determine the effect of ethanolic extract of *C. asiatica* to the thickness of pyramidal layer in the CA1 region in rats subjected to chronic restrain stress (CRS).

Method: This experimental study used post test only group design. Thirty five rats were divided into 6 groups: non stress group (control) and stress only group pulvis gum arabicum (PGA), positive control group (treated with fluoxetine 10mg/kgBW), and 3 treatment groups are treated with *C. asiatica* 150, 300, and 600mg/kgBW respectively. All groups except non stress group were subjected to CRS, for 6 hours per day for 21 days. Fluoxetine, PGA, and *C. Asiatica* were applied 30 minutes before CRS done. Rats were sacrificed at the end of 24th day and were perfused transcardially. Processed brain tissue stained with toluidine blue, and measured with Image Raster program.

Result: The thickness of pyramidal layer in the CA1 region are increasing significantly in treatment groups which treated with 150 and 300 kg/BW of *C. asiatica*, but not significant which treated with 600mg/kgBW ethanolic extract of *C. asiatica*.

Conclusion: Ethanolic extract of *C. asiatica* can improve thickness of pyramidal layer in the CA1 region of hippocampus of Sprague Dawley rats after chronic restrain stress. [JuKe Unila 2014; 4(8):202-207]

Keywords: *C. asiatica*, chronic restrain stress, fluoxetine, pyramidal layer, stress

Pendahuluan

Stres sudah menjadi salah satu bagian di dalam kehidupan sehari-hari. Stres dapat mengancam kondisi fisik dan emosi seorang individu, mengganggu homeostasis, dan mampu memacu timbulnya perubahan respon fisiologi dan mengubah perilaku.¹⁻³ Stres bahkan mampu memacu timbulnya penyakit.²

Terjadinya stres akut maupun kronis akan mengaktifkan aksis *hypothalamic pituitary adrenal* (HPA), khususnya pada *corticotropin releasing hormone* (CRH) dan neuron *arginin-vasopresin* (AVP) dari *paraventricular nuclei* (PVN), dan diikuti dengan peningkatan sekresi hormon

adrenocorticotrophin hormone (ACTH) oleh hipofisis anterior.^{4,5}

ACTH akan menstimulasi sekresi hormon glukokortikoid, terutama kortisol oleh korteks kelenjar adrenal. Peningkatan hormon kortisol dalam stres kronis akan menyebabkan kerusakan struktur pada sistem saraf.

Hippocampus merupakan sebuah struktur di dalam otak yang sangat peka terhadap berbagai stresor, seperti kerusakan pembuluh darah, trauma mekanik, proses degeneratif, dan stres berulang.³ Peningkatan kadar hormon glukokortikoid pada stres kronik akan menyebabkan perubahan struktur

neuron berupa atrofi dan retraksi apikal dendrit sel-sel piramidal, menurunkan panjang dan kompleksitas dendrit, menekan neurogenesis khususnya proliferasi sel-sel progenitor di girus dentatus (DG), dan kematian sel-sel piramidal pada hippocampus sehingga terjadi penurunan ukuran dan volume pada DG.^{3,6-8}

Penelitian yang banyak dilakukan berhasil membuktikan bahwa tanaman tradisional, khususnya pegagan memiliki manfaat yang besar dalam dunia pengobatan. Pegagan atau *C. asiatica* memiliki fungsi neuroprotektif yang besar. Tanaman ini mampu berperan sebagai obat sedatif, anti ansietas, anti oksidan, dan mampu meningkatkan kapasitas intelegensia.⁹

Pemberian *C. asiatica* terbukti mampu memperbaiki struktur hippocampus dengan jalan memacu proliferasi dan arborisasi neuron pada zona CA3 dan CA4 hippocampus, dan mampu mengurangi efek stres yang terjadi dalam masa kehamilan sehingga akan mempengaruhi panjang dari dendrit dan percabangan neuron-neuron di zona CA3 di hippocampus.^{9,10}

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol pegagan atau *C. asiatica* terhadap ketebalan lapisan piramidal di area CA1 hippocampus pada tikus Sprague Dawley yang diinduksi stres dengan metode kronik restrain stres.

Metode

Penelitian ini adalah bagian dari penelitian payung Hibah Unggulan Perguruan Tinggi dengan judul "Perkembangan Ekstrak Etanol Pegagan (*C. asiatica*) sebagai Obat Berstandar untuk Anti Stres" yang dibiayai oleh DIPA BLU Universitas Sebelas Maret.

Seluruh prosedur penelitian telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dengan nomor KE/FK/169/EC.

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni dengan menggunakan rancangan *post test only group design*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Faal dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada pada bulan Maret 2013.

Sampel penelitian meliputi 35 tikus putih galur Sprague Dawley, jantan, umur 4 bulan, berat badan 220-300 gram. Hewan coba secara *random* dibagi menjadi 6 kelompok, yang terdiri atas kelompok non-stres (kontrol), kelompok stres, 3 kelompok perlakuan (CA150, CA300, dan CA600), dan kelompok fluoksetin sebagai kontrol positif. Kelompok kontrol dan kelompok stres diberikan PGA per oral. Kelompok perlakuan diberikan ekstrak etanol *C. asiatica* per oral dengan dosis masing-masing 150, 300, dan 600 mg/kgBB. Kelompok fluoksetin diberikan fluoksetin 10 mg/kgBB 30 menit sebelum induksi stres dilakukan. Seluruh kelompok kecuali kelompok kontrol dilakukan induksi stres dengan metode restrain stres kronis di mana tikus dimasukkan ke dalam tabung restrain dengan beberapa lubang di ujungnya sebagai penanda kepala dan satu lubang pada ekor. Induksi stres dilakukan selama 21 hari dengan durasi 6 jam per hari. Hewan coba dikandangkan berkelompok, 2-2-3 tikus tiap kandang di Bagian Faal FK UGM, suhu ruangan $27 \pm 3^\circ\text{C}$, kelembaban 50-60%, dan siklus gelap terang 12:12 jam, mendapat akses minum dan pakan *ad libitum*.¹¹⁻¹⁴

Terminasi dilakukan pada hari ke-24. Belahan otak sebelah kiri diambil dan difiksasi di dalam PBS formalin 10%

dengan pH 7,4 selama 24 jam dan dibuat blok jaringan. Blok jaringan hippocampus dipotong koronal dengan tebal 4 μm , dan interval potongan 300 μm . Setiap blok jaringan diambil 5 potongan jaringan hippocampus dan dilanjutkan dengan pewarnaan menggunakan metode pengecatan *toluidine blue*.

Setiap potongan khususnya area CA1 hippocampus diamati dalam 5 lapang pandang dengan perbesaran 400x. Pada potongan ke-1, yang diambil adalah jaringan hippocampus yang menyerupai plate 32 berdasar atlas "*Rat Brain*" dari Paxinos.^{14,15}

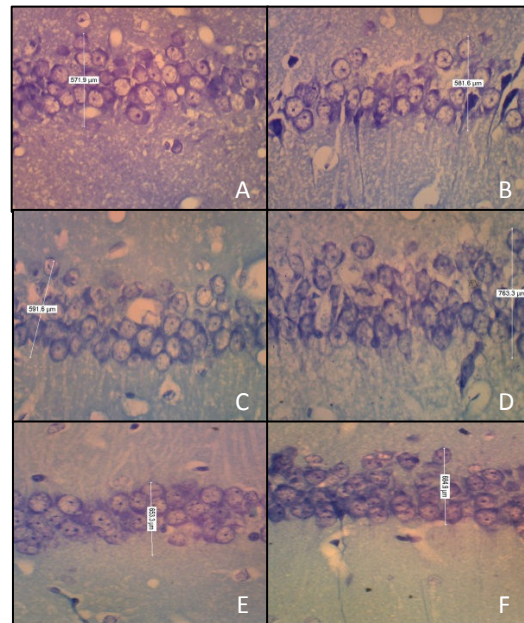
Pengukuran ketebalan lapisan piramidal dilakukan pada area CA1 hippocampus dengan menggunakan program *image raster*. Ketebalan diukur dengan cara mengukur jarak antara sel piramidal terluar dengan sel piramidal terdalam dan posisi pengukur adalah tegak lurus dengan lapisan piramidal yang diamati.

Untuk mengetahui perbedaan hasil antar kelompok dilakukan dengan menggunakan uji *one-way Anova*. Sebelumnya dilakukan uji normalitas dan kesamaan variansi sebagai syarat mutlak pada uji statistic dengan jumlah kelompok 3 atau lebih dan tidak berpasangan. Data kemudian dianalisis dengan menggunakan uji *Posthoc Tuckey LSD* untuk melihat perbedaan antara 2 kelompok. Taraf kepercayaan yang digunakan adalah 0,05.

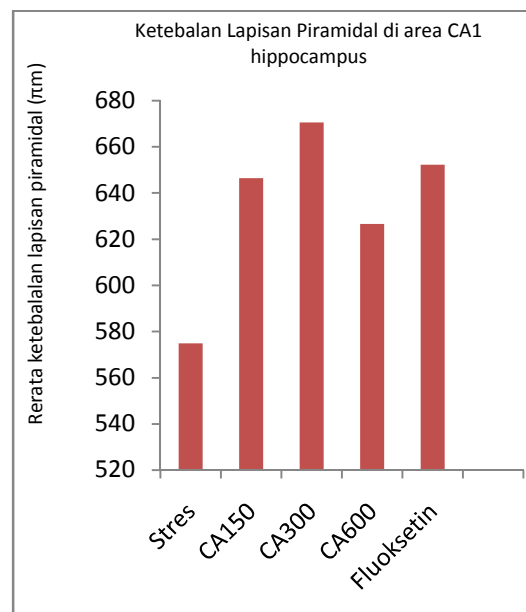
Hasil

Data cara dan hasil pengukuran pada seluruh kelompok disajikan dalam Gambar 1. Data ketebalan lapisan piramidal pada area CA1 hippocampus pada seluruh kelompok disajikan dalam bentuk rerata \pm SD dalam satuan μm .

Hasil pengukuran ketebalan lapisan piramidal disajikan dalam Gambar 2.



Gambar 1. Hasil pengukuran tebal lapisan piramidal. Kontrol (A), stres (B), CA150(C), CA300 (D), CA600 (E), dan Fluoksetin (F).



Gambar 2. Ketebalan lapisan piramida (μm)

Pada Gambar 2 terlihat bahwa ketebalan lapisan piramidal di area CA1 hippocampus pada kelompok kontrol (kontrol terhadap kelompok stres) yang tidak dilakukan induksi stres adalah

sebesar $664,937 \mu\text{m} \pm 41,898$. Namun, pada kelompok stres menunjukkan bahwa sesungguhnya ketebalan lapisan piramidal mengalami penurunan hingga mencapai $574,885 \mu\text{m} \pm 81,84$. Ketebalan lapisan piramidal mengalami peningkatan pada kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak etanol atau *C. asiatica* dengan dosis 150, 300, dan 600 mg/kgBB apabila dibandingkan dengan kelompok stres. Ketebalannya secara berturut-turut adalah $646,492 \mu\text{m} \pm 68,793$; $670,637 \mu\text{m} \pm 26,214$, dan $626,664 \mu\text{m} \pm 55,948$. Ketebalan pada kelompok fluoksetin adalah $652,214 \mu\text{m} \pm 62,238$.

Dari data di atas terlihat bahwa ekstrak etanol dengan dosis 300 mg/kgBB memiliki kemampuan paling tinggi untuk meningkatkan ketebalan lapisan piramidal diikuti dosis 150 mg/kgBB dan 600 mg/kgBB.

Dengan menggunakan uji statistik untuk melihat perbedaan rerata ketebalan lapisan piramidal pada kelompok lebih dari 3 dan tidak berpasangan, digunakan uji *one-way Anova*, di mana nilai $p=0,112$ ($p>0,05$) yang artinya tidak terdapat perbedaan bermakna pada ketebalan lapisan piramidal di area CA1 hippocampus di dalam kelompok. Uji *post hoc* menunjukkan bahwa ketebalan lapisan piramidal pada seluruh kelompok yang diberikan ekstrak etanol *C. Asiatica* dosis 150 mg/kgBB, 300 mg/kgBB, dan fluoksetin meningkat secara bermakna dibandingkan kelompok stres. Pemberian ekstrak etanol *C. asiatica* dosis 600 mg/kgBB tidak meningkatkan ketebalan lapisan piramidal secara bermakna. Namun, perbedaan ketebalan lapisan piramidal antar kelompok yang diberikan *C. asiatica* dengan dosis berbeda tidak bermakna.

Pembahasan

Penelitian ini menunjukkan bahwa setelah dilakukan induksi stres dengan metode CRS, ketebalan lapisan piramidal pada kelompok stres menurun secara bermakna apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p=0,02$). Hal ini menunjukkan bahwa induksi stres yang dilakukan telah berhasil. Adanya stres pada penelitian ini dibuktikan dengan adanya kerusakan struktur berupa terjadinya penurunan ketebalan lapisan piramidal.

Hasil penelitian ini sesuai dengan beberapa temuan yang lain mengenai perubahan struktur otak akibat induksi stres. Penelitian yang sesuai, antara lain oleh Mc Ewen (2000) yang menemukan bahwa induksi stres dengan metode restrain stres selama 6 jam dan pemberian kortikosteroid selama 21 hari terbukti mampu menyebabkan penekanan neurogenesis yang mengakibatkan atrofi dendrit apikal sel-sel piramidal di zona CA3 hippocampus. Tishkina *et al.* (2009) menyebutkan juga bahwa induksi stress kronis dengan metode *intermittent white noise* dan stres listrik selama 14 hari menyebabkan terjadinya perubahan sitoarsitektur hippocampus yang ditandai dengan perubahan neuron menjadi hipoksia, edema, terjadinya *splits* antara lapisan molekular dengan lapisan selular dan penurunan jumlah sel piramidal.^{3,16}

Mekanisme yang dimungkinkan menyebabkan penurunan ketebalan lapisan piramidal pada stres ini dapat disebabkan oleh terjadinya regresi proses dendritik dan retraksi dendrit apikal sel-sel piramidal, penurunan panjang dan kompleksitas dendrit, dan kematian sel-sel piramidal pada hippocampus.^{3,6,7} Penurunan ketebalan

lapisan piramidal dapat juga dimungkinkan karena pada stres kronis, peningkatan kadar hormon glukokortikoid akan meningkatkan ekspresi protein transporter glutamat di sel-sel glia sehingga menyebabkan proses *re-uptake* glutamat ekstraseluler meningkat dan diikuti dengan ketidakseimbangan reseptor *N methyl diethyl amid* (NMDA) sinaps dan ekstrasinaps sehingga menghambat plastisitas sinaps, pertumbuhan, dan ketahanan hidup neuron.^{3,16}

Aktivasi yang berlebihan oleh glutamat terhadap reseptornya menyebabkan terjadinya kematian neuron yang dikenal dengan "*glutamate neurotoxicity*" atau "*excitotoxicity*".^{3,7,17}

Penelitian ini mampu membuktikan kemampuan ekstrak etanol tanaman pegagan atau *C. asiatica* sebagai pelindung sel-sel saraf atau neuron yang ditandai dengan adanya peningkatan ketebalan lapisan piramidal. Efek ini disebabkan karena *C. asiatica* memiliki kemampuan sebagai neurotropik dan neuroprotektor. Kemampuan neurotropik dari *C. asiatica* meliputi kemampuannya untuk memacu terjadinya sinaptogenesis dan regenerasi akson. Mekanisme lain juga disebabkan oleh kemampuan *C. asiatica* menembus *blood brain barrier* (BBB) yang didahului oleh kemampuannya untuk menurunkan permeabilitas BBB.¹⁸⁻²⁰

Pemberian ekstrak etanol *C. asiatica* dengan dosis 150 dan 300 mg/kgBB terbukti secara signifikan mampu meningkatkan ketebalan lapisan piramidal, sedangkan dosis 600 mg/kgBB meningkatkan secara tidak signifikan. Hal ini sesuai dengan penelitian Taihutu *et al.* (2012) yang menyebutkan bahwa dosis *C. asiatica*

yang mampu meningkatkan proliferasi sel di cPF tikus putih adalah 150 mg/kgBB dan 300 mg/kgBB, namun tidak ada perbedaan yang bermakna pada kedua dosis tersebut.²¹

Adanya penurunan efektivitas pada dosis 600 mg/kgBB menunjukkan tidak bersifat *non dose-dependent*. Hal ini sejalan dengan penelitian Ramanathan *et al.* (2007) yang menunjukkan bahwa *C. asiatica* tidak bersifat *dose-dependent*, khususnya kemampuan *C. asiatica* dalam meningkatkan kadar enzim katalase di striatum.¹⁸

Simpulan

Secara keseluruhan hasil penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa tanaman *C. asiatica* atau dikenal dengan sebutan pegagan memiliki kemampuan untuk melindungi sistem saraf. Hal ini memberikan harapan bahwa obat-obat tradisional dapat dikembangkan sebagai obat-obatan dalam penanganan kasus kasus yang melibatkan sistem saraf pusat, seperti stroke, depresi, neurosis, demensia, bahkan penyakit degeneratif seperti Alzheimer. Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol *C. asiatica* mampu meningkatkan ketebalan lapisan piramidal di area CA1 hippocampus pada tikus Sprague Dawley yang diinduksi restrain stres kronis.

Daftar Pustaka

1. Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol.* 2009; (5):371-81.
2. Heng LX, Nengbao L, Min HZ, Yan LZ, Jia WL, Xiang QL, *et al.* Effects of chronic multiple stress on learning and memory and the expression of Fyn, BDNF, TrkB in the hippocampus of rats. *Chin Med J.* 2007; 120(8):669-74.
3. Mc Ewen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 2000; 172-189.

4. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psycho Res.* 2002; (53):865-71.
5. Park HJ, Kim HY, Yoon KH, Kim KS, Shim I. The Effects of *Astragalus membranaceus* on repeated restraint stress-induced biochemical and behavioral responses. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2009; (13):315-9.
6. Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanism. *Neuropsychopharmacol Rev.* 2008; (33):88-109.
7. Lee AL, Ogle WO, Sapolsky RM. Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. *J Bipolar Disord.* 2002; (4):117-28.
8. Vaidya VA, Fernandes K, Jha S. Regulation of adult hippocampal neurogenesis: relevance to depression. *Expert Rev Neurotherapeutics.* 2007; 7(7):853-64.
9. Kumar A, Dogra S, Prakash A. Neuroprotective effects of *Centella asiatica* against intracerebroventricular colchicine-induced cognitive impairment and oxidative stress. 2009.
10. Madhyastha S, Somayaji SN, Bairy KL, Prakash, Madhyastha P. Neuroprotective effects of *Centella asiatica* leaf extract treatment on cognition and hippocampal morphology against prenatal stress. *J Physiol Sci.* 2007; 20(2):79-88.
11. Yang D, Liu X, Zhang R, Cheng K, Mu J, Fang L, et al. Increased apoptosis and different regulation of pro-apoptosis protein bax and anti-apoptosis protein Bcl-2 in the olfactory bulb of a rat model of depression. *J neurosci.* 2011; 504(2011):18-22.
12. Shishkina GT, Kalinina TS, Berezova IV, Dygalo NN. Stress-induced activation of the brainstem Bcl-X_L gene expression in rats treated with fluoxetine: correlations with serotonin metabolism and depressive like behavior. *Neuropharmacol.* 2012; (62):177-83.
13. Xu Y, Lin D, Li S, Li G, Shyamala SG, Barish PA, et al. Curcumin reverses impaired cognition and neuronal plasticity induced by chronic stress. *Neuropharmacol.* 2009; (57):463-71.
14. Ajami M, Eghtesadi S, Razaz JM, Kalantari N, Habibey R, Nilforoushzadeh MA, et al. Expression of Bcl-2 and bax after hippocampal ischemia in DHA and EPA treated rats. *Neurol Sci.* 2011; (32):811-8.
15. Paxinos Gand Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed., California: Academic Press; 2007.
16. Tishkina AO, Levshina IP, Lazareva NA, Passikova NV, Stepanichev MY, Ajrapetyanz MG, et al. Chronic stress induces nonapoptotic neuronal death in the rat hippocampus. *Doklay Akademi Nauk.* 2009; 428(1):130-4.
17. Won SJ, Kim DY, Gwag BJ. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Biol.* 2002; 35(1):67-88.
18. Ramanathan M, Sivakumar S, Anandvijayakumar PR, Saravanababu C, Pandian PR. Neuroprotective evaluation of standardized extract of *Centella asiatica* in monosodium glutamate treated rats. 2007.
19. Krishnamurthy RG, Senut MC, Zemke D, Min J, Frenkel MB, Greenberg EJ, et al. Asiatic acid, a pentacyclic triterpene from *Centella asiatica*, is neuroprotective in a mouse model of focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res.* 2009; 87(11): 2541-50.
20. Sari DCR. The relationship between memory, CA1 hippocampus and neuroglia after *Centella asiatica* leaf extract's administration in stress induced rat (*Rattus norvegicus*). Proceedings of 2nd International Joint Symposium Frontier in Biomedical Sciences: From Genes to Applications. Yogyakarta: Faculty of Medicine Gadjah Mada University; 2011.
21. Taihuttu YMJ, Sari DCR, Partadiredja G. Effect of *Centella Asiatica* ethanol extract on adult rats (Sprague-Dawley) medial prefrontal cortex cells proliferation after chronic stress. Denpasar: Komisariat PAAI Denpasar; 2012.