

Efek ekstrak *Stenochlaena palustris* terhadap jumlah *circulating endothelial cells Marmota caligata* setelah didemamkan

Effect of *Stenochlaena palustris* extract on circulating endothelial cells *Marmota caligata* induced fever

Eko Suhartono^{1,2*}, M. Bakhriansyah³, Rini Handayani⁴

¹. Bag. Kimia/Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat

². Kelompok Studi Radikal Bebas dan Pemanfaatan Bahan Alam

³. Bag. Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat

⁴. Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat

Abstrak

Demam adalah peningkatan regulasi suhu tubuh. Pada proses demam secara tidak langsung terjadi peningkatan radikal bebas seperti anion superoksida ($\bullet\text{O}_2$) yang menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif dapat mengakibatkan terjadinya kerusakan endotel. Pertanda seluler dari kerusakan endotel adalah meningkatnya jumlah *Circulating Endothelial Cells* (CEC). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak air daun tumbuhan kalakai (*Stenochlaena palustris*) terhadap CEC pada marmut (*Marmota caligata*) yang mengalami demam dan menghitung jumlah rerata CEC. Penelitian ini merupakan studi eksperimental murni dengan *Posttest-Only with Control Group Design*, yang terdiri atas 2 kelompok kontrol dan 5 kelompok perlakuan masing-masing 4 ekor marmut. Jumlah CEC diukur dengan menggunakan metode Hladovec. Data yang diperoleh dianalisa menggunakan uji Kruskal-Wallis dengan tingkat kepercayaan 95 %. Hasil analisis didapatkan nilai $p = 0,001$ ($p < 0,05$) yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan secara bermakna antar kelompok perlakuan. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak air tumbuhan kalakai dapat menurunkan jumlah CEC pada plasma marmut yang didemamkan.

Kata kunci: Demam, *Circulating Endothelial Cells*, *Stenochlaena palustris*

Abstract

Fever is increased temperature regulation of the body. In the process is according indirect which increased of free radicals, as anion superoxide ($\bullet\text{O}_2$) and will trigger oxidative stress happened. Oxidative stress will effect in endothelial damaged. A cellular marker of damage the endothelium is increased number of *Circulating Endothelial Cells* (CEC). The aim of this research is to valuated the influence of watery plant kalakai extract (*Stenochlaena palustris*) to number of *Circulating Endothelial Cells* in *Marmota caligata* had been fever and to calculated the average of CEC. The research is true experimental study, with *Posttest-Only with Control Group Design*, with 2 control group and 5 treatments group of each 4 *Marmota caligata*. The CEC is measured by Hladovec method. Data was analyzed by using Kruskal-Wallis test with confidence rate at 95 %. The analyzed results got $p = 0.001$ ($p < 0.05$) means there be a significant different between treatment group. From the result, can be conclude that the present of watery plant kalakai extract is decreasing CEC in plasma of *Marmota caligata* fever induced.

Key words: Fever, *Circulating Endothelial Cells*, *Stenochlaena palustris*

Pendahuluan

Potensi lahan basah di Indonesia masih belum banyak tergali, termasuk potensi di Propinsi Kalimantan Selatan. Propinsi ini mempunyai sebaran lahan rawa (rawa air tawar dan rawa gambut) yang cukup luas dan memiliki formasi hutan khas dengan flora yang agak terbatas, salah satu diantaranya tumbuhan kalakai (*Stenochlaena palustris* (Burm. f) Bedd).

Berdasarkan studi empirik, kalakai dipergunakan oleh masyarakat suku Dayak Kenyah untuk mengobati anemia, pereda demam, dan mengobati sakit kulit. Meskipun demikian, bukti empirik tersebut belum pernah dibuktikan secara ilmiah. Berdasarkan penelitian sebelumnya disebutkan bahwa kandungan zat bioaktif pada tumbuhan kalakai, yakni flavonoid, steroid, dan alkaloid. (Maharani, *et al.*, 2006).

Penelitian Suhartono (2008) membuktikan bahwa tanaman kalakai mampu berperan sebagai antinyeri maupun antiradang, yang mekanisme pembentukannya melibatkan reaksi oksidatif oleh molekul peroksida. Meskipun demikian, pada penelitian tersebut belum mengungkap adanya peran kalakai dalam menghambat kerusakan endotel akibat peradangan maupun demam. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan diungkap peran ekstrak air tanaman kalakai dalam menurunkan kerusakan endotel akibat demam.

Metodologi

Bahan

Bahan yang digunakan marmut jantan, daun tumbuhan kalakai, aquadest, NaCl 0,9 %, 2 mL Adrenalin konsentrasi 1 mg/mL, Natrium sitrat 3,8 %.

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat gelas kimia (®PYREX), sentrifuges (®SENTURION), mikropipet, mikroskop elektrik, kamar hitung (IMPROVE NEUBAUER), alat bedah minor dan timbangan.

Jalannya penelitian Determinasi tanaman

Tumbuhan kalakai diperoleh dari Kecamatan Gambut, Kalimantan Selatan pada bulan Juni 2009. Identifikasi spesies tumbuhan yang diteliti dilakukan oleh Bagian Biologi Program Studi Farmasi FMIPA Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin.

Pembuatan ekstrak air tumbuhan kalakai

Proses ekstraksi senyawa aktif yang terdapat di dalam tumbuhan kalakai digunakan metode maserasi.

Aklimatisasi

Marmut yang digunakan pada penelitian ini memiliki berat badan sekitar 300-400 g dan berumur antara 3-4 bulan, yang diperoleh dari Balai Penelitian dan Penyidikan Veteriner (BPPV) Banjarbaru. Marmut dipelihara selama 1 minggu sebelum mendapat perlakuan untuk memberikan kondisi fisik dan psikologis yang sama. Selama pemeliharaan diberi minum air minum PDAM dan pakan *ad libitum*. Marmut dipilih ke dalam kelompok perlakuan dengan metode *complete random sampling*, dibagi dalam 7 kelompok yang masing-masing terdiri dari 4 ekor marmut. Masing-masing kelompok dimasukkan ke dalam kandang kecil untuk beradaptasi.

Uji efek antipiretik

Marmut ditimbang berat badannya dan diukur suhu rektalnya. Setelah itu, semua marmut disuntik dengan vaksin DPT secara intramuskular pada paha sebelah kanan, dengan dosis yang dihasilkan dari uji pendahuluan, yakni 0,16 mL.

Suhu rektal marmut diukur kembali pada saat onset demam terjadi (waktu onset demam didapat pada uji pendahuluan, yaitu setelah 90 menit penyuntikan) kemudian diberikan ekstrak kalakai menggunakan sonde lambung dengan volume yang disesuaikan menurut dosis dan berat badan mencit sebagai berikut:

- P(-) = marmut yang diberi 1 mL aquadest
- P(+)= marmut yang diberi larutan asetosal $3,9 \times 10^{-2}$ mg/gBB marmut
- P1 = marmut yang diberi ekstrak air tumbuhan kalakai $7,75 \times 10^{-4}$ mg/gBB marmut
- P2 = marmut yang diberi ekstrak air tumbuhan kalakai $1,55 \times 10^{-3}$ mg/gBB marmut
- P3 = marmut yang diberi ekstrak air tumbuhan kalakai $3,1 \times 10^{-3}$ mg/gBB marmut
- P4 = marmut yang diberi ekstrak air tumbuhan kalakai $6,2 \times 10^{-3}$ mg/gBB marmut
- P5 = marmut yang diberi ekstrak air tumbuhan kalakai $1,24 \times 10^{-2}$ mg/gBB marmut

Pengambilan darah marmut dilakukan ketika puncak demam tercapai (puncak demam didapat pada uji pendahuluan, yaitu 2 jam setelah onset), dengan cara melakukan dekapitasi pada marmut. Kemudian darah ditampung ke dalam tabung yang berisi Natrium Sitrat.

Perhitungan Jumlah CEC

Perhitungan jumlah CEC digunakan metode yang dilakukan Hladovec (1973). Darah yang telah ditampung dan ditambahkan 0,2 mL Natrium sitrat 3,8 %, kemudian dibuat *Platelet Rich Plasma* (PRP) dengan cara disentrifuge 395 rpm selama 20 menit pada suhu 0 °C. Lalu diambil 1 mL PRP dan ditambahkan 2 mL adrenalin 1 mg/mL sebagai agregator. Disentrifuge 395 rpm lagi selama 20 menit pada suhu 0 °C untuk memisahkan supernatan (yang mengandung endotel). Supernatan yang mengandung endotel disentrifuge 395 rpm selama 20 menit pada suhu 0 °C. Didapatkan endapan yang kemudian ditambahkan 0,1 ml NaCl 0,9 % lalu diaduk. Kemudian diteteskan ke kamar hitung untuk diperiksa dengan mikroskop. Perhitungan dilakukan pada dua kamar hitung (masing-masing 9 area/kotak dinyatakan dalam CE/1,8 cm²).

Analisa data

Data yang diperoleh akan dilakukan uji Kruskal Wallis dengan $\alpha=0,05$. jika terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji statistik Mann-Whitney. Pengolahan data digunakan bantuan program komputer dengan perangkat lunak program statistik.

Hasil dan Pembahasan

Pada proses demam secara tidak langsung terjadi peningkatan radikal bebas seperti anion superoksida ($\bullet O_2$). Radikal bebas tersebut yang beredar pada sirkulasi darah dapat memicu pembentukan CEC. Berdasarkan hasil pemeriksaan terhadap jumlah CEC pada darah marmut didapatkan hasil seperti yang terlihat pada Gambar 1.

Berdasarkan Gambar 1, pada kelompok P1, P2, P3, P4 dan P5 total jumlah CEC masih lebih tinggi jika dibandingkan dengan P(+). Hal ini berarti dosis ekstrak air kalakai pada kelima kelompok tersebut belum mampu menurunkan jumlah CEC dalam plasma darah secara signifikan jika dibandingkan dengan P(+). Namun dari Gambar 1 dapat diketahui bahwa jumlah CEC dalam darah marmut yang didemamkan mengalami penurunan pada tiap kelompok perlakuan bila dibandingkan dengan P(-).

Dari penurunan jumlah CEC tersebut menunjukkan bahwa dosis kalakai yang dipakai di masyarakat memiliki kemampuan sebagai ant demam walaupun belum mampu memberikan efek penurunan jumlah CEC yang

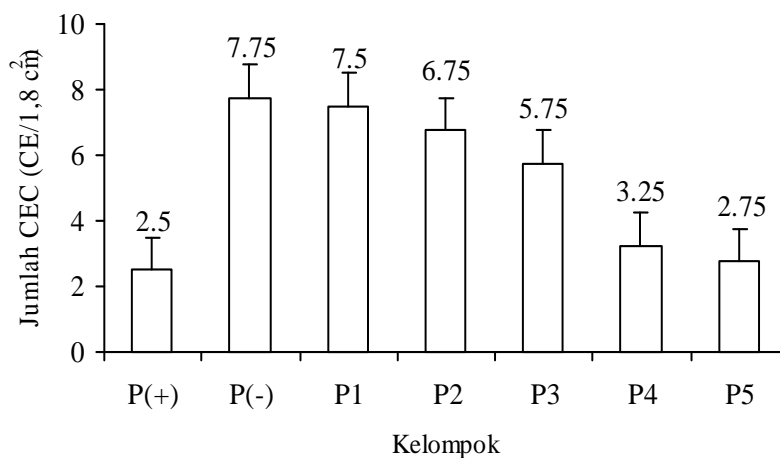
lebih signifikan jika dibandingkan P(+). Asetosal diketahui mampu menghambat efek demam dengan kuat dengan menghambat kerja enzim siklooksigenase sehingga mencegah perubahan asam arakhidonat menjadi prostaglandin yang stabil (PGE₂ dan PGI₂/prostasiklin). Apabila oksidasi asam arakhidonat dapat dihambat maka tidak terbentuk *Reactive Oxygen Speices* (ROS) yang dapat menyebabkan demam, nyeri, dan peradangan (Gunawan, 2007).

Pembentukan ROS dapat meningkatkan modifikasi molekuler diberbagai jaringan sehingga menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif juga dapat mengakibatkan terjadinya kerusakan endotel. Kerusakan endotel antara lain dipicu oleh produksi $\bullet O_2$ yang bereaksi cepat dengan NO dan menghasilkan ONOO⁻. Reaksi tersebut menyebabkan menurunnya bioaktivitas NO, yang berakibat pada kerusakan endotel (Chatarina, 2001). Penanda seluler dari kerusakan endotel adalah meningkatnya jumlah *Circulating Endothelial Cells* (CEC) (Haubitz, 2004). CEC adalah sel endotel yang dilepaskan dari dinding endotel dan masuk ke dalam sirkulasi darah sebagai respon dari kerusakan endotel. CEC merupakan penanda adanya kerusakan endotel dan disfungsi endotel. (Boos, 2006).

Berdasarkan hasil uji normalitas Shapiro-Wilk didapatkan nilai $p < 0,05$ dan dari uji homogenitas Levene dan didapatkan $p > 0,05$. Hal ini berarti sebaran data CEC tidak normal dan homogen. Selanjutnya untuk melihat hubungan antar kelompok dilakukan uji Kruskal-Wallis.

Analisis statistik dengan uji Kruskal-Wallis diperoleh nilai $p = 0,001$ ($p < 0,05$), yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan secara bermakna antar kelompok perlakuan. Analisis lebih lanjut dengan Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Berdasarkan uji statistik Mann-Whitney disimpulkan bahwa antara kelompok kontrol positif (+) dengan kelompok P4 dan P5 tidak terdapat perbedaan bermakna dalam menurunkan jumlah CEC dalam plasma darah. Hal ini menunjukkan bahwa dosis ekstrak air tumbuhan kalakai pada kelompok perlakuan tersebut dapat menurunkan jumlah CEC sama dengan P(+). Hal ini diduga karena



Gambar1. Rerata jumlah CEC (CE/1,8 cm²) plasma marmut.

Keterangan :

P(-) = marmut yang diberi aquadest; P(+) = marmut yang diberi larutan asetosal $3,9 \times 10^{-2}$ mg/gBB marmut; P1 = marmut yang diberi ekstrak air tumbuhan kalakai $7,75 \times 10^{-4}$ mg/gBB marmut; P2 = marmut yang diberi ekstrak air tumbuhan kalakai $1,55 \times 10^{-3}$ mg/gBB marmut; P3 = marmut yang diberi ekstrak air tumbuhan kalakai $3,1 \times 10^{-3}$ mg/gBB marmut; P4 = marmut yang diberi ekstrak air tumbuhan kalakai $6,2 \times 10^{-3}$ mg/gBB marmut; P5 = marmut yang diberi ekstrak air tumbuhan kalakai $1,24 \times 10^{-2}$ mg/gBB marmut

zat bioaktif ekstrak air tumbuhan kalakai mempunyai kemampuan antioksidan yang dapat mereduksi $\bullet\text{O}_2$, sehingga pembentukan CEC dalam plasma darah berkurang (Pribadi, 2000). Dengan demikian kelompok P(-) tidak terdapat perbedaan bermakna dengan kelompok P1 dan P2 dalam menurunkan jumlah CEC dalam plasma darah. Hal ini menunjukkan bahwa dosis ekstrak air tumbuhan kalakai pada kelompok perlakuan tersebut belum dapat menurunkan jumlah CEC.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak air tumbuhan kalakai mampu menurunkan kadar CEC total secara bermakna. Keadaan ini diduga disebabkan oleh zat bioaktif pada tumbuhan kalakai yang berguna sebagai antipiretik, antioksidan, dan antiradang, yaitu flavonoid, steroid, dan alkaloid (Byrne, 2002).

Mekanisme penangkapan radikal bebas oleh flavonoid diawali oleh pelepasan hidrogen sehingga terjadi radikal flavonoid yang reaktif. Selanjutnya, radikal flavonoid tersebut akan mengikat radikal bebas ($\bullet\text{O}_2$) sehingga

reaktivitasnya berkurang bahkan hilang (Suhartono, 2008). Penurunan atau hilangnya reaktivitas $\bullet\text{O}_2$ tersebut mengakibatkan berkurangnya kemampuan untuk bereaksi dengan NO untuk menghasilkan ONOO- sehingga kerusakan endotel berkurang (Haubitz, 2006). Keadaan ini diduga sebagai penyebab penurunan jumlah CEC pada plasma marmut yang didemamkan.

Kandungan lain zat bioaktif kalakai adalah alkaloid dan steroid. Selain sebagai antipiretik, alkaloid dan steroid memiliki efek antiinflamasi. Penelitian Sudjarwo (2006) menyatakan bahwa zat alkaloid yang terkandung dalam alkaloid piperine dapat bertindak sebagai antipiretik melalui penghambatan pembentukan prostaglandin. Sementara itu, steroid bekerja menghambat aktivitas enzim fosfolipase, menghambat metabolisme asam arakhidonat menjadi prostaglandin, mengurangi kebocoran mikrovaskuler, mencegah migrasi langsung sel-sel piretik, dan menghambat produksi sitokin (Sudjarwo, 2006).

Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

Pemberian ekstrak air tumbuhan kalakai (*Stenochlaena palustris*) dapat menurunkan jumlah CEC pada marmut (*Marmota caligata*) yang mengalami demam.

Jumlah rerata CEC pada marmut (*Marmota caligata*) yang didemamkan sesudah pemberian ekstrak air tumbuhan kalakai (*Stenochlaena palustris*) pada P1; P2; P3; P4 dan P5 yaitu 7,5 CE/ 1,8 cm²; 6,75 CE/ 1,8 cm²; 5,75 CE/ 1,8 cm²; 3,25 CE/ 1,8 cm²; dan 2,75 CE/ 1,8 cm².

Daftar Pustaka

- Boos, C. J., Lip, G. Y. H., and Blann, A. D., 2006, Circulating endothelial cells in cardiovascular disease, *J Am Coll Cardio*, 48, 1538-47.
- Byrne, D. J. O., Devaraj. S., Grundy, S. M., and Jialal I., 2002, Comparison of the antioxidant effects of concord grape juice flavonoids and α -tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults, *Am J Clin Nutr*, 76, 1367-74.
- Catharina, 2001, *Pathogenesis of dengue hemorrhagic fever and dengue syok syndrome in: dengue hemorrhagic fever in Indonesia: the role of cytokines in plasma leakage, coagulation, and fibrinolysis*. Nijmegen University Press, 15-23.
- Gunawan, S. G., Setiabudy, R., Nafrialdi, and Elysabeth, 2007, *Farmakologi dan terapi*, edisi 5, FKUI, Jakarta
- Haubitz, M., and Woywodt, A., 2004, Circulating endothelial cells and vasculitis, *J Int Med*, 43, 660-7.
- Hladovec, B., and Rossman, P., 1973, Circulating endothel cell isolated together with platelet and experimental modification of their counts in rats, *Pergamon Press Inc*, 665-7
- Maharani, Haidah, and Hainiyah, 2006, Studi potensi kalakai sebagai pangan fungsional. *Kumpulan Makalah PIMNAS XIX*, 26-29 Juli di Universitas Muhammadiyah Malang.
- Pribadi, M. J., Makmun, L. H., and Abdurahman, N., 2000, Disfungsi endotel dan aterosklerosis koroner, *Acta Medica Indonesiana*, 32(2),67-79.
- Sudjarwo, S. A., 2006, The potency of piperine as antiinflammatory and analgesic in rats and mice, *Folia medica Indonesiana*, 41(3),190-4.
- Suhartono E, 2008, Potention of aquaeus extract kalakai as antiinflammation by oxidative mechanism, *Congress International Korean Medicine*, Sangji University Korea, 22-23 October.

*) Korespondensi : Eko Suhartono

Bag. Kimia/Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Lambung

Mangkurat

Email : ekoantioksidan@yahoo.com