

## Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Volume Hippocampus Tikus (*Rattus norvegicus*) Pasca Stres Kronik

Yenni Zulhamidah<sup>1\*</sup>, Nanang Wiyono<sup>2</sup>, Dwi Cahyani Ratna Sari<sup>3</sup>, Ginus Partadiredja<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Departement of Anatomy, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta

<sup>2</sup>Departement of Anatomy, Faculty of Medicine, Sebelas Maret University, Surakarta

<sup>3</sup>Departement of Anatomy, Faculty of Medicine, Gadjah Mada University, Yogyakarta

<sup>4</sup>Departement of Physiology, Faculty of Medicine, Gadjah Mada, University Yogyakarta

\*Korespondensi : Email : yenni.zulhamidah@yarsi.ac.id

### ABSTRACT

**Background.** Chronic stress caused by restraint stress induces an increase in corticosterone (glucocorticoid) that result decreased hippocampal volume. *Centella asiatica* has long been used for various neurological disturbances in Southeast Asian countries.

**Aims.** The research aims to investigate the effects of ethanol extracts of *Centella Asiatica* to prevent the decrease of hippocampal volume after chronic stress.

**Methods.** Thirty male adult rats (*Sprague Dawley*) with body weight of 250-350 gram was randomly subdivided into six groups of treatments: Nonstress control group was given 2% Pulvis Gummi Arabicum (PGA), Stress control groups (PGA 2%), groups treated with fluoxetine 10mg/kgbw/day, and Ca150, Ca300, Ca600 containing ethanol extracts of *Centella asiatica* with doses 150 mg/kgbw/day, 300 mg/kgbw/day, 600 mg/kgbw/day, respectively followed by restraint stress. After 21 days of stress, rats underwent Morris Water Maze test for 6 days, perfused, and hippocampus was collected for histological processing. Toluidine blue staining is used to assess the estimation of hippocampal volume.

**Results.** The estimated hippocampal volume were  $3.1512 \pm 1.01$  (nonstress),  $2.4736 \pm 0.10$  (stress),  $2.7018 \pm 1.06$  (Ca150),  $2.7405 \pm 1.19$  (Ca300),  $2.2678 \pm 0.82$  (Ca600) and  $2.5818 \pm 0.70$  (Fluoxetine). Statistic test showed that there were no significant difference between stress control group and groups treated.

**Conclusion.** There is no the significant effects of Ethanol extracts of *Centella Asiatica* to prevent the decrease of hippocampal volume after chronic stress.

*Key words* : *Centella asiatica*, *Restraint stress*, *Hippocampal volume*, *Hippocampus*

### Pendahuluan

Salah satu masalah kesehatan utama dimasa sekarang ini adalah stress. Stress dapat berupa stress akut maupun stress kronik yang keduanya dapat memberikan dampak dalam jangka waktu panjang (Mc Ewen *et al.*, 1998). Stress kronik adalah stress yang berlangsung lama yang dapat diakibatkan oleh stress eksternal dalam kehidupan. (Kubera *et al.*, 2010). Dampak stress kronik diatur melalui Aksis HPA (hypothalamus, kelenjar pituitaria dan kelenjar adrenal). Sekresi ACTH oleh kelenjar pituitaria yang dipacu oleh hypothalamus, akan memacu korteks kelenjar adrenal untuk mensekresikan hormon steroid kortisol (glukokortikoid) (Anisman dan Merali, 1999). Paparan glukokortikoid dalam jangka waktu

lama atau stress kronik pada hippocampus akan menyebabkan disfungsi hippocampus, kematian neuron (apoptosis), dan atrofi hippocampus bahkan dapat menurunkan volume hippocampus. Apoptosis sel hippocampus yang terlalu cepat dan banyak akan mengakibatkan menurunnya kerja hippocampus. yaitu terganggunya pembentukan memori dan proses belajar (Lee *et al.*, 2002). Berdasarkan pentingnya peran hippocampus maka perlu tumbuhan yang harganya lebih murah dan berkhasiat mencegah dampak stress. Salah satu tanaman obat yang mempunyai efek neuroprotektif terhadap kognisi dan neuron hippocampus adalah pegagan (*C.asiatica*) (Madhyastha *et al.*, 2007). Tumbuhan pegagan merupakan tanaman obat yang banyak digunakan untuk pengobatan di Asia Tenggara,

terutama pengobatan kulit seperti wound healing, leprosy, lupus, varicose ulcers, eczema dan psoriasis, dan selain itu juga digunakan untuk mengobati stress. Triterpenoid dan saponins yang terdapat dalam tumbuhan tersebut merupakan kandungan senyawa aktif yang bertanggung jawab secara farmakologi (Gohil, 2010). Berdasarkan hal tersebut diatas perlu untuk mengetahui pengaruh pegagan terhadap volume hippocampus pascastres kronik.

## Material dan Metoda Penelitian

### Pembuatan Ekstrak

Simplisia pegagan berasal dari CV Merapi Farma Herbal Yogyakarta berupa bahan kering sebanyak 1 Kg diekstraksi menggunakan prosedur maserasi dengan pelarut etanol 70% di LPPT Unit III UGM untuk mendapatkan 100 gram ekstrak etanol pegagan. Pada penelitian ini akan digunakan ekstrak etanol pegagan dengan dosis yaitu 150, 300, dan 600 mg/kg BB dengan konsentrasi 30,60 dan 120 mg/ml. Ekstrak uji ditimbang berdasarkan konsentrasi dosis masing-masing, kemudian disuspensikan dengan *Pulvis Gummi Arabicum* (PGA) 2%. Penentuan volume pemberian ekstrak etanol pegagan dengan rumus:

Volume pemberian (ml) =

$$\frac{\text{Dosis (mg/kg BB)} \times \text{Berat Badan (kg)}}{\text{Konsentrasi (mg/ml)}}$$

### Hewan Percobaan

Subyek penelitian adalah tikus *Sprague-dawley* jantan dewasa dengan berat badan berkisar antara 250-350 gram yang diperoleh dari Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) Jakarta. Tiga puluh ekor tikus putih galur *Sprague Dawley* dewasa jantan dibagi secara random dalam 6 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol nonstres hanya di beri PGA 2%. Kelompok kontrol stres diberikan PGA 2% dengan perlakuan *restraint stres*. Kelompok Ca150 diberi ekstrak etanol pegagan dosis 150mg/kgBB/hari dengan perlakuan *restraint stres*. Kelompok Ca300 di beri ekstrak etanol pegagan dosis 300mg/kgBB/hari dengan

perlakuan *restraint stres*. Kelompok Ca600 di beri ekstrak etanol pegagan dosis 600mg/kgBB/hari dengan perlakuan *restraint stres*. Kelompok fluoksetin diberi fluoksetin 10mg/kgBB/hari dengan perlakuan *restraint stres*.

### Penentuan Volume Hippocampus

Setelah perlakuan 21 hari, tikus diterminasi dengan perfusi dan diambil hippocampusnya dan kemudian dibuat blok parafin jaringan hippocampus. Blok parafin yang berisi jaringan hippocampus disayat secara koronal setebal 3  $\mu\text{m}$  menggunakan *rotary microtome*. Sesuai dengan teori stereologi, pasangan sayatan pertama diambil secara acak kemudian pasangan sayatan berikutnya diambil dengan interval 200 sayatan, sampai akhir sayatan yang mengandung hippocampus. Setiap sayatan kemudian ditempelkan pada *slide* yang telah di-*coating*, dan dikeringkan secara vertikal pada suhu kamar. Setelah kering, *slide* jaringan di letakan di *slide warmer* pada suhu 37°C dengan posisi horizontal selama satu malam dan disimpan dalam kotak preparat pada suhu ruang sebelum diwarnai. Semua sayatan diwarnai menggunakan pewarnaan *toluidine blue* (Howard dan Reed, 1998).

Penentuan volume hippocampus menggunakan metode *Cavalieri* (Howard dan Reed, 1998) , dengan cara menggunakan sayatan pada *slide* yang diwarnai *toluidine blue*. Kemudian hasilnya di dokumentasikan menggunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan kamera (*Optilab*) dan foto jaringan di gabungkan dengan program *Adobe Photoshop CS4 Extended* di komputer. Selanjutnya foto jaringan yang sudah digabungkan di buat *grid* dengan ukuran 1  $\text{cm}^2$  dan titik pertemuan *grid* yang berada di daerah hippocampus dihitung dengan program *Adobe Photoshop CS4 Extended*, maka di dapatkan nilai P. Nilai volume hippocampus didapatkan dengan rumus (Janhke, 2004) :  $V = (P \cdot t \cdot N) / n$ . (V : Volume Hippocampus ( $\text{mm}^3$ ), P : Jumlah pertemuan titik yang terdapat di daerah hippocampus, u : luas area yang diwakili setiap titik ( $0.01\text{mm}^2$ ), t : Ketebalan sayatan, N : Total jumlah serial sayatan hippocampus, n : Jumlah sayatan yang diambil) ( Gambar 1 ).



Gambar 1. Foto mikrograf CA1-CA3 hippocampus dengan pewarnaan *toluidine blue*, terlihat (Perbesaran 100x)

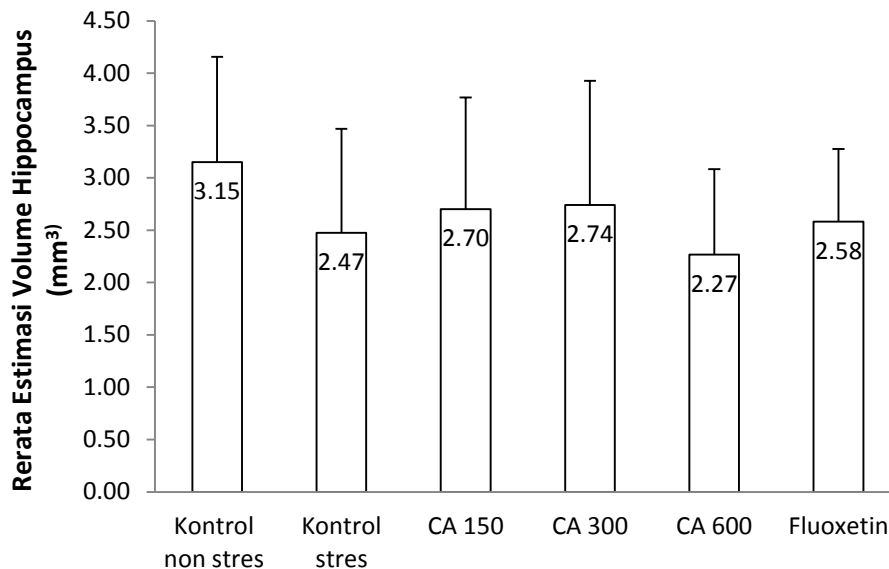
**Hasil dan Diskusi**

Berdasarkan hasil rerata estimasi volume hippocampus (CA1-3) pada Gambar 2, kelompok kontrol non stres didapatkan volume hippocampus berada pada pada tingkat tertinggi dibandingkan kelompok yang lain. Pada kelompok kontrol stres, terlihat volume hippocampus berada pada tingkat terendah dibandingkan dengan kelompok yang lain. Ini menandakan stres kronik dapat menurunkan volume hippocampus. Pada kelompok pegagan dosis 150 mg/kgBB, 300 mg/kgBB (Ca 150 dan Ca 300) dan fluoksetin, terlihat adanya kemampuan zat aktif pegagan dan fluoksetin

mampu melindungi dari stres sehingga dapat mencegah penurunan volume hippocampus. Pada kelompok pegagan dosis 600 mg/kgBB, volume hippocampus terlihat rendah (Tabel 1 dan Gambar 2). Ada kemungkinan karena pegagan pada dosis ini hanya mampu melindungi dari stres pada awalnya namun diduga terjadi toleransi dan menimbulkan efek neurotoksik (Omar *et al.*, 2011) yang menyebabkan penurunan volume hippocampus. Setelah diuji ANOVA satu jalur didapatkan estimasi volume hippocampus tidak ada perbedaan bermakna antara semua kelompoknya.

Tabel 1. Volume hippocampus pada CA1-CA3 hippocampus (rerata±SD)

	Estimasi volume hippocampus (mm <sup>3</sup> )
Kontrol non stres	3.1512 ± 1.01
Kontrol stres	2.4736 ± 0.10
Ca 150	2.7018 ± 1.06
Ca 300	2.7405 ± 1.19
Ca 600	2.2678 ± 0.82
Fluoksetin	2.5818 ± 0.70



Gambar 2. Grafik rerata estimasi volume hippocampus (rerata±SD).

## Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian ekstrak etanol pegagan tidak dapat menghambat secara signifikan penurunan volume hippocampus pascastres kronik.

## Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada dr. Nanang Wiyono, MKes yang telah bekerja sama dalam penelitian ini, dr. Dwi Cahyani Ratna Sari, M.Kes., PA(K) dan dr. Ginus Partadiredja, M.Sc., Ph.D., AIFM selaku pembimbing. Dan penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Yayasan YARSI yang telah membiayai penelitian ini.

## Daftar Pustaka

- Anisman H, Merali Z. 1999. Understanding stress: Characteristics and caveats. *Alcohol Res. Health* ; 23(4):241-249
- Chen SJ, Kao CL, Chang YL, Yen CJ, Shui JW, Chien CS, et al. Antidepressant administration modulates neural stem cell survival and serotonergic differentiation through Bcl-2. *Curr. Neurovasc. Res.* 2007; 4(1): 19-29.
- Gohil KJ, Patel JA, Gajjar AK. 2010. Pharmacological Review on Centella asiatica: A Potential Herbal Cure-all. *Indian J Pharm Sci*: 546–56.
- Howard CV, Reed MG., 1998. *Unbiased Stereology*. pp. 39-92, BIOS Scientific Publishers, United Kingdom.
- Hussin M, Abdul-Hamid A, Mohamad S, Saari N, Ismail M, Bejo MA .2007. Protective effect of centella asiatica extract and powder on oxidative stress in rats. *Food Chem* ; 100:535–541.
- Jahnke, S., 2004. The effect of undernutrition on the level of apoptosis in the hippocampal formation [Honours Thesis]. Univ. of Queensland. Australia.
- Kubera M, Obuchowicz E, Goehler L, Brzeszcz J, Maes M. In Animal Models: Psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduce neurogenesis are associated to the onset of depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.* 2010; 1:1-16.
- Lee AL, Ogle WO, Sapolsk RM. Stress and depression : possible link to neuron death in hippocampus, *Bipolar Disord.* 2002; 4:117-128.

McEwen BS, Flier JS, Underhill LA. Protective and damaging effects of stress mediators. *NEJM* 1998; 338(3):171-179.

Madhyastha S, Somayaji SN, Bairy KL, Prakash, Madhyastha P. Neuroprotective effect of centella asiatica leaf extract treatment on cognition and hippocampal morphology against prenatal stress. *TJPS* 2007; 20(2):79-88.

Omar NS, Zakaria ZAC, Mian TS, Wan Ngah WZ, Mazlan M. 2011. Centella asiatica modulates neuron survival by altering caspase-9 pathway. *JMPR* ; 5(11):2210-2109.

Subathra M, Shila S, Devi MA, Panneerselvam C. Emerging role of Centella asiatica in improving age-related neurological antioxidant status. *Exp. Gerontol.* 2005; 40:707–715.