



Pengaruh Ekstrak Patikan Kebo (*Euphorbia hirta* L.) terhadap Hitung Eosinofil Darah Tepi pada Mencit Model Asma Alergi

The Effect of Euphorbia hirta L. Extract on Peripheral Blood Eosinophils Count in Mice Model of Allergic Asthma

Diding HP.^{1,2}, R.P. Andri Putranto¹, Martini¹, Sarsono¹

¹Biochemistry Laboratory, School of Medicine, Sebelas Maret University, Surakarta

²Immunology Division, Biomedical Laboratory School of Medicine, Sebelas Maret University, Surakarta

KEYWORDS *cytokines; lipid mediators; pharmacological activities; Euphorbia hirta L.*

ABSTRACT *Asthma is characterized by both chronic inflammation and remodeling of the airways. Eosinophils may contribute to inflammation associated with bronchial asthma by causing tissue damage and subsequently organ dysfunction, but also by the generation of cytokines and lipid mediators. It was reported in previous studies that pharmacological activities were identified in various compounds extracted from Euphorbia hirta L. such as anti-inflammatory, histamine inhibitor, lipoxygenase inhibitor, anti-allergic and cyclooxygenase inhibitor. This study was aimed to determine the effect of E. hirta extract on peripheral blood eosinophils count in mice model of allergic asthma. Male Balb/C mice were sensitized and challenged intraperitoneally (i.p) with ovalbumin (OVA). Mice were immunized i.p. on days 1 and 14 with 2.5 mg of OVA adsorbed to 7.75 ml of Aluminium hydroxide gel. OVA challenges (10 mg OVA in 1 ml of PBS) were administered aerosolly on days 21, 23, 25 and 27, and peripheral blood eosinophils count was determined on day 28. A one-way analysis of variance (ANOVA) with LSD post hoc analysis was used to determine significant differences. Results were expressed as mean \pm SEM, and values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The results showed that peripheral blood eosinophils count in the OVA group was 51.0 ± 10.4 cells/mm³, E. hirta extract dose 500 mg/BW/day was 30.2 ± 6.3 cells/mm³, E. hirta extract dose 1,000 mg/BW/day was 30.4 ± 6.0 cells/mm³ and antihistamine group was 32.2 ± 8.6 cells/mm³ respectively, while control mice showed 46.6 ± 8.8 cells/mm³. It was concluded that E. hirta extract could minimize peripheral blood eosinophils count.*

Dari pengalaman secara empiris Patikan kebo (*Euphorbia hirta* L.) telah digunakan untuk "mengobati" asma (IPTEKnet, 2009), namun keberadaannya belum banyak dikembangkan dan dimanfaatkan sebagai obat asma alergi.

Dasar dari terjadinya penyakit asma alergi adalah adanya ketidak-seimbangan antara sel CD4⁺ Th1 dan CD4⁺ Th2. Inflamasi kronik, hipersekresi mukus, peningkatan kadar Ig E serum, dan *airway hyperrespon-siveness* (AHR) merupakan ciri

khas dari asma alergi. Sel-sel CD4⁺ Th2, bersama-sama dengan sel-sel inflamasi lainnya seperti sel mast, sel B, dan eosinofil berperan penting dalam inisiasi, perkembangan, dan kronisitas penyakit ini (Elias *et al.*, 2003). Pengaktifan sel-sel inflamasi tersebut akan mengakibatkan pe-

Correspondence:

Diding Heri Prasetyo, dr., MSi, Sebelas Maret University School of Medicine, Solo, Jalan Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126, Telephone and Facsimile: (0271) 664178

ningkatan produksi sitokin-sitokin dari sel CD4⁺ Th2 (IL-4, IL-5 dan IL-13) dan khemokin. Sitokin-sitokin CD4⁺ Th2 tersebut sangat penting untuk maturasi sel B, sintesis Ig E, eosinofilia saluran napas, sekresi mukus, dan akhirnya AHR (Elias *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006).

Dalam peristiwa degranulasi, sel mast melepaskan sejumlah mediator antara lain histamin, enzim siklooksigenase dan lipoksigenase. Kesemua mediator tersebut berefek mengecilkan trakhea dan saluran pernafasan, kontraksi otot polos, meningkatkan permeabilitas pembuluh darah, peningkatan sekresi mukus dan meningkatkan aktivasi serta perekrutan eosinofil (Herrick & Bottomly, 2003). Eosinofil berasal dari sumsum tulang dan dapat ditemukan dalam darah tepi. Peningkatan hitung eosinofil berhubungan dengan sejumlah penyakit terutama infeksi dan alergi (Simon and Simon, 2007). Eosinofilia paru merupakan ciri pokok dari asma alergi, dan banyaknya sel eosinofil serta jumlah produknya berhubungan dengan keparahan reaktifitas saluran nafas (Laprise *et. al.*, 2004; Blease *et. al.*, 2000). Herba Patikan kebo mempunyai sejumlah kandungan kimia yang memiliki aktivitas anti-histamin, anti-inflamasi (Singh *et al.*, 2006; Duke, 2009), anti-lipoksigenase, anti-siklooksigenase, antileukotrien, Ca²⁺ antagonis, antialergi, anti-asma (Duke, 2009). Dengan aktivitas kandungan kimia yang dimilikinya, diharapkan akan mampu memperkecil tingkat kerusakan jaringan (akibat proses alergi-inflamasi) yang diakibatkan oleh pelepasan mediator-mediator inflamasi dalam peristiwa degranulasi sel mast. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh ekstrak Patikan kebo terhadap hitung eosinofil darah tepi model mencit asma alergi.

BAHAN DAN CARA KERJA

Hewan uji

Hewan uji berupa 25 ekor mencit Balb/C jantan, dengan berat badan \pm 15-23 gram, dan berumur 4-6 minggu. Mencit Balb/C diperoleh dari Unit Pengembangan

Hewan Percobaan Universitas Setya Budi, Surakarta. Bahan makanan mencit digunakan pakan mencit BR I.

Bahan tanaman

Ekstrak Patikan kebo diperoleh dari herba Patikan kebo yang dikeringkan, dihaluskan, dan kemudian diekstraksi dengan cairan penyari etanol 70%. Ekstraksi dilakukan dengan metode perkolasi, ekstrak dibuat di Balai Besar Pengembangan dan Penelitian Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B₂P₂TO₂T) Tawangmangu.

Perlakuan hewan uji

Semua hewan coba diadaptasikan selama tujuh hari di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran UNS, kemudian dikelompokkan menjadi lima kelompok, masing-masing kelompok 5 ekor. Kelompok kedua disensitisasi dan diberikan ekstrak Patikan kebo per-oral dengan dosis 500 mg/kgBB/hari (PK I), kelompok ketiga (PK II) disensitisasi dan diberikan ekstrak Patikan kebo per-oral dengan dosis 1.000 mg/kgBB/ hari, kelompok keempat (AH) disensitisasi dan diberikan antihistamin generasi III (fexofenadine) per-oral dengan dosis 0.02 mg/mencit/hari, kelompok kelima (OVA) hanya disensitisasi ovalbumin. Sementara itu sebagai kontrol adalah kelompok pertama (K) tanpa diberi perlakuan.

Sensitisasi hewan coba

Untuk membuat mencit Balb/C model alergi, dilakukan imunisasi mencit secara *i.p* pada hari ke-1 dan 14 dengan 2,5 mg OVA dalam 7,75 ml aluminium hidroksida (grade V; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Pemaparan OVA aerosol berupa nebuliser cairan OVA (10 mg OVA dalam 1ml PBS) menggunakan CompMist™ Compressor nebuliser (Mabis Healthcare Inc, USA) yang digerakkan kompresor udara dengan *flow rate* 6 L/min. Pemaparan OVA aerosol diberikan pada hari ke-21, 23, 25 dan 27.

Penentuan jumlah absolut eosinofil darah tepi

Setelah 24 jam akhir pemaparan OVA, mencit diambil darahnya melalui

ekor untuk kemudian ditentukan jumlah absolut eosinofil per mm³. Penghitungan dilakukan di Pusat Diagnostik "Budi Sehat" Surakarta.

Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji Anova dan dilanjutkan dengan *Post hoc test* menggunakan program *SPSS for Windows Release 11.5*.

HASIL

Setelah dilakukan perlakuan selama 28 hari, hitung eosinofil darah tepi mencit Balb/C dari tiap-tiap hewan coba kelima kelompok dihitung. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Dari Tabel 1 terlihat bahwa dalam keadaan normal jumlah sel eosinofil di darah perifer berkisar 46,6±8,8 sel/mm³. Sensitisasi OVA mampu meningkatkan eosinofil yang terlihat pada kelompok OVA yaitu 51.0±10.4 sel/mm³.

Dari uji anova satu jalur didapatkan ada perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan pada $\alpha = 0.05$ (Tabel 2).

Untuk mengetahui letak perbedaan, maka uji statistik dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*). Dari hasil uji LSD, didapatkan adanya perbedaan hitung absolut eosinofil darah tepi mencit Balb/C antar kelompok perlakuan. Sensitisasi OVA meningkatkan hitung

eosinofil darah tepi (Tabel 1), namun secara statistik tidak bermakna (Tabel 3). Pemberian ekstrak Patikan kebo dan antihistamin pada hewan coba yang disensitisasi OVA mampu menurunkan hitung eosinofil darah tepi secara bermakna, hal ini terlihat antara OVA dengan PK I ($p = 0.001$), PK II ($p = 0.001$) dan AH ($p = 0.002$). Pemberian ekstrak Patikan kebo dosis 500 dan 1.000 mg/kgBB/hari, tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dalam menurunkan eosinofil darah tepi. Selain itu penurunan hitung eosinofil darah tepi pada penelitian ini, pemberian ekstrak Patikan kebo memperlihatkan tidak ada perbedaan yang bermakna dengan pemberian antihistamin generasi ketiga (Tabel 3).

Tabel 1. Jumlah absolut Eosinofil darah tepi mencit Balb/C setelah perlakuan (sel/mm³)

| Kelompok Kerlakuan | Rerata ± SD |
|--------------------|-------------|
| K | 46,6 ± 8,8 |
| PK I | 30,2 ± 6,3 |
| PK II | 30,4 ± 6,0 |
| AH | 32,2 ± 8,6 |
| OVA | 51.0 ± 10.4 |

Keterangan: SD= standar deviasi, K= kontrol, PK I= Patikan kebo dosis 500 mg/kgBB/hari, PK II= Patikan kebo dosis 1.000 mg/kgBB/hari, AH= antihistamin, OVA= ovalbumin

Tabel 2. Uji Anova satu jalur jumlah absolut Eosinofil darah tepi

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|-------|
| Between Groups | 1975.84 | 4 | 493.96 | 7.406 | .001* |
| Within Groups | 1334.00 | 20 | 66.70 | | |
| Total | 3309.84 | 24 | | | |

Keterangan: * = $p < 0.05$: ada perbedaan bermakna pada $\alpha = 0.05$, df = *degree of freedom*
F = nilai F hitung, Sig. = *significant*

Tabel 3. Uji LSD jumlah absolut Eosinofil darah tepi

| Kelompok Perlakuan | | <i>significant</i> |
|--------------------|-------|--------------------|
| K | OVA | .404 |
| | PK I | .005 |
| | PK II | .005 |
| | AH | .011 |
| OVA | PK I | .001 |
| | PK II | .001 |
| | AH | .002 |
| PK I | PK II | .969 |
| | AH | .703 |
| PK II | AH | .731 |

*The mean difference is significant at the 0.05 level.

Keterangan: K= kontrol, PK I= Patikan kebo dosis 500 mg/kgBB/hari, PK II= Patikan kebo dosis 1.000 mg/kgBB/hari, AH= antihistamin, OVA= ovalbumin

PEMBAHASAN

Asma adalah penyakit inflamasi kronik mukosa saluran pernafasan (Roh *et al.*, 2008). Secara klinik dibedakan menjadi penyakit asma alergi dan non-alergi, berdasarkan adanya spesifik antibodi Ig E terhadap alergen di paru-paru (Hammad dan Lambrecht, 2008).

Provokasi alergen (OVA) akan mempengaruhi eosinofil sebagai sel yang mempunyai kemampuan untuk mengatur imunitas melalui modulasi respon sel T dan inflamasi jaringan lokal (Jacobsen *et al.*, 2007). Pemaparan *antigenpresenting cells* (APCs) oleh OVA akan mengawali terjadinya aktivasi sel-sel CD4⁺ Th2 dan sintesis Ig E, yang lebih dikenal sebagai tahap sensitisasi alergi. Pemaparan alergen berikutnya (OVA aerosol) akan menyebabkan perekrutan dan aktivasi sel-sel inflamatori serta pelepasan mediator, yang akan menyebabkan respon alergi baik tahap cepat maupun lambat. Pada respon alergi tahap awal, beberapa menit setelah kontak dengan alergen terjadi degranulasi sel mast di-sertai pelepasan mediator-mediator inflamasi. Mediator-mediator ini meliputi histamin, leukotrien, dan sitokin-sitokin yang akan meningkatkan permeabilitas pembuluh darah, kontraksi otot polos dan produksi mukus. Khemokin-khemokin

yang dilepaskan sel mast dan sel-sel lainnya secara langsung akan menyebabkan perekrutan sel-sel inflamasi. Khemokin ini akan memberikan kontribusi terhadap respon alergi tahap lambat dengan ditandai oleh banyaknya sel-sel CD4⁺ Th2 dan eosinofil (Holgate and Polosa, 2008).

Alergen (OVA) akan menginduksi pe-rekrutan eosinofil ke dalam jaringan paru, ke-adaan ini berhubungan dengan peran sel T CD4⁺ khususnya sel-sel Th2 dan pelepasan sitokin-sitokin yang dilepaskan sel T. Pada manusia, IL-4 dan IL-5 mempunyai fungsi yang penting dalam menyebabkan infiltrasi eosinofil ke dalam saluran nafas. Peningkatan sel-sel T yang teraktivasi, eosinofil, dan sitokin IL-5 maupun *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) terlihat pada asma atopik setelah dipapar alergen inhalasi (Shi, 2004). Hal ini juga terlihat dari hasil penelitian ini, pemaparan OVA inhalasi mampu meningkatkan hitung eosinofil (Tabel 1). Eosinofil dihasilkan di sumsum tulang dan dapat ditemukan di darah tepi dengan jumlah berkisar 1%-5% leukosit dengan batas atas $0,4 \times 10^9$ /L (Simon and Simon, 2007).

Eosinofil melepaskan sejumlah besar mediator inflamasi, diantaranya leukotrien dan protein-protein kationik seperti *eosinophil cationic protein (ECP)*, *eosinophil peroxidase (EP)*, *major basic protein (MBP)* dan *eosinophil-derived neurotoxin (EDN)* (Shi, 2004). Mediator-mediator tersebut merupakan sumber penting dari sitokin-sitokin pro-inflamasi seperti IL-3, IL-5 dan IL-13. Sekarang telah ada bukti bahwa respon sel Th1 mungkin juga bertanggung jawab pada terjadinya bentuk atopi kronik, mencakup apoptosis epithelial maupun aktivasi sel otot polos (Holgate dan Polosa, 2008).

Respon inflamasi kronik saluran nafas pada asma dicirikan oleh adanya peningkatan infiltrasi sel-sel CD4⁺ Th2, eosinofil dan sel mast ke dalam saluran nafas disertai dengan produksi sitokin sel-sel CD4⁺ Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) yang berlebihan (Roh *et al.*, 2008; Broide, 2008). Sitokin-sitokin sel CD4⁺ Th2 tersebut mempunyai peran penting dalam patogenesis asma alergi, melalui induksi hiperplasi sel

goblet, remodeling dinding saluran nafas dan hiperreaktivitas bronkhial (Hammad dan Lambrecht, 2008). Selain itu keberadaan sel-sel inflamasi dalam saluran pernafasan akan menimbulkan berbagai derajat perubahan struktur saluran nafas yang dikenal dengan remodeling saluran nafas. Perubahan struktur saluran nafas ini dicirikan oleh adanya metaplasia sel epitel, hiperplasi/ hipertrofi otot polos, fibrosis sub-epithelial, dan peningkatan angiogenesis (Mauad *et al.*, 2007). Dengan demikian pengembangan obat-obat asma sekarang ditujukan pada penemuan-penemuan komponen obat-obatan yang mempunyai target pada respon inflamasi saluran nafas yang dikendalikan oleh sel CD4⁺ Th2, seperti antibodi anti-Ig E, antagonis sitokin dan/ khemokin, imunomodulator, maupun antagonis molekul adhesi (Caramori *et al.*, 2008).

Pemberian ekstrak patikan kebo secara per-oral mampu menurunkan jumlah eosinofil darah tepi (Tabel 1) secara bermakna (Tabel 3) pada hewan coba model asma alergi. Penurunan jumlah eosinofil ini tentunya akan menurunkan tingkat kerusakan jaringan maupun patogenesis asma alergi. Hal ini karena menurut Shi (2004), eosinofil berperan dalam meningkatkan patogenesis penyakit alergi. Eosinofil memproduksi mediator-mediator inflamasi seperti *leukotriene C4*, *platelet-activating factor* (PAF), radikal bebas, protein-protein kationik seperti *MBP*, *EP*, *ECP*, dan *EDN*, yang akan menyebabkan disfungsi dan perusakan sel-sel lainnya. Respon efektor ini ditingkatkan oleh adanya paparan sitokin-sitokin yang secara spesifik akan mengaktivasi eosinofil seperti sitokin *eosinophil growth factor*, GM-CSF, IL-3, dan IL-5 (Shi, 2004). GM-CSF, IL-3, dan IL-5 lebih dikenal sebagai *eosinophil hematopoietins* (Simon dan Simon, 2007). Pada manusia, rangsangan sitokin termasuk GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5, dan IFN- γ dapat menginduksi eosinofil untuk mengekspresikan protein MHC II yang dalam keadaan normal tidak diekspresikan (Wang *et al.*, 2007). Selain itu hasil penelitian ini sesuai dengan hasil Singh *et al.*, (2006), dimana *Euphorbia hirta* memiliki aktivitas

dalam mencegah respon alergi baik tipe cepat ataupun lambat.

Proses penurunan jumlah sel eosinofil dalam darah tepi (respon alergi tipe lambat) pada pemberian Patikan kebo dimungkinkan karena Patikan kebo mempunyai sejumlah kandungan kimia yang memiliki aktivitas anti-histamin, dan anti-inflamasi (Singh *et al.*, 2006; (Duke, 2009). Duke (2009) menyebutkan bahwa patikan kebo juga memiliki aktivitas anti-lipoksigenase, anti-siklooksigenase, antileukotrien, Ca²⁺ antagonis, antialergi, antiasma, antibronkhitis, bronkhodilator, penghambat NF- κ B, penghambat nitrik oksid (NO), penghambat TNF- α , dan penghambat *cAMP-Phosphodiesterase*. Dengan berbagai aktivitas tersebut Patikan kebo mampu memperkecil tingkat kerusakan jaringan (akibat proses alergi-inflamasi) yang diakibatkan oleh pelepasan mediator lipid (leukotrien), prostaglandin dan histamin dalam peristiwa degranulasi sel mast maupun sel eosinofil. Keadaan ini tentunya akan memberikan umpan balik negatif terhadap peran CD4⁺ Th2, sehingga akan terlihat jumlah eosinofil dalam darah tepi akan menurun.

SIMPULAN

Pemberian ekstrak Patikan kebo secara per-oral mampu menurunkan jumlah eosinofil darah tepi, tidak berbeda bermakna dengan antihistamin generasi ke-3. Pemberian ekstrak patikan kebo dosis 500 dan 1.000 mg/kgBB/ hari, tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dalam menurunkan eosinofil darah tepi.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Fakultas Kedokteran UNS melalui dana DIPA BLU Kompetitif FK-UNS tahun anggaran 2009.

KEPUSTAKAAN

Blease K, Lukacs NW, Hogaboam CM and Kunkel SL 2000. Chemokines and their role in airway hyper-reactivity. *Respir Res.*; 1(1): 54-61.

- Broide DH 2008. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. *J Allergy Clin Immunol.* 121(3): 560-572.
- Caramori G, Groneberg D, Ito K, Casolari P, Adcock IM and Papi A 2008. New drugs targeting Th2 lymphocytes in asthma. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 3(Suppl 1):S6.
- Duke JA 2009. List of Chemicals of *Euphorbia hirta* L. In: Phyto-chemical and Ethnobotanical Databases. http://www.natrindex.com/duke_plant-G.html
- Elias JA, Lee CG, Zheng T, Ma B, Homer RJ and Zhu Z 2003. New insights into the pathogenesis of asthma. *J Clin Invest.* 111(3): 291-297.
- Hammad H and Lambrecht BN 2008. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nature Rev.Immunol.* 8: 193-204.
- Herrick CA and Bottomly K 2003. To Respond Or Not To Respond: T Cells In Allergic Asma. *Nature Reviews Immunology* 3: 405-412.
- Holgate ST and Polosa R 2008. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature Rev.Immunol.* 8: 218-230.
- IPTEKnet 2009. Patikan Kebo (*Euphorbia hirta*, Linn.) dalam Tanaman Obat Indonesia. http://www.iptek.net.id/ind/pd_tanobat/view.php?mn_u=2&id=19
- Jacobsen EA, Taranova AG, Lee NA and Lee JJ 2007. Eosinophils: singularly destructive eff ector cells or purveyors of immunoregulation? *J. Allergy Clin. Immunol.* 119: 1313 - 1320.
- Laprise C, Sladek R, Ponton A, Bernier MC, Hudson TJ and Laviolette M 2004. Functional classes of bronchial mucosa genes that are differentially expressed in asthma. *BMC Genomics.*; 5: 21.
- Lee KS, Lee HK, Hayflick JS, Lee YC, Puri KD 2006. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase δ attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in murine asthma model. *FASEB J.*20, 455-465.
- Mauad T, Bel EH, Sterk PJ 2007. Asthma therapy and airway remodeling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.*120: 997-1009.
- Roh S-S, Kim S-H, Lee Y-C and Seo Y-B 2008. Effects of Radix Adenophorae and Cyclosporine A on an OVA-Induced Murine Model of Asthma by Suppressing to T Cells Activity, Eosinophilia, and Bronchial Hyper-responsiveness. *Mediators of Inflammation*, Article ID 781425, 11 pages.
- Shi HZ 2004. Eosinophils function as antigen-presenting cells. *J. Leukoc. Biol.* 76: 520-527.
- Simon D and Simon H 2007. Eosinophilic disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 119 (6): 1291-300.
- Singh GD, Kaiser P, Youssef MS, Singh S, Khajuria A, Koul A, Bani S, Kapahi BK, Satti NK, Suri KA, Johri RK 2006. Inhibition of early and late phase allergic reactions by *Euphorbia hirta* L. *Phytotherapy Research.* Volume 20 Issue 4, Pages 316 - 321.
- Wang H-B, Ghiran I, Matthaai K and Weller PF 2007. Airway Eosinophils: Allergic Inflammation Recruited Professional Antigen-Presenting Cells. *The Journal of Immunology*, 179:7585-7592.