

Efek Neuroprotektif Ekstrak Akar *Acalypha indica* 500 mg/kgBB terhadap Perubahan Inti Sel Saraf Hipokampus Pascahipoksia Serebri

Herliani Dwi Putri Halim,¹ Nurhadi Ibrahim²

¹ Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

² Departemen Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Abstrak

Stroke merupakan manifestasi klinis gangguan sirkulasi darah di otak yang menyebabkan defisit neurologis. Delapan puluh persen stroke merupakan stroke non-hemoragik akibat oklusi pembuluh darah otak sehingga terjadi kerusakan sel saraf yang diinduksi oleh hipoksia. Kerusakan tersebut dapat dicegah oleh tanaman akar kucing (*Acalypha indica*) yang mengandung antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek neuroprotektif ekstrak akar *A. indica* terhadap hipokampus sprague dawley pascahipoksia. Terdapat tiga kelompok yaitu (1) kontrol negatif dengan akuades, (2) kontrol positif dengan vitamin B1 dosis 30 mg/kgBB, dan (3) kelompok perlakuan dengan ekstrak akar *A. indica* dosis 500 mg/kgBB. Setelah tujuh hari perlakuan, dilakukan ligasi arteri karotis komunis sprague dawley selama satu jam untuk menciptakan kondisi hipoksia. Selanjutnya, dibuat sediaan hipokampus untuk menghitung jumlah sel normal. Penelitian ini menggunakan desain eksperimental dengan uji One Way Anova. Hasil uji One Way Anova menunjukkan rerata persentase jumlah sel normal tidak berbeda bermakna terhadap CA1 ($p=0,343$), CA3 ($p=0,174$), lapisan dalam girus dentatus ($p=0,270$), dan lapisan luar girus dentatus ($p=0,422$) pada ketiga kelompok. Namun secara kuantitatif, rerata persentase jumlah sel normal paling banyak ditemukan pada kelompok yang mendapatkan ekstrak akar *A. indica*.

Kata kunci: *Acalypha indica*, efek neuroprotektif, hipokampus, hipoksia

The Neuroprotective Effect of *Acalypha indica* Root Extract dose 500 mg/kgBW to Change of Hippocampus Nerve Cells Post Cerebral Hypoxia

Abstract

Stroke is a clinical manifestation of brain circulatory disorders causing neurological deficits. Eighty percents are non-hemorrhagic stroke resulting from vascular occlusion thus advancing the damage-induced hypoxia of hippocampal neuron. This damage can be prevented by *Acalypha indica* which contents antioxidant. The purpose of this study is to prove the neuroprotective effect of *A. indica* L. root extract to hippocampus of sprague dawley post-hypoxia. There are three groups: (1) negative control with aquades, (2) positive control with vitamin B1 dose 30 mg/kgBW, and (3) treatment group with *A. indica* root extract dose 500 mg/kgBW. After treatment for seven days, we administered the ligation of common carotids for an hour to expose hypoxia. Then, the brain was made into hippocampal slices in order to count the number of normal cells. This study used an experimental design with One Way Anova test. The results of One Way Anova test analysis showed that there are no significant differences between the mean of normal cells percentage in CA1 ($p=0,343$), CA3 ($p=0,174$), inner ($p=0,270$) and outer ($p=0,422$) layer of dentate gyrus among three groups. However quantitatively, the highest mean of normal cells percentage is found in the group receiving *A. indica* root extract.

Keywords: *Acalypha indica*, hippocampus, hypoxia, neuroprotective effect

Pendahuluan

Salah satu penyakit serebrovaskular tersering adalah stroke.¹ Penyakit tersebut menempati posisi ketiga sebagai penyebab kematian tersering di dunia setelah infark miokard dan kanker.² Stroke merupakan manifestasi klinis gangguan sirkulasi darah di otak yang mengakibatkan defisit neurologis. Insidens pada populasi berusia lanjut yaitu 75-84 tahun 10 kali lebih tinggi.³ Di Indonesia, prevalensi stroke mencapai 8,3 per 1000 penduduk.⁴

Dengan pertambahan jumlah populasi usia lanjut dan peningkatan prevalensi faktor risiko stroke, diperkirakan insidens stroke meningkat dua kali lipat pada tahun 2020.² Stroke non-hemoragik merupakan stroke yang paling sering dijumpai dengan insidens sekitar 80% dari semua stroke. Jenis ini disebabkan oleh oklusi pembuluh darah otak sehingga pasokan oksigen dan glukosa ke otak terhenti.⁴ Penurunan suplai oksigen ke otak akan menyebabkan suatu kondisi yang disebut hipoksia serebri.^{5,6}

Sebagai organ target dari stroke, sel saraf otak sangat sensitif terhadap kekurangan oksigen termasuk sel saraf pada hipokampus serebri yang berfungsi dalam proses penggabungan ingatan.⁵⁻⁷ Pada hipoksia, kadar *reactive oxygen species* (ROS) akan meningkat yang menyebabkan degradasi membran lipid, enzim, dan kerusakan DNA.⁸ Selain itu, pada keadaan hipoksia, sintesis *hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1) dan *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) yang bersifat neuroprotektif menurun. Kerusakan dan kematian sel saraf yang terjadi bersifat ireversibel sehingga tidak dapat diobati dengan cara apapun. Oleh karena itu, dibutuhkan suatu agen neuroproteksi untuk melindungi sebanyak mungkin sel saraf pada otak dari kerusakan akibat hipoksia.⁹

Dengan semakin banyak tanaman tradisional yang digunakan sebagai pengobatan lini pertama, tanaman yang berpotensi sebagai agen neuroproteksi semakin banyak diteliti. Salah satunya adalah *Centella asiatica* yang terbukti dapat mencegah pembentukan plak amiloid pada penyakit alzheimer dan neurotoksisitas dopamin pada penyakit Parkinson.^{10,11} Sebaliknya, efek neuroproteksi akar kucing *Acalypha indica* pada stroke masih sedikit diteliti.

A. indica merupakan tanaman obat yang tersebar di seluruh di Indonesia.¹² Beberapa kandungan tanaman tersebut seperti saponin, tannin, dan flavonoid memiliki efek antioksidan dan antiinflamasi yang mampu mencegah kerusakan sel akibat hipoksia.^{13,14} Berdasarkan penelitian

Purwaningsih *et al*, ekstrak akar *A. indica* terbukti memiliki efek neuroproteksi *ex vivo* dan *in vivo* pada taut saraf-otot katak.¹⁵ Ekstrak akar *A. indica* juga meningkatkan viabilitas dan kadar BDNF pada hipokampus tikus *sprague dawley* secara *in vitro*.¹²

Belum adanya penelitian mengenai efek neuroprotektif *A. indica* terhadap inti sel saraf hipokampus secara *in vivo*, mendasari penelitian ini untuk membuktikan hubungan pemberian ekstrak akar *A. indica* dosis 500 mg/kgBB terhadap perubahan inti sel saraf hipokampus. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk membandingkan perubahan inti sel saraf tikus yang mendapatkan ekstrak akar *A. indica* dengan yang hanya mendapatkan akuades atau vitamin B1 dosis 30 mg/kgBB. Vitamin B1 dipilih menjadi kontrol positif karena memiliki fungsi dalam konduktansi neuron.

Metode

Penelitian ini menggunakan studi eksperimental *in vivo* di Departemen Biokimia dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI) pada bulan Mei-Desember 2010. Variabel bebas berupa dosis akar *A. indica* dan vitamin B1, variabel terikat berupa jumlah sel CA1, CA3, lapisan dalam dan luar girus dentatus otak, serta variabel perancu berupa nutrisi dan derajat hipoksia.

Tikus dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan secara acak tersamar yaitu: 1) kelompok kontrol negatif (akuades), 2) kelompok kontrol positif (vitamin B1 dosis 30 mg/kgBB), dan 3) kelompok dengan ekstrak akar *A. indica* dosis 500 mg/kgBB.

Ekstrak akar *A. indica* dibuat dengan mendekok kadar simplisia (akar *A. indica*) sebesar 10% sebanyak dua kali dengan durasi masing-masing 30 menit. Ekstrak dikeringkan dengan rotavapor Buchi hingga membentuk endapan kental lalu endapan ditimbang untuk menentukan rendemen. Selanjutnya, dibuat koloidal dari ekstrak kering dengan dosis 300 mg/mL.

Tikus ditimbang untuk menghitung kebutuhan ekstrak sesuai dosis per kilogram berat badan. Ekstrak diberikan ke mulut tikus secara perlahan menggunakan sonde selama 7 hari.

Hipoksia tikus dilakukan dengan teknik oklusi arteri karotis komunis kanan dan kiri tikus. Pertama, berat badan tikus ditimbang untuk menentukan dosis ketalar. Kemudian, tikus diletakkan di dalam sungkup yang telah berisi kapas dibasahi eter 100% untuk membius tikus. Tikus yang tidak sadar dianestesi dengan ketalar lalu dibedah untuk mencari arteri karotis komunis kemudian dilakukan ligasi atau dijepit dengan klem selama 1 jam.

Tikus yang telah mengalami hipoksia selama satu jam dilakukan torakotomi. Setelah rongga dada terbuka, dilakukan identifikasi ventrikel kiri jantung lalu diinsersi jarum dari pompa *syringe* untuk fiksasi intravital. Fiksatif berupa formol salin dialirkan dari gelas beker ke mesin pompa menuju jarum yang telah difiksasi ke ventrikel kiri. Proses itu berlangsung selama 30 menit. Selanjutnya, kulit kepala dan tengkorak diinsisi dan organ otak diangkat. Otak dipotong koronal menjadi tiga. Sepertiga tengah dibuat sediaan hipokampus lalu direndam dalam cairan formol salin 10% dan disimpan dalam suhu ruangan selama 24 jam.

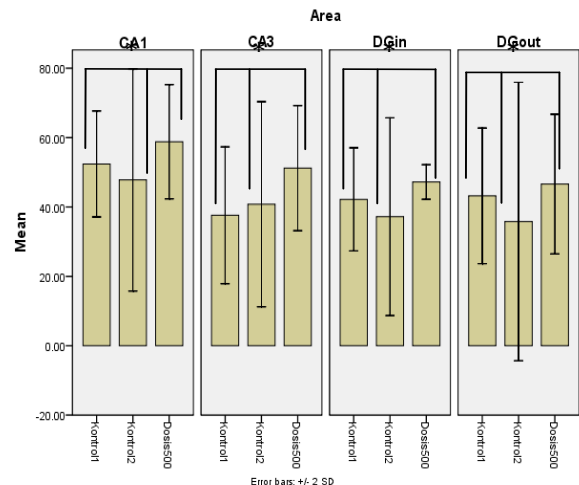
Sediaan hipokampus dimasukkan ke dalam alkohol bertingkat untuk dehidrasi. Selanjutnya dibeningkan dengan benzyl-alkohol dan pembenaman dalam *benzol-histoplast*. Selanjutnya, sediaan dicetak dalam blok parafin dan dipotong dengan mikrotom dengan ketebalan 6-8 μm lalu diwarnai dengan hematoksilin-eosin.

Preparat hipokampus diamati di bawah mikroskop perbesaran obyektif 4X. Area hipokampus diidentifikasi dengan pembesaran obyektif 10X yaitu area CA1, CA3, lapisan dalam dan luar girus dentatus.

Area CA1 yang diambil adalah yang berada di sisi atas lapisan dalam girus dentatus. Area CA3 yang diambil adalah yang berada di sisi atas area polimorf girus dentatus. Lapisan dalam girus dentatus diambil dari ujung atas dan lapisan luar diambil dari bagian ujung atas. Keseluruhan area diambil dalam satu lapang pandang mikroskop dan dipotret dengan *optilab viewer*. Dari gambar tersebut, dihitung sel normal per lapang pandang dengan program *image raster* perbesaran obyektif 40X agar sel terlihat lebih jelas. Kemudian, dihitung jumlah seluruh sel per lapang pandang. Jumlah sel yang rusak dihitung dengan mengurangi jumlah seluruh sel dengan jumlah sel normal. Penghitungan dilakukan oleh empat orang *observer*. Untuk mengidentifikasi efek neuroprotektif ekstrak *A. indica*, dihitung persentase jumlah sel normal lalu dibandingkan rerata persentase jumlah sel normal pada kelompok kontrol negatif dan positif.

Hasil dan Pembahasan

Dari gambar 1, terlihat bahwa rerata persentase sel normal terbesar di seluruh area hipokampus terdapat pada kelompok dosis 500, diikuti kelompok kontrol 1 (akuades) dan kontrol 2 (vitamin B1 30 mg/kgBB). Di area CA3 rerata persentase sel normal pada kontrol 2 lebih tinggi dari kontrol 1.



Gambar 1. Rerata Persentase Sel Saraf Normal di area CA1, CA3, Lapisan Dalam dan Luar Girus Dentatus

(DGin=Girus Dentatus Dalam, DGout= Girus Dentatus Luar)

Hal tersebut membuktikan bahwa ekstrak akar *A. indica* mengandung antioksidan. Flavonoid dan metabolitnya dapat berperan sebagai antioksidan langsung atau modulator enzim yang membatasi pembentukan ROS.

Flavonoid dapat melindungi otak dari jejas yang diinduksi oleh neurotoksin dan menekan neuroinflamasi, serta berpotensi meningkatkan memori (fungsi kognitif dan pembelajaran) dalam penyakit neuro-degeneratif. Hal tersebut berkaitan dengan mekanisme kerja flavonoid yang memodulasi protein kinase dan kaskade sinyal lipid kinase, seperti PI3 kinase, protein kinase C, dan *mitogen activated-protein* (MAP) kinase sehingga terjadi perubahan ekspresi gen dan aktivitas kaspase. Penghambatan terhadap aktivasi kaspase menyebabkan flavonoid mampu menghambat kerusakan sel saraf yang diinduksi oleh stress oksidatif. Dalam mencegah neuroinflamasi, flavonoid menekan ekspresi COX-2 dan iNOS, produksi NO, pelepasan sitokin, aktivasi NADPH oksidase, dan pembentukan ROS.¹⁶ Sama halnya dengan flavonoid, tannin, saponin, stigmasterol, dan fenol yang terkandung dalam akar *A. indica* juga memiliki efek antioksidan. Polifenol mampu menyerap, menetralkan, dan membuang radikal bebas karena reaksi redoks dari strukturnya yang menghambat peroksidasi lipid.¹⁷

Selain berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi, flavonoid meningkatkan fungsi endotelial dan aliran darah perifer sehingga meningkatkan aliran darah otak (*cerebral*

blood flow/ CBF) dan memicu neurogenesis di hipokampus. Sel saraf yang baru terbentuk tersebut akan memiliki hubungan antar sinaps yang efektif sehingga meningkatkan fungsi memori.¹⁶

Setelah kelompok perlakuan mendapat ekstrak akar *A. indica*, rerata persentase jumlah sel normal banyak ditemukan pada kelompok kontrol negatif diikuti dengan kelompok kontrol positif. Hal itu dapat disebabkan oleh dosis tiamin yang diberikan tidak adekuat dalam menimbulkan efek neuroproteksi. Pannangrong *et al*, melaporkan pemberian beras merah yang merupakan sumber tiamin dengan dosis 180, 360, 720 mg/kgBB per hari pada tikus wistar (*Rattus novergicus*) dapat mencegah gangguan memori dan neurodegeneratif pada hipokampus.¹⁸

Berdasarkan uji *one way anova*, diperoleh hasil rerata persentase sel normal tidak berbeda bermakna di area CA1 ($p=0,343$), CA3 ($p=0,174$), lapisan dalam girus dentatus ($p=0,270$), dan lapisan luar girus dentatus ($p=0,422$) antara kelompok dosis 500, kontrol 1, dan kontrol 2.

Pemberian ekstrak akar *A. indica* dosis 500 mg/kgBB sebelum hipoksia tidak berhubungan dengan perubahan inti sel saraf hipokampus. Dengan kata lain, ekstrak tanaman tersebut tidak memberikan efek neuroprotektif yang signifikan terhadap hipokampus tikus *sprague dawley* pascahipoksia serebri. Hasil yang tidak bermakna itu dapat disebabkan oleh besar sampel yang kurang. Pada penelitian ini, sampel yang dibutuhkan adalah 9 ekor, namun karena keterbatasan dana, hanya digunakan 5 ekor tikus untuk tiap kelompok. Meskipun rerata persentase sel normal tertinggi didapatkan pada kelompok dengan ekstrak akar *A. indica*, hasil yang diperoleh dari sampel tidak dapat digeneralisasi dan diterapkan pada populasi terjangkau.

Hasil yang tidak bermakna dapat pula disebabkan oleh metode ligasi atau blokade arteri karotis komunis *sprague dawley* tidak adekuat dalam menimbulkan kondisi hipoksia. Pada penelitian lainnya, digunakan teknik tunggal atau kombinasi antara ligasi pembuluh darah seperti arteri serebri media atau paparan gas seperti oksigen dengan kadar yang rendah selama beberapa jam untuk menciptakan kondisi hipoksia-iskemia.¹⁹⁻²¹ Uji analisis gas darah tidak dilakukan sehingga variabel perancu berupa derajat hipoksia tidak dapat disingkirkan.

Berdasarkan area hipokampus, rerata persentase jumlah sel normal paling banyak ditemukan di area CA1 baik pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif, maupun kelompok yang mendapatkan ekstrak akar *A. indica*. Hal

itu bertentangan dengan teori yang menyatakan bahwa sel saraf regio CA1 merupakan area yang paling rentan dan CA3 merupakan area paling resisten.²² Dalam penelitian ini, diperoleh hasil bahwa girus dentatus lapisan dalam dan luar lebih rentan daripada CA3 dan CA3 lebih rentan daripada CA1 yang digambarkan oleh rerata persentase jumlah sel normal yang paling sedikit.

Girus dentatus merupakan bagian hipokampus yang memiliki sel punca (*stem cells*). Pada mamalia dewasa, sel punca hanya terdapat di zona subgranular girus dentatus dan zona subventrikular ventrikel lateral yang berarti kedua bagian otak itu memiliki kemampuan neurogenesis. Kemampuan neurogenesis pada girus dentatus didukung oleh kepadatan pembuluh darah dan pelepasan GABA serta NMDA yang meningkatkan proliferasi, migrasi, dan ketahanan dari sel yang baru.²³

Rerata persentase jumlah sel normal justru paling sedikit di area girus dentatus lapisan dalam dan luar. Hal tersebut mungkin disebabkan sel saraf piramidal CA3 menghambat ratusan sel granul girus dentatus melalui *mossy fiber* dan aktivitas neuron GABAergik.²³ Jika aktivitas neuron GABAergik menurun secara eksperimental, maka aktivitas sel granul akan meningkat.²⁴

Rerata persentase jumlah sel normal yang lebih sedikit di CA3 daripada CA1 dapat disebabkan oleh ligasi arteri karotis komunis bilateral tidak menimbulkan kondisi hipoksia, tetapi hanya hipoperfusi. Berdasarkan penelitian Kawaguchi *et al* yang menggunakan ligasi arteri karotis komunis untuk menciptakan hipoperfusi kronis pada tikus Wistar, jumlah sel normal di CA3 menurun signifikan dibandingkan kelompok dengan hipoksia kronis.²⁵ Kerusakan CA3 juga dapat terjadi saat pembuatan sediaan hipokampus karena sinaps CA3 lebih banyak terpotong dari pada CA1.²⁶ Dengan demikian, kerentanan CA3 dapat bervariasi pada tiap kondisi yaitu pada hipoperfusi kronis, jumlah sel normal di CA3 lebih sedikit daripada CA1.

Kesimpulan

Pemberian ekstrak akar *A. indica* dosis 500 mg/kgBB tidak berhubungan dengan perubahan inti sel saraf di area CA1, CA3, lapisan dalam dan lapisan luar girus dentatus hipokampus tikus *sprague dawley* pascahipoksia serebri. Meskipun demikian, ekstrak akar *A. indica* dosis 500 mg/kgBB memengaruhi rerata persentase jumlah sel normal di seluruh area hipo-kampus pascahipoksia secara kuantitatif.

Daftar Pustaka

1. Fauci AS, Kasper DL, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL, et al. Cerebrovascular diseases. Harrison's principles of internal medicine. 17th ed. USA: Mc.Graw-Hill; 2008.
2. Redon J. Stroke mortality and trends from 1990 to 2006 in 39 countries from Europe and Central Asia: implications for control of high blood pressure. European Heart Journal. 2011;1-8.
3. Martono H, Kuswardani RA. Strok dan penatalaksanaannya oleh internis. Dalam: Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiati S, editor. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Edisi ke-5. Jakarta: Interna Publishing; 2010.h.892-7.
4. Sembiring K. Prevalensi stroke di Indonesia [internet]. Diakses 29 Maret 2012. Diunduh dari: repository. usu.ac.id/bitstream/123456789/21463/6/pdf.
5. Jelic S. Hypoxia/hypoxemia [internet]. Diakses 30 Maret 2012. Diunduh dari: www.batnet.com.
6. National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Cerebral hypoxia [internet]. Diakses 29 Maret 2012. Diunduh dari: <http://www.ninds.nih.gov/disorders/anoxia/anoxia.htm>.
7. Raharjo H. Tanaman berkhasiat antioksidan. Jakarta: Penebar Swadaya; 2005.
8. Albert GA. Phytochemical investigations of plants suspected to cause the FTS of african elephants: heliotropium of alitonium forssk. Lausanne: Universile deLausanne; 2003.
9. Prass K. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. Am Heart Assoc. 2003;34:1981-86.
10. WHO. Traditional medicine [internet]. Diakses 5 Juni 2013. Diunduh dari: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>.
11. Orhan IE. Centella asiatica. Urban: from traditional medicine to modern medicine with neuroprotective potential. Evid Based Complement Alternat Med 2012.
12. Ibrahim N, Rahadian J, Suniarti DF. *Acalypha indica* root extract improved hippocampal cell viability and increased Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) in hypoxic condition. Med J Indones. 2012;3(21):141-6.
13. Kumar GP, Khanum F. Neuroprotective potential of phytochemicals. Pharma-cognosy Review. 2012;12(6);81-90.
14. Yolanda S, Bachtiar EW, Ibrahim N. Increased cell viability and proliferation in post-hypoxic hippocampal tissue culture treated with *Acalypha indica* root extract. Med J Indones. 2010;20:1-6.
15. Purwaningsih EH, Ibrahim N, Zain H, Tedjo A. Neuro-protection and neuro-therapy effects of *Acalypha indica* water extract ex vivo on musculus gastrocnemius frog. Makara Kesehatan. 2008;12:71-6.
16. Vauzour D, Vafeiadou K, Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Jeremy P.E. Spencer. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. Genes Nutr. 2008;3(3-4): 115-26.
17. Balakrishnan N, Srivastava M, Tiwari, P. Preliminary phytochemical analysis and DPPH free radical scavenging activity of *Trewia nudiflora*. Roots and leaves. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2013;16:1403-06.
18. Pannangrong W, Wattanathorn J, Muchimapura S, Tiamkao S, Tong-un T. Purple rice berry is neuroprotective and enhances cognition in a rat model of Alzheimer's disease. Journal of Medicinal Food. 2011;14(7-8):688-94.
19. Sharp FRI. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. NeuroRx. 2004;1(1):26-35.
20. Berger MM. Hypoxia induces late preconditioning in the rat heart in vivo. Anesthesiology. 2010;113(6):1351-60.
21. Li YX, Ding SJ, Xiao L, Guo W, Zhan Q. Desferoxamine preconditioning protects against cerebral ischemia in rats by inducing expressions of hypoxia inducible factor 1 alpha and erythro-poietin. NeurosciBull. 2008;24(2): 89-95.
22. Duvernoy HM. The human hippocampus: functional anatomy, vascularization, and serial sections with MRI. 3rd ed. Jerman: Springer; 2005.
23. Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions [internet]. Diakses 28 Mei 2013. Diunduh dari: neuroscience.jhu.edu/Ming11-Neuron-AdultNeurogenesis.pdf.
24. Charfman HE. The CA3 "back projection" to the dentate gyrus. Prog Brain Res. 2007;163:627-37.
25. Kawaguchi C. Regional vulnerability to chronic hypoxia and chronic hypo-perfusion in the rat brain. Pathophysiology. 2002;8:249-53.
26. Kreisman NR, Soliman S, Gozal D. Regional differences in hypoxic depolarization and swelling in hippocampal slices. JN Physiol. 2000; 83(2):1031-8