

ARTIKEL PENELITIAN

Uji Efek Antiinflamasi Kombinasi Astaxanthin dan Ekstrak Etanol 70% Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Hitung Jenis Neutrophil pada Tikus Putih Galur Wistar yang diberikan Karagenin

Sundari¹, Muhammad In'am Ilmiawan², Sari Rahmayanti³

1. Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak, Kalimantan Barat; 2. Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak, Kalimantan Barat; 3. Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak, Kalimantan Barat

Korespondensi: Sundari; sundarianddari@gmail.com; 089525207110

Abstrak

Tujuan: Mengetahui efek antiinflamasi dan dosis efektif kombinasi astaxanthin dan ekstrak daun sirsak terhadap hitung jenis neutrofil pada tikus putih galur wistar yang diberikan karagenin. **Metode:** Desain penelitian ini merupakan *true experimental* dengan *complete randomized design*. Penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus yang dibagi menjadi 5 kelompok. Kelompok 1 diberikan kombinasi astaxanthin 0,108 mg/hari dan ekstrak daun sirsak 400 mg/kgBB; kelompok 2 diberikan kombinasi astaxanthin 0,216 mg/hari dan ekstrak daun sirsak 400 mg/kgBB; kelompok 3 diberikan kombinasi astaxanthin 0,432 mg/hari dan ekstrak daun sirsak 400 mg/kgBB; kelompok 4 atau kontrol negatif diberikan CMC 0,5 mg/kgBB; dan kelompok 5 atau kontrol positif diberikan celecoxib 18 mg/kgBB; **Hasil:** Pada kelompok dosis 1, dosis 2 dan dosis 3 terjadi penurunan hitung jenis neutrofil yang signifikan (LSD <0,05) pada jam ke-8 dan jam ke-12 jika dibandingkan kelompok kontrol negatif; **Kesimpulan:** Kombinasi astaxanthin dan ekstrak daun sirsak memiliki efek antiinflamasi yang ditandai dengan penurunan rerata hitung jenis neutrofil. Dosis efektif terdapat pada kombinasi astaxanthin 0,108 mg/hari dan ekstrak daun sirsak 400 mg/kgBB. **Kata kunci:** Inflamasi; astaxanthin; ekstrak daun sirsak; neutrofil

Abstract

Objective: To determine the effect of anti-inflammatory and effective dose of combination of astaxanthin and soursop (*Annona muricata* L.) leaves extract on numbers of neutrophils count in wistar rats injected with carrageenan. **Method:** This study was true experimental study with complete randomized design. This study used 30 rats divided into 5 groups. Group 1 was given the combination of astaxanthin 0,108 mg/day and extract of soursop leaves 400 mg/kgBW; group 2 was given the combination of astaxanthin 0,216 mg/day and extract of soursop leaves 400 mg/kgBW; group 3 was given the combination of astaxanthin 0,432 mg/day and extract of soursop leaves 400 mg/kgBW; group 4 or negative control group was given CMC 0.5 mg/kgBW; and group 5 or positive control group was given celecoxib 18 mg / kgBW. **Results:** There were significant decreases of number of neutrophils count (LSD $p < 0,05$) on eighth hours and twelfth hours in group 1, group 2 and group 3 compared with negative control group. **Conclusions:** The combination of astaxanthin and soursop leaf extract has anti-

inflammatory effects which is hinted by decrease of numbers of neutrophils count. Effective dose is found in combination astaxanthin 0,108 mg/day and extract of soursop leaves 400 mg/kgBW.

Keywords: : *Inflammation; astaxanthin; soursop leaves extract, neutrophils*

PENDAHULUAN

Inflamasi merupakan respon protektif jaringan yang disebabkan oleh cedera atau pengrusakan jaringan yang berfungsi menghancurkan, mengurangi atau mengurung agen yang menyebabkan cedera maupun jaringan yang mengalami cedera.¹ Proses inflamasi dimulai setelah terjadinya jejas akibat stimulus yang bisa disebabkan oleh mikroorganisme, trauma mekanis, zat-zat kimia dan pengaruh fisika.²

Osteoarthritis (OA) merupakan salah satu kasus yang berkaitan dengan proses inflamasi yang sering ditemui di klinik. Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar tahun 2013, Indonesia memiliki persentase penderita penyakit sendi/rematik sebesar 11,9%.³ Prevalensi OA di dunia mencapai 17,1 juta.⁴ Diperoleh prevalensi OA lutut di Indonesia mencapai 15,5% pada pria dan 12,7% pada wanita.⁵

Obat anti inflamasi non-steroid (OAINS) merupakan obat yang digunakan penderita untuk mengontrol rasa sakit dan menekan proses inflamasi.⁶ OAINS bekerja dengan cara menghambat sintesis prostaglandin yang mana penghambatan tersebut tidak hanya terjadi pada prostaglandin yang bersifat patologis namun bersifat fisiologis. Hal tersebut menyebabkan efek samping berupa tukak lambung, hipertensi, analgesik nefropati, dan mengganggu fungsi platelet.⁷

Berdasarkan efek samping yang telah dikemukakan, dibutuhkan suatu alternatif OAINS yang memiliki efek samping minimal dan efektivitas yang maksimal. Astaxanthin merupakan antioksidan yang bekerja dengan menekan produksi *nitric oxide* dan mediator inflamasi. Selain itu mekanismenya sebagai antiinflamasi terjadi melalui penekanan I κ B Kinase dan

aktivasi *Nuclear Factor- κ B* yang selanjutnya menekan ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2) secara selektif dan menekan pembentukan *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) dan interleukin-1 β (IL-1 β) sehingga dapat mencegah terjadinya nekrosis sel.⁸ Sedangkan tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) terutama daunnya sebagai tanaman obat yang memiliki efek antinospesitif dan antiinflamasi dengan kandungan aktif yaitu *acetogenins* yang dilaporkan memiliki aktivitas sebagai *COX-2 inhibitor*.⁹ Kombinasi astaxanthin dan ekstrak daun sirsak diharapkan dapat meningkatkan efek antiinflamasi dan dimanfaatkan sebagai alternatif obat antiinflamasi yang memiliki efek sinergis.

METODE

Penelitian ini bersifat eksperimental (*Complete Randomized Design*) dengan menggunakan tikus putih jenis *Rattus norvegicus* yang sehat dengan berat badan 180-200 gram dan umur rata-rata tiga bulan. Penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus yang dibagi menjadi 5 kelompok uji yang terdiri dari kelompok dosis 1 (0,108 mg/hari astaxanthin dan 400 mg/kgBB ekstrak daun sirsak), dosis 2 (0,216 mg/hari astaxanthin dan 400 mg/kgBB ekstrak daun sirsak), dosis 3 (0,432 mg/hari astaxanthin dan 400 mg/kgBB ekstrak daun sirsak), kontrol negatif menggunakan *Carboxyl Methyl Cellulose* (CMC) 0,5% dan kontrol positif menggunakan celecoxib 18 mg/kgBB. Hewan uji diinduksi edema/inflamasi menggunakan karagenin 1% yang diinjeksikan pada subplantar kaki tikus.

Pengambilan sampel darah dilakukan pada ekor tikus dengan periode waktu pengambilan jam ke-0, jam ke-4, jam ke-8

dan jam ke-12. Selanjutnya dilakukan pembuatan sediaan apus darah tepi dengan pewarnaan Giemsa. Pengamatan hitung jenis neutrofil dilakukan menggunakan mikroskop pada perbesaran 100x. Metode dalam penghitungan menggunakan metode zig-zag per 100 sel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses ekstraksi pada daun sirsak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Pada skrining fitokimia ekstrak daun sirsak diperoleh hasil bahwa daun sirsak mengandung senyawa metabolit sekunder golongan fenol, flavonoid, tanin, steroid, alkaloid dan saponin.

Tabel 1. Perhitungan Jenis Neutrofil

Kelompok	Tikus	Hitung Jenis Neutrofil (%)			
		0	4	8	12
Dosis 1	1	15	33	20	20
	2	22	30	28	18
	3	21	34	25	23
	4	24	27	25	22
	5	23	21	17	20
	6	24	35	26	24
Dosis 2	1	22	32	23	21
	2	25	26	16	20
	3	25	24	20	22
	4	22	36	21	18
	5	18	27	26	25
	6	22	34	18	16
Dosis 3	1	19	36	17	15
	2	16	30	24	20
	3	21	39	18	25
	4	23	41	23	18
	5	20	31	23	18
	6	18	28	21	20
Kontrol Negatif	1	23	38	40	37
	2	27	42	35	30
	3	24	40	33	31
	4	22	38	24	16
	5	25	42	37	33

	6	22	39	39	32
	1	24	32	20	21
	2	22	26	25	27
Kontrol	3	21	24	18	23
Positif	4	26	37	32	27
	5	25	28	25	15
	6	23	40	38	25

Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok perlakuan yang terdiri dari kelompok dosis 1, dosis 2, dan dosis 3 yang diberikan kombinasi astaxanthin dan ekstrak daun sirsak serta terdapat kelompok kontrol negatif dan kontrol positif. Suspensi diberikan secara bergantian pada hewan uji menggunakan sonde lambung. Setelah 1 jam, pada subplantar kaki tikus disuntikkan karagenin untuk menyebabkan edema atau cedera sel.

Karagenin merupakan antigen yang menyebabkan terjadinya proses inflamasi yang akan merangsang pelepasan mediator inflamasi seperti histamin, serotonin, dan bradikinin.¹⁰ Respon inflamasi tersebut akan memicu infiltrasi lokal leukosit seperti neutrofil, makrofag maupun limfosit. Pada fase akhir, proses inflamasi yang terjadi melibatkan pelepasan prostaglandin terutama PGE1 dan PGE2 dengan cara meningkatkan permeabilitas vaskular yang menyebabkan edema pada lokasi injeksi karena protein-protein plasma bergerak menuju lokasi.¹⁰⁻¹³

Setiap kelompok dianggap mempunyai nilai hitung jenis neutrofil normal (*baseline*) pada hitung jenis neutrofil jam ke-0. Peningkatan hitung jenis neutrofil terjadi pada jam ke-4 yang mana pada setiap kelompok terjadi perbedaan yang signifikan jika dibandingkan dengan jam ke-0. Pada jam ke-8 terjadi penurunan hitung jenis neutrofil dan semakin mendekati *baseline* pada jam ke-12 untuk

semua kelompok perlakuan. Sehingga dapat disimpulkan pada jam ke-8 mulai terlihat efek antiinflamasi dan puncak penekanan neutrofil terjadi pada jam ke-12. Penurunan hitung jenis neutrofil pada kelompok dosis 1, dosis 2, dosis 3 dan kontrol positif pada jam ke-12 hampir mendekati bahkan mencapai nilai *baseline* pada masing-masing kelompok. Hal ini menunjukkan adanya proses penekanan inflamasi. Berbeda halnya pada kontrol negatif, yang mana penurunan hitung jenis neutrofil pada jam ke-8 dan jam ke-12 masih terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) apabila dibandingkan dengan jam ke-0 dan menunjukkan masih terjadinya inflamasi.

Berdasarkan nilai LSD pada kelompok perlakuan dosis 1, dosis 2 dan dosis 3 jika dibandingkan dengan kontrol positif maka ketiga kelompok tersebut memiliki efek antiinflamasi yang setara dengan kelompok kontrol positif. Hal tersebut ditunjukkan dengan tidak adanya perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$) dilihat pada jam ke-8 dan jam ke-12.

Hasil penelitian ini membuktikan efek yang dimiliki astaxanthin dan ekstrak daun sirsak sebagai antiinflamasi. Mekanisme antiinflamasi yang dimiliki oleh astaxanthin adalah melalui penghambatan produksi mediator inflamasi dari jalur penekanan $\text{Nf-}\kappa\text{B}$, menghambat produksi ROS dan selanjutnya menghambat produksi sitokin pro-inflamasi. Astaxanthin mampu menekan ekspresi NADPH Oksidase (NOX) 2 dan mengurangi kerusakan oksidatif DNA. Secara *in vitro* maupun *in vivo*, astaxanthin juga mampu menurunkan produksi *nitric oxide* (NO), aktivitas *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) di makrofag sehingga terjadi penghambatan jalur *cyclooxygenase* (COX) dan penurunan regulasi PGE_2 dan $\text{TNF-}\alpha$. Inflamasi yang

disebabkan oleh injeksi karagenin pada subplantar kaki tikus secara signifikan dapat dihambat dengan pemberian astaxanthin yang ditandai dengan adanya penurunan hitung jenis neutrofil.¹⁴⁻¹⁹

Demikian halnya dengan ekstrak daun sirsak yang memiliki efek antiinflamasi. Mekanisme yang terjadi pada penghambatan inflamasi adalah terjadinya efek penghambatan pada sintesis prostaglandin seperti PGE_2 dan $\text{PGF}_{2\alpha}$. Selain itu, terjadi pelemahan $\text{TNF-}\alpha$ dan ekspresi $\text{IL-1}\beta$ serta memiliki efek perlindungan terhadap stres oksidatif. Kandungan *annonaceous acetogenins* pada daun sirsak dilaporkan memiliki aktivitas sebagai COX-2 *inhibitor*.^{9,20,21}

Berdasarkan mekanisme kerja dari astaxanthin dan ekstrak daun sirsak yang memiliki efek sebagai antiinflamasi, hal tersebut memungkinkan keduanya dapat bekerja secara sinergis sebagai kombinasi obat antiinflamasi. Ketiga kelompok uji yang diintervensi dengan kombinasi astaxanthin dan ekstrak daun sirsak yaitu kelompok dosis 1, dosis 2 dan dosis 3 menunjukkan hasil yang tidak berbeda secara signifikan jika dibandingkan dengan kontrol positif. Kelompok dosis 1 sebagai kelompok dengan dosis paling rendah pada penelitian ini mampu memberikan efek sebagai antiinflamasi. Sehingga apabila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang menggunakan dosis astaxanthin tunggal (1,44 mg/hari), penelitian tersebut tidak lebih baik dari perlakuan pada kelompok dosis 1 pada penelitian ini dan menggunakan dosis astaxanthin yang lebih kecil.

SIMPULAN

Kombinasi astaxanthin dan ekstrak etanol 70% daun sirsak memiliki efek antiinflamasi yang ditandai dengan penurunan hitung jenis neutrofil dalam apusan darah tepi tikus putih galur wistar yang diberikan karagenin. Dosis efektif terdapat pada kombinasi astaxanthin dengan dosis 0,108 mg/hari dan ekstrak daun sirsak 400 mg/kgBB.

DUKUNGAN FINANSIAL (jika ada)

Comdev & *Outreaching* Universitas Tanjungpura (Bidikmisi)

DAFTAR PUSTAKA

1. Dorland WAN. Kamus saku kedokteran dorland. Edisi 28. Jakarta: EGC. 2014.
2. Corwin EJ. Pathophysiology. USA: Lippincott Williams & Wilhins. 2008.
3. Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS). Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI. 2013.
4. Cross M, Smith E, Hoy D, Nolte S, Ackerman I, Fransen M, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis.* 2014 Jul;73(7):1323–30.
5. Sudoyo, AW., Setiyohadi, B., Alwi, L., Simadibrata, M., Setiata, S. Buku ajar ilmu penyakit dalam. 5. Jilid 1. Jakarta: InternaPublishing. 2009.
6. Katzung, Betram G. Farmakologi dasar dan klinik. 10th ed. Jakarta: EGC. 2010.
7. Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih saya ucapkan kepada:

1. dr. Pandu Indra Bangsawan dan dr. Ita Armyanti selalu pembimbing akademik yang memberi masukan dan motivasi dalam penulisan.
2. dr. Virhan Novianry, M. Biomed dan dr. Mistika Zakiyah selaku penguji pertama dan kedua dalam menguji penulisan karya ilmiah ini pada sidang akhir.
3. dr. lit Fitrianingrum selaku pembimbing pertama dalam penulisan.

therapeutics; analgesic-antipyretic agents. L.L. Brunton, Ph.D. 2008.

8. Lee, S. J. et al. "Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I kappa β kinase-dependent NF-kappa β activation". *Journal Molecules and Cells.* 2003. 16(1): 97-105.
9. Wu T-Y, Yang IH, Tsai Y-T, et al. Isodesacetylurvaricin, an annonaceous acetogenin, specifically inhibits gene expression of cyclooxygenase-2. *Journal of Natural Products.* 2012. 75(4): 572-6.
10. Necas J, Bartosikova L. Carrageenan: a review. *Vet Med (Praha).* 2013.58:187–205.
11. Yamamoto, Y. and Richard B. G. Therapeutic potential of inhibition of the nf-kb pathway in the treatment of inflammation and cancer. *Journal clinical investation.* 2001. 107 (2): 135-142. Doi: 10.1172/JCI11914. Copyright, American Society For Clinical Investigation.

12. Hasanein, Nahed M. A. et al. Roles of interleukin-1 β (IL-1 β) and nitric oxide (NO) in the anti-inflammatory dynamics of acetylsalicylic acid against carrageenan induced paw oedema in mice. *Global Journal of Pharmacology*. 2008. 2 (1):11-19.
13. Oliveira C, et al. Effect of plant neutrofil elastase inhibitor on leucocyte migration, adhesion and cytokine in inflammatory conditions. *British Journal Pharmacology*. 2010. 161. 899-910.
14. Ambati, Ranga Rao, et al. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications. A Review. *Mar Drugs Journal*. 2014. 12: 128-152.
15. Wu H, Niu H, Shao A, Wu C, Dixon BJ, Zhang J, et al. Astaxanthin as a potential neuroprotective agent for neurological disease. *Mar Drugs*. 2015. 13:5750–66.
16. Kuedo Z, Sangsuriyawong A, Klaypradit W, Tipmancee V. Effects of astaxanthin from *litopenaeus vannamei* on carrageenan-induced edema and pain behavior in mice. *Molecules*. 2016. 21:1–14.
17. Yeh PT, Huang HW, Yang CM, Yang WS, Yang CH. Astaxanthin inhibits expression of retinal oxidative stress and inflammatory mediators in streptozotocin-induced diabetic rats. *Plos One*. 2016;11(1):1–20.
18. Kurashige, M. et al. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiol Chem Phys Med NMR*. 1990. 22(1):27-38.
19. Pandu Indra Bangsawan. Efek antiinflamasi astaxanthin terhadap volume edema dan gambaran ekspresi cox-2 dengan penggunaan parameter limfosit dan netrofil pada tikus putih dewasa galur wistar. Palembang: Universitas Sriwijaya. 2012.
20. deSousa OV, Vieira GD-V, dePinho JdJRG, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of *annona muricata* l. Leaves in animal models. *Int. J. Mol*. 2010. Sci 11: 2067-8.
21. Hamid, R.A.; Foong, C.P.; Ahmad, Z.; Hussain, M.K. Antinociceptive and anti-ulcerogenic activities of the ethanolic extract of *annona muricata* leaf. *Rev. Bras. Farmacogn*. 2012. 22, 630–641.