

EFEK EKSTRAK SAMBILOTO (*Andrographis Paniculata*) TERHADAP JUMLAH SEL INFLAMASI PADA MODEL PERIODONTITIS

Fauzia Nilam Orienty^{*}, Juni Handajani^{**}, Tetiana Haniastuti^{**}

^{*}Program Pascasarjana Ilmu Kedokteran Gigi, FKG Universitas Gadjah Mada

^{**}Bagian Biologi Rongga Mulut, FKG Universitas Gadjah Mada

KATA KUNCI

ekstrak sambiloto, sel inflamasi, periodontitis.

ABSTRAK

Periodontitis merupakan infeksi kronis pada jaringan periodontal yang disebabkan oleh interaksi antara bakteri periodonpatogen dengan sistem pertahanan tubuh. Antiinflamasi non steroid (AINS) adalah salah satu golongan obat yang digunakan pada kasus periodontitis. Konsumsi AINS dalam jangka waktu panjang memberikan efek samping seperti gangguan pada gastrointestinal. Sambiloto (*Andrographis paniculata*) merupakan tanaman obat yang mempunyai bahan aktif berupa *andrographolide* yang memiliki efek antiinflamasi dengan cara menghambat migrasi sel inflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efek ekstrak sambiloto terhadap jumlah sel inflamasi pada kasus periodontitis yang diinduksi pada tikus.

Penelitian ini menggunakan 64 tikus *Wistar* jantan. Periodontitis pada tikus diinduksi dengan cara pemasangan *silk ligature* pada daerah subgingiva gigi anterior rahang bawah selama 14 hari. Setelah 14 hari, ligasi dilepaskan dan tikus dari masing-masing kelompok diberi perlakuan ekstrak sambiloto 600 mg/kg BB (kelompok I), ekstrak sambiloto 900 mg/kg BB (kelompok II), aspirin (kelompok III) dan saline (kelompok IV) secara per oral. Tikus didekapitasi pada hari ke-1, -3, -5 dan -7 setelah perlakuan. Spesimen didekalsifikasi menggunakan EDTA 0,1M, ditanam pada parafin dan dilakukan pemotongan. Pengecatan hematoksilin eosin dilakukan untuk menghitung jumlah sel inflamasi.

Hasil uji Anava dua jalur menunjukkan terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antar kelompok, mengindikasikan bahwa ekstrak sambiloto berpengaruh terhadap jumlah infiltrasi sel inflamasi. Hasil uji LSD memperlihatkan bahwa ekstrak sambiloto 900 mg/kg BB lebih efektif dalam menurunkan jumlah sel netrofil dan makrofag dibandingkan dengan ekstrak sambiloto dosis 600 mg/kg BB, aspirin dan saline. Kesimpulan dari penelitian ini bahwa ekstrak sambiloto 900 mg/kg BB dapat menurunkan jumlah sel inflamasi pada tikus yang diinduksi periodontitis.

PENDAHULUAN

Periodontitis merupakan suatu inflamasi kronis yang mengenai jaringan periodontal disebabkan interaksi antara bakteri Gram negatif anaerob yaitu *Prevotella nigrescens*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*,

Fusobacterium nucleatum, *Campylobacter rectus* dan produknya berupa Lipopolisakarida (LPS) dengan sistem pertahanan tubuh.¹ Invasi bakteri dan produknya pada jaringan periodontal akan menstimulasi sel-sel inflamasi seperti sel epitel, sel netrofil, makrofag dan fibroblas untuk mensekresikan mediator inflamasi dan

enzim misalnya *interleukin* (IL)-1, IL-6, *prostaglandin* (PGE)-2, *tumor necrosis factor* (TNF)- , *matrix metalloproteinases* (MMP) dalam jumlah banyak yang akan mempengaruhi keparahan dari kondisi periodontitis.²

Obat antiinflamasi yang sering digunakan dalam pengobatan periodontitis berasal dari golongan nonsteroid (AINS) seperti aspirin, ibuprofen dan indometasin. Konsumsi dari obat antiinflamasi golongan nonsteroid dapat menyebabkan iritasi gastrointestinal, hemoragik, gangguan fungsi hati dan ginjal.² Konsumsi rutin aspirin 2 tablet (325 mg)/minggu dapat menyebabkan iritasi pada gastrointestinal.³ Penelitian yang dilakukan oleh Indraswari dkk. (2004) menunjukkan terdapatnya pendarahan pada lambung tikus setelah 8 jam pemberian oral 30 mg/kg BB indometasin.⁴

Sambiloto (*Andrographis paniculata*) merupakan tanaman yang telah lama digunakan sebagai obat tradisional. Tumbuhan ini dapat ditemukan di India, Cina, Hong Kong, Philipina, Indonesia dan Thailand. Secara tradisional tanaman ini biasa digunakan untuk menurunkan demam, mengobati sakit perut, kencing manis, menjaga fungsi hati dan menyembuhkan luka. Komponen aktif utama dari sambiloto yang berperan sebagai antiinflamasi adalah *andrographolide* yang mempunyai rumus kimia $[C_{20}H_{30}O_5; (3-[2-\{decahydro-6-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-5,8-dimethyl-2-methylene-1-$

*naphthalenyl}ethylidene]dihydro-4hydroxy-2(3H)-furanone) yang paling banyak ditemukan pada bagian daun.^{5,6} Uji farmakokinetik menunjukkan bahwa kandungan *andrographolide* sangat cepat diserap dan dapat dimetabolisme oleh tikus serta manusia. Pemberian 20 mg ekstrak sambiloto secara peroral dapat diabsorpsi dan ditemukan dalam darah dalam waktu 2 jam.⁷ Hasil penelitian Jarukamjorn dan Nemoto. (2011) menunjukkan bahwa *andrographolide* dapat menghambat adhesi netrofil dengan cara menekan upregulasi dari *Macrophage-1 antigen* (Mac-1).⁶ *Andrographolide* juga dapat menghambat produksi *macrophage inflammatory protein* (MIP)-2 pada makrofag Raw 264,7 yang distimulasi dengan LPS/INF- dan pada peritoneal makrofag tikus yang diinduksi *endotoxemia*.⁸ Hasil penelitian Evacuasiy dan Soebiantoro (2000) memperlihatkan bahwa tikus yang diberi ekstrak sambiloto secara per oral dengan dosis 900 mg/kg efektif menghambat udem pada kaki tikus yang diinduksi dengan karagenin lambda 1%.⁹*

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji efek ekstrak sambiloto sebagai alternatif bahan antiinflamasi terhadap jumlah sel inflamasi pada kasus periodontitis.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan utama yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah daun sambiloto yang didapat dari daerah Jetis Sleman Yogyakarta,

aspirin (PT. Brataco, Indonesia), Saline (PT. Widatara bhakti, Indonesia) dan hewan coba tikus *Wistar* jantan umur 2 bulan dengan berat 175-200 gram yang didapat dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Unit IV Universitas Gadjah Mada.

Prosedur Penelitian

1. Pembuatan ekstrak sambiloto

Tanaman sambiloto diidentifikasi di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Daun sambiloto seberat 500 gram yang telah terkumpul dibersihkan, kemudian dirajang kecil-kecil dan dikeringkan. Daun sambiloto yang telah kering digiling hingga menjadi serbuk simplisia. Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan metode perkolasi menggunakan pelarut etanol 96%. Serbuk simplisia dibasahi dengan etanol dan dimasukkan ke dalam bejana tertutup selama 3 jam. Selanjutnya simplisia dipindahkan ke dalam tabung perkolator yang sebelumnya telah dilapisi dengan kertas saring yang telah dibasahi dengan etanol, kemudian etanol dimasukkan kedalam perkolator secara perlahan. Perkolator ditutup dan dibiarkan selama 24 jam, cairan dibiarkan menetes dengan kecepatan 1 ml/menit. Hasil dari perkolasi diuapkan diatas *waterbath* sehingga diperoleh ekstrak kental sambiloto seberat 90,93 gram. Untuk mempermudah pemberian ekstrak secara per oral kepada tikus, ekstrak

sambiloto dosis 600 mg/kg BB dan 900 mg/kg BB dilarutkan dengan 1 ml akuades.

2. Induksi Periodontitis

Sebelum dilakukan induksi periodontitis, tikus dianestesi menggunakan ketamine HCl secara intramuskuler 0,2 ml/200gr BB. Induksi periodontitis pada tikus dilakukan dengan cara pemasangan ligatur dari sutra (*silk ligature*) ukuran 3,0 pada bagian bawah gingiva tepi gigi insisivus anterior rahang bawah. Ligatur diperiksa sampai dengan hari ke-14 setelah pemasangan, jika ada ligasi yang lepas atau hilang segera diganti dengan yang baru. Pada hari ke-14 ligasi dilepaskan dan masing-masing kelompok diberikan ekstrak sambiloto, aspirin dan saline.

3. Pelaksanaan penelitian

Tikus dibagi ke dalam 4 kelompok yaitu kelompok yang diberi ekstrak sambiloto 600 mg/kg BB dan 900 mg/kg BB, aspirin 45 mg/kg BB sebagai kontrol positif (+) dan saline sebagai kontrol negatif (-), secara per oral menggunakan *oral gavage* sebanyak 3 kali sehari. Tikus dikorbankan pada hari ke-1,-3,-5 dan -7 setelah perlakuan. *Eutanasia* pada hewan coba dilakukan dengan anestesi over dosis ketamine HCl secara intramuskular, selanjutnya dilakukan dekapitasi. Pengambilan rahang bawah dilakukan untuk pembuatan sediaan histologis, selanjutnya dilakukan pewarnaan hematoxilin eosin (HE). Pengamatan dilakukan pada daerah dasar sulkus gingiva

di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali kemudian dilakukan penghitungan jumlah sel netrofil dan makrofag.

4. Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan jumlah sel inflamasi merupakan data berskala rasio. Data yang telah didapatkan dilakukan uji normalitas (*Kolmogorov-Smirnov Test*) dan uji homogenitas (*Levene's Test*). Selanjutnya data diuji secara statistik menggunakan *Two Way Anova* untuk membandingkan jumlah sel inflamasi kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Selanjutnya dilakukan uji LSD (*Least Significance Different*) untuk mengetahui kemaknaan perbedaan jumlah sel inflamasi antara masing-masing kelompok pada setiap hari pengamatan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

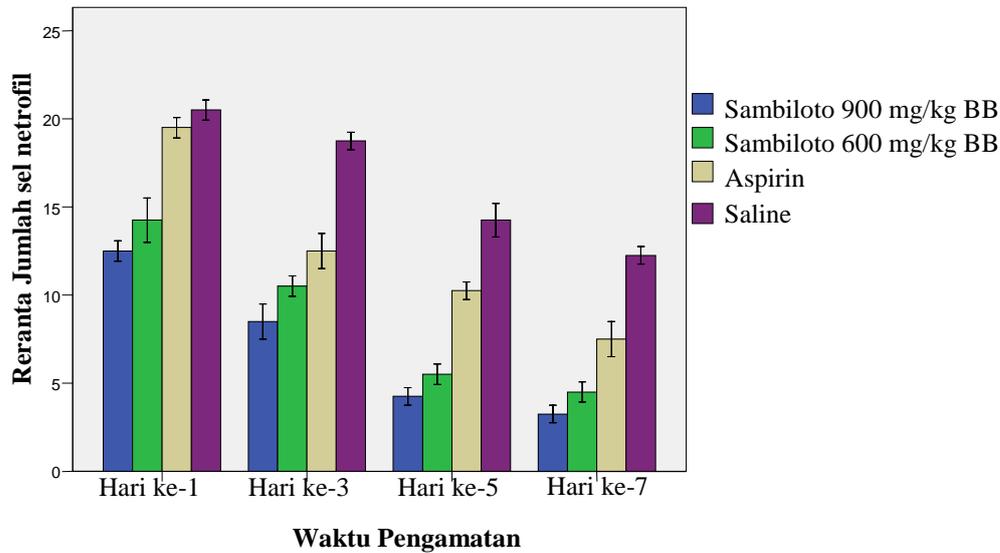
Hasil pengamatan secara klinis setelah dilakukan ligasi selama 14 hari, tampak warna gingiva berubah menjadi kemerahan, terjadi resesi gingiva, udem serta perubahan kontur gingiva. Secara radiografis terlihat adanya kerusakan tulang alveolar pada area apoksimal (Gambar 1). Hal tersebut menunjukkan bahwa pemasangan ligasi selama 14 hari dapat menyebabkan terjadinya periodontitis pada tikus.

Kondisi periodontitis ini dapat terjadi karena pemasangan ligasi dapat memfasilitasi

terjadinya akumulasi bakteri plak secara lokal yang dapat menyebabkan terjadinya inflamasi gingiva serta kerusakan tulang alveolar pada tikus.¹⁰ Penelitian oleh Duarte dkk. (2009) melaporkan bahwa pada tikus periodontitis yang diinduksi menggunakan ligasi dapat ditemukan bakteri *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Prevolla nigrescens*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis* dan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.¹¹ Invasi bakteri tersebut akan menyebabkan pelepasan mediator inflamasi seperti IL-1, PGE-2 yang dapat melakukan *recruitment* terhadap osteoklas sehingga memediasi destruksi tulang alveolar dan MMP-8 yang dapat merusak matrik ekstraselular dari gingiva, kehilangan perlekatan serat kolagen dan kerusakan ligamen periodontal.²

Jumlah sel netrofil

Hasil penelitian menunjukkan jumlah sel netrofil pada kelompok tikus periodontitis yang diberi ekstrak sambilito 600 mg/kg BB, 900 mg/kg BB, aspirin dan saline mengalami penurunan seiring bertambahnya hari pengamatan. Kelompok tikus yang diberi ekstrak sambilito 900 mg/kg BB memperlihatkan jumlah infiltrasi sel netrofil paling sedikit dibandingkan kelompok lainnya.



Gambar 1. Rerata dan simpangan baku jumlah sel netrofil pada tikus periodontitis yang diberi perlakuan

Hasil Anava dua jalur memperlihatkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$), hal ini berarti bahwa hari pengamatan, kelompok perlakuan dan interaksi antara hari pengamatan dan kelompok perlakuan berpengaruh signifikan terhadap jumlah infiltrasi sel netrofil. Hasil uji LSD menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$) disetiap hari pengamatan kecuali pada kelompok yang diberi aspirin dibandingkan kelompok yang diberi saline pada hari ke-1 pengamatan. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa pemberian ekstrak sambiloto 900 mg/kg BB berpengaruh terhadap penurunan jumlah infiltrasi sel netrofil lebih baik jika dibandingkan dengan 600 mg/kg BB, aspirin dan saline. Pemberian aspirin dan saline memperlihatkan efek yang sama terhadap penurunan jumlah sel inflamasi pada hari ke-1 pengamatan dan aspirin mulai memperlihatkan pengaruh yang

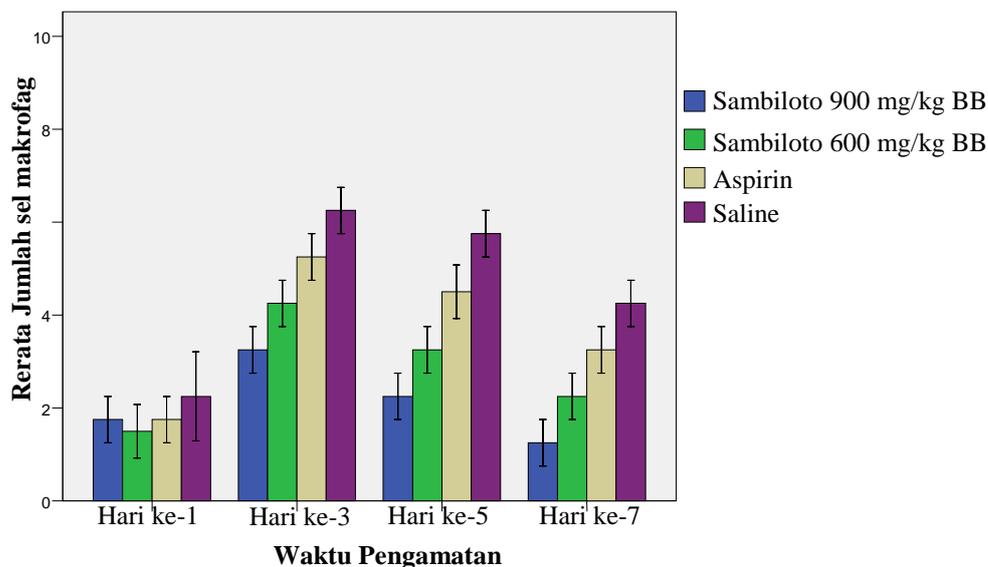
lebih baik dalam menurunkan jumlah sel netrofil dibandingkan dengan saline pada hari ke-3 pengamatan.

Hasil penghitungan terhadap jumlah sel netrofil pada hari ke-1 pengamatan, memperlihatkan infiltrasi sel netrofil ditemukan dalam jumlah yang banyak pada seluruh kelompok perlakuan. Hal ini karena invasi bakteri dan LPS pada jaringan, akan menyebabkan sel epitel sulkus mensekresikan sitokin yang berperan dalam proses *recruitment* sel netrofil, selanjutnya sel netrofil akan bermigrasi ke jaringan dan melakukan proses fagositosis terhadap benda asing.² Penelitian yang dilakukan oleh Wang dkk. (2007) menyatakan bahwa kandungan *andrographolide* dari sambiloto mampu menekan ekspresi dari molekul adhesi E-selektin dan VCAM pada model arterial restenosis.¹² Hasil penelitian Yu dkk. (2010)

menyatakan bahwa kandungan *andrographolide* dapat menghambat ekspresi ICAM pada *endothelial hybrid cell line* EA.hy926 yang diinduksi oleh TNF- α .¹³ Penelitian Hidalgo dkk. (2013) menyatakan bahwa kandungan *andrographolide* mampu menghambat kerja dari MIP-2, Mac-1 dan IL-8 pada model rematoid artritis. Kemampuan *andrographolide* dalam menghambat kerja dari molekul adhesi dan kemokin berpengaruh terhadap penurunan jumlah migrasi sel netrofil ke jaringan.¹⁴ Hal ini menyebabkan jumlah infiltrasi sel netrofil pada kelompok yang diberi ekstrak sambilito lebih sedikit dibandingkan kelompok yang diberi aspirin dan saline.

Jumlah sel makrofag

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa infiltrasi sel makrofag mengalami peningkatan pada hari ke-3 pengamatan diseluruh kelompok tikus periodontitis. Hal ini karena pada hari ke-1 mekanisme pertahanan tubuh lebih didominasi oleh sel netrofil, selanjutnya netrofil akan mengeluarkan sitokin (IL-1 dan TNF- α) yang bersifat kemoatraktan terhadap makrofag. Monosit akan bermigrasi ke jaringan dan berdiferensiasi menjadi makrofag untuk menggantikan tugas netrofil dalam memfagositosis patogen. Proses migrasi makrofag membutuhkan waktu 48-96 jam.¹⁵ Mekanisme tersebut diduga menjadi penyebab pada penelitian ini jumlah sel makrofag baru mengalami peningkatan pada hari ke-3 pengamatan.



Gambar 2. Rerata dan simpangan baku jumlah sel makrofag pada tikus periodontitis yang diberi perlakuan.

Hasil uji Anava dua jalur memperlihatkan terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$). Hal ini berarti bahwa hari pengamatan, kelompok perlakuan dan interaksi antara hari pengamatan dan kelompok perlakuan berpengaruh signifikan terhadap jumlah infiltrasi sel makrofag. Hasil uji LSD menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna ($p > 0,05$) pada kelompok perlakuan di hari ke-1 pengamatan, yang mengindikasikan bahwa pemberian ekstrak sambiloto 600 mg/kg BB, 900 mg/kg BB, aspirin dan saline memiliki pengaruh yang sama terhadap jumlah infiltrasi sel makrofag pada hari ke-1 pengamatan. Seluruh kelompok mulai menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$) pada hari ke-3 hingga hari ke-7 pengamatan. Hasil tersebut mengindikasikan pemberian ekstrak 900 mg/kg BB berpengaruh terhadap penurunan jumlah infiltrasi sel makrofag jika dibandingkan dengan kelompok yang diberi sambiloto 600 mg/kg BB, aspirin dan saline pada hari ke-3, ke-5 dan ke-7 pengamatan. Hal ini karena kandungan *andrographolide* dari sambiloto selain memiliki kemampuan menghambat kerja dari molekul adhesi, juga mampu menekan migrasi kemotaktik makrofag terhadap kemoaktakan seperti *complement 5a (C5a)* dengan cara menghambat fosforilasi *mitogen-activated protein kinase (MEK) 1/2* dan *mitogenactivated protein kinase (MAPK) p4/p44 (extracellular signalrelated kinase (ERK) 1/2*.¹⁶

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak sambiloto 900 mg/kg BB dapat menurunkan jumlah infiltrasi sel inflamasi pada tikus yang diinduksi periodontitis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Carranza, F., Newman, M., Takei, H dan Klokkevold, P., 2006, *Clinical Periodontology, Tenth Edition*, NewYork : Sauders, hal. 47, 68-72, 156, 213, 239, 259, 628.
2. Gehrig., S.J dan WillmaN, D.E., 2011, *Foundations of Periodontics for the Dental Hygienist, Third Edition*, Philadelphia : Wolters Kluwer, hal. 141-143, 168,212.
3. Huang, E.S., Strate, L. L., Ho, W.W., Lee, S.S., Chan, A.T., 2011, "Long Term Use of Aspirin and the Risk of Gastrointestinal Bleeding", *Am. J.*, 124 (5): 426-433.
4. Indraswar, C.I., Kalsum, U., Sudjari., 2004, "Pengaruh Pemberian Temulawak pada Lambung Tikus yang Mengalami Ulkus Peptikum Akibat Induksi Indometasin", *Kedok Brawijaya. J.*, 10 (2): 96-100.
5. Widyawati, T., 2007, "Aspek Farmakologi Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees)", *Majalah Kedokteran Nusantara.*, 40(3) : 216-222.
6. Jarukamjorn, J dan Nemoto, N., 2011, "Pharmacological Aspects of *Andrographis paniculata* on Health and Its Major Diterpenoid Constituent *Andrographolide*", *J. Health Sci.*, 54(4): 370-381.
7. Panossian, A., Ovhnissyan, A., Mamikonyan, G., 2000, "Pharmakokinetic and Oral Bioavallability of *Andrographolide* From *Andrographis paniculata* Fixed Combination Kan Jong in Rats and Human", *Phytomedicine.*, 7(5) : 351-364.
8. Chao, W.W., Kuo, Y.H., Hsie, S.L dan Lin, B.F., 2009, "Inhibitory Effects of Ethyl Acetate Extract of *Andrographis paniculata* on NF- B Trans-Activation Activity and LPS-Induced Acute Inflammation In Mice Original Article", *Hindawi Publishing.*, eCAM. J, Vol 2011.
9. Evacuaslany, E., Soebiantoro, F., 2000,"Pemanfaatan Ekstrak *Andrographis paniculata* dan *Aloe Vera L* Sebagai Antiinflamasi", *Makalah Kongres Nasional*

- dan Ikatan Farmakologi Indonesia. Hal :15-18.
10. Abe, T., Hajishengallis, G., "Optimization of the Ligature Induced Periodontitis Model in Mice", *Immunol. Methods. J.*, 394(0): 49-54.
 11. Duarte, P.M., Tezolin, K.R., Figueiredo, L.C., Feres, M., Bostos, M.F., 2009, "Microbial Profile of Ligature-Induced Periodontitis in Rats", *Oral Biomol. J.*, 55(2): 142-147.
 12. Wang, YJ., Wang, JT., Fan, QF., Geng, JG., 2007, "Andrographolide Inhibit NF- B Activation and Attenuates Neointimal Hyperplasia in Arterial Restenosis ", *Cell Research.*, 17: 933-941.
 13. Yu, AL., Lu, CY., Wang, TS., Tsai, CW., Liu, KL., Cheng, YP., Chang, HC., Lii, CK., Chen , HW., 2010, "Induction of Heme Oxygenase 1 and Inhibition of Tumor Necrosis Factor - Induced Intercellular Adhesion Molecule Expression by Andrographolide in EA.hy926 Cells", *Agric Food Chem. J.*, 58 (13) : 7641-7648.
 14. Hidalgo, M.A., Hancke, J.L., Bertoglio, J.L., Burgos, R.A., Andrographolide a New Potential Drug for the Long Term Treatment of Rheumatoid Arthritis Disease. *Innovative Rheumatology*, Chapter 11, 2013.
 15. Robbins, S dan Kumar, V., 2008, *Basic Pathology, Eighth Edition*, Philadelphia : Saunders, hal. 26.