

EKSTRAK DAUN COCOR BEBEK (*Kalanchoe pinnata*) UNTUK TERAPI PREVENTIF LUPUS PADA MENCIT YANG DIINDUKSI DENGAN 2,6,10,14 TETRAMETHYLPENTADECANE

Niken Indriyanti, Afrillia Nuryanti Garmana

Kelompok Keilmuan Farmakologi-Farmasi Klinik

Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung

email : niken.indriyanti@yahoo.co.id

ABSTRACT

*Cocor bebek Plants (*Kalanchoe pinnata*) has been observed to have a potent immunosuppressant compounds in BALB/c mice with Delayed Type Hypersensitivity test (DTH). Compounds are efficacious immunosuppression can be used for treatment of autoimmune diseases such as lupus. The purpose of this study was knowing the class of compounds in leaf extracts cocor bebek and test whether the extract can prevent the occurrence of lupus in test animals. Methods: In this study the identification of classes of compounds present in Cocor bebek leaf extracts and testing immunosuppression activities from test animals BALB/c mice induced lupus using 2,6,10,14 tetramethylpentadecane (TMPD). Parameters measured lupus glomerulonephritis which was known by the presence of proteinuria using a test strip supported by data on changes in weight. Results: Extracts of cocor bebek leaves positive contain tannins, flavonoids, saponins and steroid / triterpene. Mice given the extract of Cocor bebek leaves every day until the 3rd month after not having induced proteinuria, while untreated mice had proteinuria up to +2 (proteinuria levels > 30 mg / dL).*

Key words : *Cocor bebek, BALB/c mice, lupus, TMPD, glomerulonephritis*

ABSTRAK

Tanaman cocor bebek (*Kalanchoe pinnata*) telah diteliti memiliki senyawa yang berkhasiat immunosupresan pada mencit BALB/c dengan uji Delayed Type Hypersensitivity (DTH). Senyawa yang berkhasiat immunosupresan dapat digunakan untuk penanganan penyakit autoimun, misalnya lupus. Tujuan penelitian ini adalah Mengetahui golongan senyawa dalam ekstrak daun cocor bebek dan menguji apakah ekstrak tersebut dapat mencegah terjadinya lupus pada hewan uji. Metode : Pada penelitian ini dilakukan identifikasi golongan senyawa yang ada dalam ekstrak daun cocor bebek dan pengujian aktivitas immunosupresannya terhadap hewan uji mencit BALB/c yang diinduksi lupus menggunakan 2,6,10,14 tetramethylpentadecane (TMPD). Parameter lupus yang diukur adalah glomerulonefritis yang diketahui dengan adanya proteinuria menggunakan strip test didukung dengan data perubahan berat badan. Hasil : Ekstrak daun cocor bebek positif mengandung tanin, flavonoid, saponin dan steroid/triterpen. Mencit yang diberi ekstrak daun cocor bebek setiap hari sampai bulan ke-3 setelah diinduksi tidak mengalami proteinuria, sedangkan mencit yang tidak ditreatmen mengalami proteinuria sampai +2 (kadar proteinuria >30 mg/dL).

Kata kunci : *cocor bebek, mencit BALB/c, lupus, TMPD, glomerulonefritis.*

PENDAHULUAN

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) atau lupus adalah penyakit autoimun. Penyakit autoimun terjadi ketika sistem imun bereaksi melawan jaringan dan sel normal pada tubuh. Ada sebelas kriteria diagnosis SLE yaitu *malar rash, discoid rash, photosensitivity, oral ulcers, arthritis, serositis, renal disorder, neurologic disorder, hematologic disorder, immunologic disorder* dan *antinuclear antibodies* (ANA). Seseorang dikatakan terkena sindrom lupus jika mengalami ≥ 4 kriteria tersebut [4]. Penelitian praklinik kandidat obat baru untuk SLE menggunakan model hewan memerlukan hewan uji yang dapat mengalami semua gejala atau beberapa gejala klinik seperti pada manusia yang mengalami SLE. *New Zealand Black/White* (NZB/W) mice yang merupakan model standar lupus memenuhi tiga kriteria yaitu glomerulonefritis, anti-nuclear antibodies (ANA), dan antibodi anti-dsDNA. Sedangkan model Tetramethylpentadecane (TMPD)-treated BALB/c mice memenuhi beberapa kriteria yaitu; glomerulonefritis (proteinuria 3-4+), arthritis, ANA dan autoantibodi lupus misalnya anti-dsDNA dan anti-Sm [7,8]. Produk TMPD yang telah banyak diteliti adalah Pristane (Sigma Aldrich).

Penelitian kandidat obat lupus dari bahan alam Indonesia sangat menarik untuk dilakukan karena masih terbatasnya obat-obat yang dapat digunakan untuk penderita lupus dan orang yang beresiko terkena lupus.

Senyawa penginduksi lupus yang akan digunakan pada penelitian ini yang adalah 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (TMPD). Hidrokarbon ini telah diteliti dan terbukti menimbulkan *lupus-like disease* pada mencit BALB/c. Model ini sama baiknya dengan model standar lupus, yaitu NZB/W

mice. Hasil penelitian efek induksi menggunakan TMPD pada hewan uji betina lebih dominan (rasio betina : jantan $\sim 9 : 1$), mirip dengan rasio SLE pada manusia (Reeves *et al*, 2009). Mekanisme kerja TMPD adalah dapat memecah *immune tolerance* dengan peningkatan kematian sel secara terprogram. Model ini telah digunakan di *National Institute of Health* (NIH) [5].

Tanaman yang diteliti adalah cocor bebek. Ekstrak daun cocor bebek pada penelitian sebelumnya [1,2] menunjukkan aktivitas yang signifikan terhadap penghambatan respon imun yang dimediasi oleh sel dan respon imun humoral pada mencit. Senyawa kimia yang ada pada ekstrak etanol daun cocor bebek telah diteliti. Beberapa diantaranya adalah bufadienolides, terpenoid, flavonoid dan 1-octen-3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -glucopyranoside [1].

Sampai saat ini obat lupus sebagai imunosupresan masih terbatas pada obat sintetik meliputi kortikosteroid, azathioprin dan sebagainya. Indonesia kaya akan bahan alam yang salah satunya dapat dikembangkan untuk lupus.

Tujuan dari penelitian ini adalah :

(a). Mengetahui golongan senyawa yang ada dalam ekstrak daun cocor bebek. (b). Membuktikan apakah ekstrak daun cocor bebek dapat digunakan untuk mencegah terjadinya lupus pada mencit yang diinduksi lupus.

BAHAN DAN ALAT

Daun cocor bebek segar, aquadest, pristan, CMC, reagen untuk penapisan fitokimia, kain batis, blender, pengering beku, strip test Verify[®], mencit BALB/c betina, pakan dan kandang, sonde oral mencit, mortar,

stamper, gelas ukur, gelas piala, labu Erlenmeyer, tabung reaksi dan pipet tetes.

METODE

Empat kilogram daun cocor bebek segar disortasi basah (tangkai daun dan bagian pucuk dibuang) kemudian dicuci. Setiap 300 gram daun diblender menggunakan 150 mL aquadest kemudian disaring dua kali menggunakan kain batis empat lapis. Filtrat dikeringbekukan selama 24 jam sampai diperoleh filtrat kering berbentuk serbuk.

Selanjutnya dilakukan karakterisasi ekstrak dengan pengujian penetapan kadar air, kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol. Dilakukan pula penapisan fitokimia yang meliputi pemeriksaan terhadap golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, kuinon, tanin dan steroid/triterpenoid.

Hewan uji mencit diinduksi saat berusia 7 minggu. Hewan uji dikelompokkan menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (normal), kelompok preventif, dan kelompok kontrol positif (sakit). Kontrol normal yaitu mencit BALB/c tanpa diinduksi dan tanpa perlakuan ekstrak. Kelompok preventif adalah mencit BALB/c yang telah diinduksi lupus dengan TMPD dan diberi ekstrak uji dengan dosis 4 mg per 20 g berat badan sejak diinduksi. Kelompok sakit adalah kelompok yang diinduksi lupus dan tidak diberi ekstrak uji.

Hewan uji diinduksi lupus menggunakan TMPD yang diinjeksikan sekali sebanyak 0,5 mL per ekor secara intraperitoneal. Kelompok preventif diberi ekstrak daun cocor bebek secara oral sekali sehari sampai 3 bulan setelah induksi. Setiap 30 hari dilakukan pemeriksaan urin meliputi.

pemeriksaan proteinuria menggunakan *strip test Verify*[®]. Perubahan berat badan diukur untuk mengetahui gambaran kondisi kesehatan hewan uji.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen ekstrak daun cocor bebek adalah 1,95% b/b; kadar air 9% v/b, kadar sari larut air 54,34% b/b dan kadar sari larut etanol 3,57% b/b.

Golongan senyawa flavonoid, saponin, tanin, steroid/triterpen terbukti ada dalam ekstrak daun cocor bebek.

Selama perlakuan kelompok preventif, pengamatan terus dilakukan terhadap kondisi hewan uji. Beberapa hewan uji mengalami penurunan berat badan. Penurunan berat ini disertai dengan sesak dan kembung. Sebagian hewan yang mengalaminya ada yang bisa pulih ke kondisi normal, tetapi sebagian menjadi parah dan mati. Penelusuran penyebab kematian hewan uji dilakukan dengan cara membedah hewan yang telah mati dan dilakukan pengamatan organ; morfologi, kelainan organ dan indeks organ.

Tabel 1. Indeks organ hewan uji yang mati

No.	Indeks organ		
	Hati	Ginjal	Paru-paru
1.	4,44%	1,36%	
2.	4,6%	1,51%	
3.	3,93%	1,39%	1,20%

Pengamatan organ : usus menggelembung berisi gas dan sedikit cairan berwarna kuning terutama di usus besar. Lambung menyusut, lengket, kekuningan. Warna hati lebih gelap, limpa hancur.

Semua mencit yang mati adalah bagian dari kelompok preventif. Ada 2 kemungkinan penyebabnya, yaitu :

1. TMPD menginduksi *ascites* pada mencit [6] setelah beberapa lama mengalami sesak

nafas yang diduga disebabkan oleh inflamasi paru-paru.

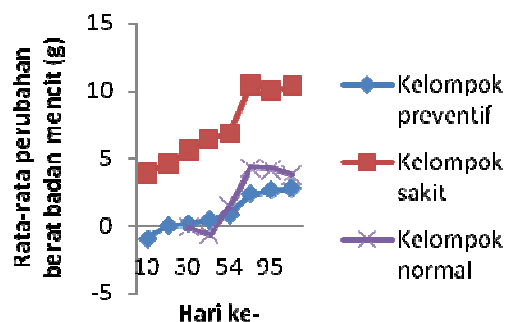
2. Efek immunosupresan ekstrak daun cocor bebek telah muncul sehingga mencit lebih peka terhadap efek TMPD.



Gambar 1. Kerusakan organ mencit

Mencit tersebut diduga mengalami *lung inflammation* berdasarkan referensi jurnal [3] yang meneliti mengenai *pulmonary inflammation* pada hewan lupus yang diinduksi dengan TMPD. Pada mencit yang diambil paru-parunya, paru-paru terlihat normal dan tidak ada bronkokonstriksi. Gangguan organ pada kelompok preventif menguatkan dugaan adanya efek immunosupresan ekstrak daun cocor bebek pada mencit lupus. Hampir semua mencit pada kelompok preventif mengalami sesak dan kerusakan organ perut sehingga menjadi kembung diduga kuat karena sistem imun mencit menurun oleh pemberian ekstrak daun cocor bebek yang terus menerus sehingga mencit lebih peka terhadap efek TMPD. Empat dari 11 ekor mencit kelompok preventif mati karena adanya gas yang berlebihan di ususnya, tetapi 7 ekor lainnya bisa bertahan dan sembuh dengan diberi ekstrak daun cocor bebek setiap hari meskipun dalam keadaan sesak atau kembung. Dengan perlakuan tersebut mencit kembali seperti keadaan sebelum terkena sesak atau kembung.

Pengukuran perubahan berat badan mencit dari berat awal dimaksudkan untuk melihat gambaran kondisi kesehatan mencit normal dibandingkan dengan mencit yang diberi perlakuan. Berikut ini tabel dan grafik perubahan berat badan hewan uji yang diukur selama 104 hari.

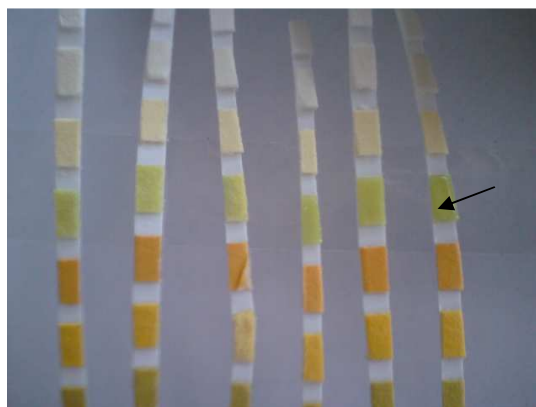


Gambar 2. Grafik perubahan berat badan mencit

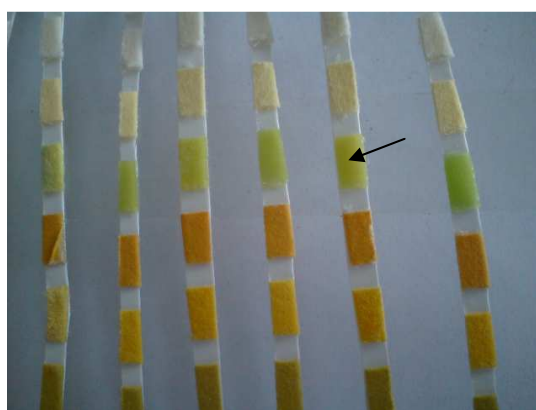
Dari grafik di atas, didapatkan profil peningkatan berat badan yang cukup stabil. Pada awal pengukuran, pembesaran tidak begitu terlihat, hanya terkesan gemuk saja. Tetapi pada hari ke 104 setelah induksi, pembesaran perut terlihat seperti mencit hamil, dan mudah dibedakan dengan kelompok normal. Reeves (2009) menjelaskan adanya lipogranuloma pada dinding peritoneal mencit BALB/c yang diinduksi lupus menggunakan TMPD.

Pembesaran yang sama terjadi pula pada kelompok preventif, tetapi perlakuan menggunakan ekstrak daun cocor bebek sehari sekali dengan dosis 4 mg per 20 g berat badan menyebabkan perubahan berat badan yang mendekati normal.

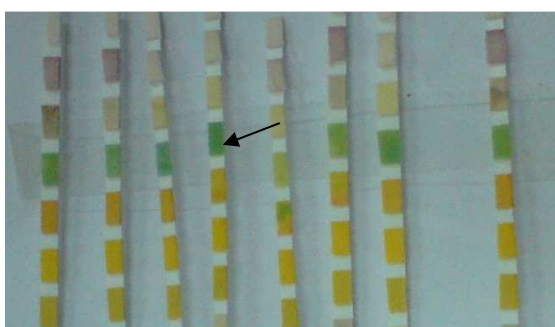
Berdasarkan data sebelumnya, pada bulan ke-3 setelah induksi menggunakan TMPD dilakukan pemeriksaan proteinuria secara semikuantitatif menggunakan *strip test*. Berikut ini adalah gambar hasil pengujian proteinuria secara semikuantitatif. Didapatkan hasil negatif (warna kuning) pada kelompok normal (gambar a);



(Gambar a)



(Gambar b)



(Gambar c)

Gambar 3. Hasil pengujian semikuantitatif proteinuria menggunakan strip test.

KESIMPULAN

Ekstrak daun cocor bebek mengandung tanin, flavonoid, saponin dan steroid/triterpen. Pemberian ekstrak daun cocor bebek 4 mg per 20 g berat badan selama 3 bulan dapat mencegah glomerulonefritis

pada mencit yang diinduksi lupus menggunakan TMPD.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih disampaikan kepada pihak-pihak yang telah mendukung terlaksananya penelitian ini, yaitu :

1. Syamsi Dhuha Foundation yang mendanai penelitian ini melalui Research Sponsorship Care For Lupus Awards 2011.
2. Prof. Dr. Elin Yulinah S. dan Dr. I Ketut Adnyana yang memberi banyak koreksi dan masukan selama penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Almeida. **2006**, 1-Octen-3-O- α -L arabinopyranosyl(1 \rightarrow 6) β glucopyranoside, a minor substance from the leaves of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae), *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16(4): 485-489, Out./Dez. 2006.
2. Bergmann *et.al.* **1994**, Immuno-suppressive Effect of the Aqueous Extract of *Kalanchoe pinnata* in mice, journal: *Phytotherapy Research*, VOL. 8, 399-402 (1994).
3. Chae, B.S.; Kim, D.K.; Eun, J.S.; Kwon, G.S.; & Shin, T.Y. **2010**, The Inhibitory Effect of Bamboo Culm Extract on the Development of Pulmonary Inflammation in Pristane-Induced Lupus Mice, *Natural Product Sciences*, 16(4), 245-250.
4. DiPiro, J.T.; *et. al.* **2005**, *Pharmacotherapy : A Patophysiological Approach, 6th ed.*, Mc-Graw-Hill, New York.
5. National Institutes of Health. **2007**, *The Future Directions of Lupus Research*, U.S. Department of Health and Human Services.
6. Peterson, N.C. **2000**, Behavioral, Clinical, and Physiological Analysis of Mice Used for Ascites Monoclonal Antibody Production, *Comparative Medicine* 50(5): 516-526.
7. Satoh, Minoru & Westley H. Reeves. **1994**, Induction of Lupus-associated Autoantibodies in BALB/c Mice by Intraperitoneal Injection of Pristane, *Journal, Departments of Medicine and Microbiology /Immunology*, University of North Carolina, North Carolina, 1994.

Ekstrak Daun Cocor Bebek (*Kalanchoe pinnata*) Untuk Terapi Preventif Lupus Pada Mencit Yang Diinduksi Dengan 2,6,10,14 Tetramethylpentadecane

8. Reeves, *et.al.* **2009**, Induction of Autoimmunity by Pristane and Other Naturally Occuring hydrocarbons, *Trends Immunol.*
9. Wallace, D.J. **2005**, *The Lupus Book: A Guide for Patients and Their Families*, 3rd ed., Oxford University Press, New York.
10. World Health Organization. **2009**, *Medicinal Plants in Papua New Guinea, Part 1*, Regional Office for the Western Pacific, Manila, Philippines, 2009; page 49.
11. Vogel. **2002**, *Drug Discovery and Evaluation*, 2nd Ed., Springer - Verlag Berlin Heidelberg, Germany.