

PENGARUH PERBANDINGAN DOSIS KOMBINASI EKSTRAK DAUN MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl) DAN BIJI JINTEN HITAM (*Nigella sativa* L) TERHADAP ASMA ALERGI DENGAN PARAMETER HITUNG JUMLAH SEL EOSINOFIL PADA MENCIT BALB/C

Oleh

Suzi Martina Wati¹, Khamdiyah Indah K², Silma Kaffah³

¹Universitas Setia Budi, Surakarta, Indonesia

^{2,3}Universitas Harapan Bangsa, Purwokerto, Indonesia

Email: ²khamdiyah@uhb.ac.id, ³silma@uhb.ac.id

Abstract

Asthma is characterized by chronic inflammation of the respiratory tract. Black cumin seeds and leaves of the god's crown are proven to be used as antiasthma. Mahkota dewa is proven to contain alkaloids, saponins and polyvenols that can be used as antiasthma. This study aims to determine the effect of the combination of black cumin seed extract and Mahkota Dewa leaf on allergic asthma in Balb/c mice with the parameter of counting the number of eosinophil cells in the bronchi of Balb/c mice. The test animals used were male Balb/c mice which were divided into 7 treatment groups, namely positive control, negative control, 3 combined doses and 2 single doses. The combined doses given in this treatment were 25/25 mg, 37.5/12.5 mg, and 12.5/37.5 mg. Seven groups were sensitized to ovalbumin in Al (OH)₃, day 0 and 14 intraperitoneally. The administration of extracts and Profilas® was carried out from the 1st to the 27th day. OVA aerosol exposure, days 21, 23, 25, 27. On day 28, bronchial tissue was prepared and stained with Haematoxylin Eosin and then observed with a light microscope to count the number of eosinophils. The results obtained were analyzed using the Kruskal-Wallis test. The most effective dose obtained was the combination dose of black cumin seed extract 37.5 mg and Mahkota dewa leaf 12.5 mg/20 g BW.

Keywords: Asthma, Mahkota dewa leaf, black cumin seeds

PENDAHULUAN

Asma adalah suatu penyakit yang ditandai dengan adanya kelainan berupa peradangan kronik pada saluran pernafasan yang menyebabkan hipereaktivitas bronkus terhadap berbagai rangsangan yang ditandai dengan gejala episodik berulang berupa mengi, batuk, sesak nafas dan rasa berat didada terutama pada malam atau dini hari yang umumnya bersifat reversibel baik dengan atau tanpa pengobatan. Penyakit asma bersifat fluktuatif (hilang timbul) artinya dapat tenang tanpa gejala tidak mengganggu aktifitas tetapi dapat eksaserbasi dengan gejala ringan sampai berat bahkan dapat menimbulkan kematian (Depkes 2009).

Salah satu tanda penyakit asma alergi adalah infiltrasi pada jaringan dengan

peningkatan jumlah eosinofil (Wardlaw et al 2010). Inhalasi alergen akan menyebabkan peningkatan jumlah eosinofil (Rahmawati et al 2003). Eosinofil bentuk diferensiasi terminal (end-stage) banyak terdapat di dalam jaringan sub mukosa. Jumlah eosinofil di dalam jaringan jauh lebih besar dari jumlah eosinofil di dalam sirkulasi darah. Di dalam sirkulasi darah orang dewasa normal, eosinofil terdapat sekitar 1-3% dari jumlah leukosit. Hitung eosinofil darah biasanya meningkat pada reaksi alergi (Rothenberg 1998).

Biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) minyak dan herbanya diyakini bisa mengobati penyakit yang berhubungan dengan sistem pernapasan, saluran pencernaan, gangguan lambung dan lever serta untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh. Biji jinten hitam

mengandung minyak atsiri, saponin, tannin, alkaloid, dan polifenol (Anonim 1979). Minyak atsiri dari biji jinten hitam berkhasiat sebagai bronkodilator, imunomodulator (Kadi & Kandil 1987), antifungal (Khan et al 2003), antiinflamasi, spasmolitik, hepatoprotektor (Mahmoud et al 2001).

Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) merupakan tumbuhan obat yang sudah dikenal dan saat ini semakin diminati masyarakat. Tumbuhan yang berasal dari Papua berkhasiat untuk mengobati luka, diabetes, lever, flu, alergi, sesak nafas, desentri, penyakit kulit, jantung, ginjal, kanker, darah tinggi, asam urat dan penambah stamina (Rohyami 2008). Menurut Harmanto (2001) buah mahkota dewa mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, dan polifenol dan ekstrak daunnya dapat memberikan efek antihistamin (Siswono 2001).

Pengkombinasian tanaman obat disini dimaksud agar diperoleh efek yang lebih baik. Diharapkan terjadi efek yang saling mendukung untuk memberikan efek sebagai antiasma alergi. Pada penelitian sebelumnya ekstrak biji jinten hitam menunjukkan efek imunomodulator yang membuktikan bahwa biji jinten hitam dapat menghambat respon imun yang berperan pada terjadinya asma (Kusumawahyuni et al 2010). Pada penelitian daun mahkota dewa mengandung polifenol yang dapat berperan sebagai antihistamin (Widowati 2005).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui Pengaruh perbandingan dosis kombinasi ekstrak daun mahkota dewa dan biji jinten hitam yang mempunyai efek terhadap asma alergi yang diuji dengan menggunakan parameter hitung jumlah granul eosinofil bronkus pada mencit Balb/c

METODE PENELITIAN

Variabel penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kombinasi antara ekstrak etanol 96% biji jinten hitam dan daun mahkota dewa dengan berbagai konsentrasi kombinasi yang

berbeda Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah parameter hitung jumlah sel eosinofil pada bronkus mencit Balb/c jantan setelah diberi perlakuan, yang sebelumnya diinduksi

Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan di Universitas Setia Budi. Sample biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah sedangkan daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) yang diperoleh dari daerah Triharjo, Sleman, Yogyakarta.

Biji jinten hitam dan daun mahkota dewa yang sudah didapat kemudian disortasi dan dicuci bersih, kemudian dikeringkan dalam almari pengering pada suhu 40°C sampai kering.

Pembuatan ekstrak biji jinten hitam dilakukan dengan cara meserasi. Serbuk biji jinten hitam ditimbang sebanyak 300gram dimasukkan kedalam botol coklat, ditambah etanol 96% sebanyak 2250 ml dan digojoy selama 10 sampai 15 menit. Selanjutnya campuran tersebut didiamkan selama kurang lebih lima hari dengan sesekali digojoy. Ekstrak maserasi yang didiamkan selama lima hari tersebut disaring kemudian dipekatkan dengan water bath sampai kental kemudian ditimbang untuk mengetahui bobot ekstrak kental yang diperoleh.

Tikus dibuat menjadi 7 kelompok yaitu kelompok kontrol positif, kontrol negatif, 3 kelompok dosis kombinasi dan 2 kelompok dosis tunggal yang dimana masing masing kelompok terdiri dari 5 tikus. Total Dosis kombinasi ekstrak yang diberikan kepada mencit adalah 50 mg/20 g BB mencit. Dimana masing- masing dosis kombinasi antara minyak biji jinten hitam dengan daun mahkota dewa adalah 20: 20/ 20kg BB, 37,5: 12,5/20 kg BB, dan 12,5:37,5/ 20 Kg BB.

Pembuatan Model Mencit Asma Alergi

Pembuatan mencit model asma alergi dilakukan sensitisasi pada mencit

intraperitoneal pada hari ke-0 dan hari ke-14 dengan menimbang 2,5 mg OVA dan dilarutkan dalam 7,75 ml Al (OH)₃. Dosis untuk tiap mencit adalah 0,15 cc/ mencit/ intraperitoneal. Pemaparan OVA aerosol 500 mg dalam 5 ml, Aquabides (Perbandingan 10:1) diberikan pada hari ke-21, 23, 25, dan 27 (Diding 2007).

Hitung Eosinofil Pada Bronkus

Diambil jaringan bronkus utama didekat percabangan (bifurcation) sepanjang 1,5 cm, selanjutnya jaringan bronkus direndam dalam larutan formalin 10% selama 10 jam, kemudian dibuat blok paraffin. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan Haematoxylin Eosin (HE) untuk melihat dan menghitung jumlah eosinofil bronkus, kemudian diidentifikasi dengan mikroskop cahaya. Pada pengamatan eosinofil dengan pengecatan Haematoxylin Eosin (HE) terlihat keunguan dengan sitoplasma granuler, inti biasanya berlobus dua dihubungkan benang sitoplasma yang tipis. Jumlah eosinofil bronkus dinyatakan dalam jumlah sel pada setiap lapangan pandang besar (10x40) sama tidaknya variansi-variansi dua buah distribusi atau lebih dengan Levene's test. Syarat uji beda dengan uji t adalah data harus berdistribusi normal dan harus homogen. Setelah memenuhi syarat maka digunakan uji t paired sample test karena data kuantitatif yang diperoleh berpasangan, jumlah data kurang dari 30, dan merupakan data rasio.

Metode Analisa

Data dianalisis dengan Uji Kruskal Wallis untuk membandingkan perbedaan mean atau kelompok.

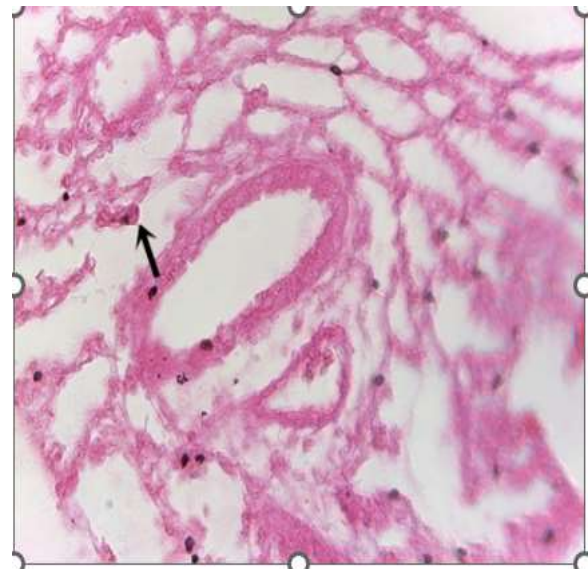
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil hitung jumlah granul sel eosinofil bronkus

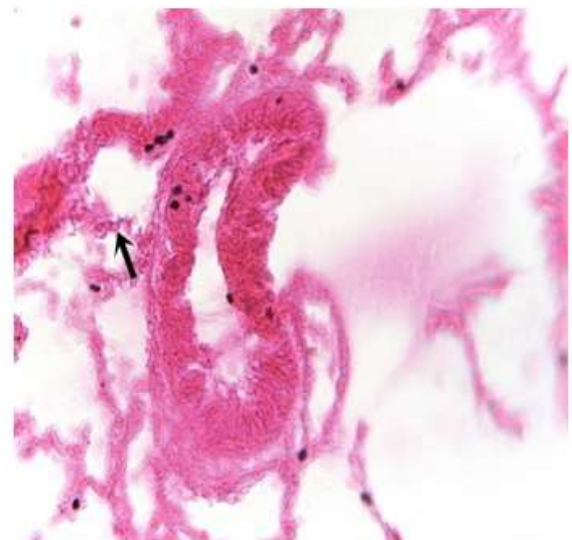
Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah eosinofil. Eosinofil merupakan mediator utama pada reaksi inflamasi asmaatik. Adanya akumulasi eosinofil memberikan efek yang merugikan,

karena eosinofil merupakan efektor yang poten dalam mengakibatkan peradangan berat pada jaringan. Inhalasi ovalbumin sebagai alergen akan menyebabkan peningkatan jumlah eosinofil pada saluran pernapasan

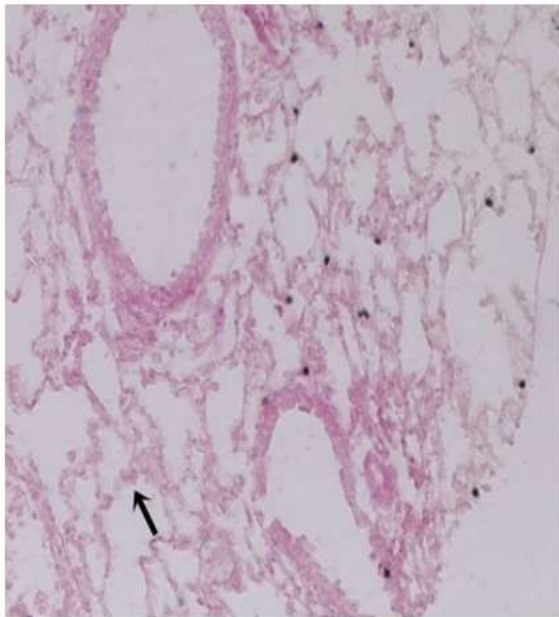
Salah satu gambar eosinofil pada preparat jaringan bronkus masing-masing kelompok perlakuan yang dilihat dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 10x40 dapat dilihat pada gambar berikut. (Gambar 1-3)



Gambar 1. Kontrol Negatif(CMC 0,5%)



Gambar 2. Kontrol Positif (Profilas®)



Gambar 3. Ekstrak Kombinasi

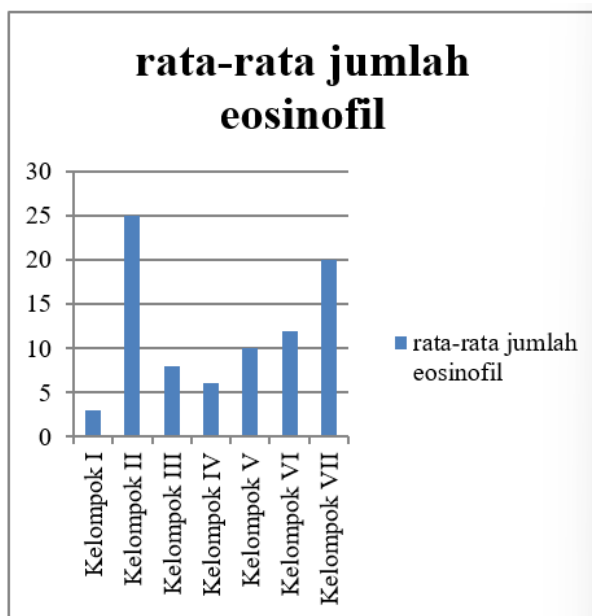
Eosinofil bercirikan memiliki warna biru atau ungu didalam inti sel. Warna pada eosinofil disebabkan oleh pengecatan Haematoxylin Eosin.

Pengecatan Haematoxylin Eosin adalah gabungan pengecatan dengan pewarna asam yaitu Haematoxylin dan pewarna basa Eosin. Pada susunan Haematoxylin terdapat potassium aluminium sulfat berfungsi sebagai mordant, yaitu suatu substansi yang dapat mendiksir atau mengikat zat warna pada jaringan yang diwarnai. Zat warna Haematoxylin bersifat asam sehingga pada sel ia akan mewarnai sitoplasma. Pada pewarnaan eosinofil bronkus sitoplasma akan berwarna fluoresen, biru, jingga, atau ungu. Sedangkan eosin digunakan sebagai background stain atau disebut juga counterstain yaitu pewarna yang berfungsi memberikan warna kontras dengan zat warna yang diberikan terlebih dahulu. Setelah pewarnaan menggunakan Haematoxylin Eosin, preparat bronkus diamati melalui mikroskop cahaya dengan perbesaran 10x40, kemudian dihitung jumlah eosinofil pada 3 lapangan pandang. Hasil hitung jumlah eosinofil dapat dilihat pada table 1

Tabel 1. Hasil Hitung eosinofil

Perlakuan	Kelompok mencit	Jumlah granai sel eosinofil tiap lapangan pandang			Rata-rata jumlah granai sel eosinofil	Jumlah rata granai sel eosinofil tiap perlakuan
		I	II	III		
Perlakuan I Kontrol positif (Posifia®)	1	3	3	4	3	3
	2	3	4	3	3	
	3	4	3	5	4	
	4	4	5	3	4	
	5	2	4	2	3	
Perlakuan II Kontrol negatif (CMC 0,9%)	1	24	26	22	24	28
	2	25	23	26	25	
	3	24	25	22	24	
	4	26	27	24	26	
	5	22	27	25	25	
Perlakuan III (Ekstrak biji jinten hitam 25 mg + Ekstrak daun mahkota dewa 25 mg)	1	6	10	9	8	8
	2	7	8	9	8	
	3	7	11	8	9	
	4	12	8	9	10	
	5	8	6	7	7	
Perlakuan IV (Ekstrak biji jinten hitam 37,5 mg + Ekstrak daun mahkota dewa 12,5 mg)	1	4	6	6	5	6
	2	6	7	7	7	
	3	6	5	4	5	
	4	4	6	5	5	
	5	5	7	5	6	
Perlakuan V (Ekstrak biji jinten hitam 12,5 mg + Ekstrak daun mahkota dewa 37,5 mg)	1	9	10	8	9	10
	2	9	12	10	10	
	3	10	8	11	10	
	4	8	10	11	10	
	5	10	11	7	9	
Perlakuan VI (Ekstrak biji jinten hitam 50 mg)	1	9	12	10	10	12
	2	9	13	11	11	
	3	11	15	13	13	
	4	13	12	14	13	
	5	15	11	13	13	
Perlakuan VII (Ekstrak daun mahkota dewa 50 mg)	1	22	22	24	23	26
	2	17	18	18	18	
	3	20	18	20	19	
	4	18	23	21	21	
	5	17	22	21	20	

Pada tabel 8 terlihat kelompok dosis perlakuan III, IV, V, VI, dan VII menunjukkan penurunan jumlah eosinofil daripada kelompok kontrol negatif. Sedangkan kenaikan jumlah eosinofil dapat dilihat pada kelompok kontrol negatif. Jumlah eosinofil yang lebih banyak pada kontrol negatif mengindikasikan bahwa gejala inflamasi masih terjadi pada saluran nafas. Penurunan jumlah eosinofil paling besar dari kombinasi terbaik yaitu kelompok dosis perlakuan IV menunjukkan penurunanyang mendekati sama besar dengan penurunan jumlah eosinofil pada kelompok kontrol positif. Penurunan jumlah eosinofil ini mengindikasikan bahwa inflamasi pada jalan napas telah berkurang sehingga gejala asma juga berkurang. Dari kombinasi kelompok dosis perlakuan III menunjukkan jumlah yang lebih kecil dari kelompok IV. Penurunan jumlah eosinofil terkecil dari kombinasi adalah kelompok dosis perlakuan V tetapi jumlah eosinofil masih lebih sedikit daripada kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak biji jinten hitam dan daun mahkota dewa memiliki potensi sebagai antiasma.

**Keterangan:**

- Kelompok I** : **Profilas®**
Kelompok II : **CMC 0,5%**
Kelompok III : **Kombinasi ekstrak biji jinten hitam dosis 25 mg dan ekstrak daun mahkota dewa dosis 25 mg**
Kelompok IV : **Kombinasi ekstrak biji jinten hitam dosis 37,5 mg dan ekstrak daun mahkota dewa dosis 12,5 mg**
Kelompok V : **Kombinasi ekstrak biji jinten hitam dosis 12,5 mg dan ekstrak daun mahkota dewa dosis 37,5 mg**
Kelompok VI : **Ekstrak biji jinten hitam dosis 50 mg**
Kelompok VII : **Ekstrak daun mahkota dewa dosis 50 mg**

Gambar 4. Histogram rata-rata jumlah eosinofil bronkus mencit dengan perlakuan

Sensitisasi menggunakan ovalbumin dilakukan untuk memunculkan respon inflamasi. Ovalbumin sebagai bahan yang dapat merangsang pembentukan respon imun ke arah Th2 dominan dan merupakan salah satu alergen yang bertanggung jawab terhadap terjadinya reaksi alergi tipe 1 pada manusia. Reaksi alergi ini termasuk inflamasi bronkus kronis dengan eosinofilia (Sugimoto 1999). Sensitisasi ovalbumin akan menunjukkan infiltrasi eosinofil yang signifikan dalam saluran pernapasan pada 24 jam setelah pernapasan (Shimizu et al 2000). Rute pemberian ovalbumin secara intra peritoneal merupakan metode yang sering

dipakai karena rongga peritoneal yang relatif besar sehingga volume antigen yang diinjeksikan dapat lebih banyak dibanding teknik lain. Sensitisasi ovalbumin dilakukan setelah 7 hari pengkondisian pada masing-masing kelompok mencit dan dihitung sebagai hari ke-0 karena alergen pertama kali dikenakan ke dalam tubuh. Sensitisasi kedua dilakukan pada hari ke 14 secara intraperitoneal, sedangkan pada hari ke 21, 23, 25 dan 27 sensitisasi dilakukan secara aerosol, Ovalbumin diberikan dengan aerosol pada mencit yang berada didalam wadah sensitisasi kedua sampai dengan pemberian Ovalbumin aerosol dimaksud agar hewan uji yang disensitisasi akan mengalami hyperresponsiveness saluran napas (Kips et al 2003). Hewan uji dikorbankan pada hari ke-28 setelah 24 jam sensitisasi terakhir untuk diambil jaringan bronkus kemudian dibuat preparat imunohistokimia dan dicat menggunakan Haematoxylin Eosin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data yang diperoleh dari penelitian dianalisa statistik dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis, sebelum dilakukan uji Kruskal-Wallis terlebih dahulu dilakukan uji Kolmogorov-Smirnov. Uji ini dilakukan untuk mengetahui data yang diperoleh terdistribusi secara normal atau tidak. Data terdistribusi normal jika nilai signifikansi (asympt.Sig.)>0,05. Hasil uji data dari penelitian menunjukkan bahwa data tersebut terdistribusi normal karena nilai signifikansinya (asympt.Sig.)>0,05 (0,101). Selanjutnya dilakukan uji Kruskal-Wallis untuk mengetahui kebermaknaan lebih dari dua kelompok perlakuan. Data dianalisa dengan uji Kruskal-Wallis untuk menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan diantara ketujuh perlakuan yang ditandai dengan nilai signifikansi sebesar 0,000 ($P < 0,05$). Pada uji Kruskal-Wallis didapatkan kesimpulan ada beda nyata.

Pada penelitian ini dapat dinyatakan bahwa ekstrak etanol biji jinten hitam dan

daun mahkota dewa terbukti memberi efek antiasma terhadap mencit Balb/c yang disensitisasi menggunakan ovalbumin dan dosis kombinasi yang paling efektif sebagai antiasma yaitu pada dosis ekstrak biji jinten hitam 37,5 mg dan ekstrak daun mahkota dewa 12,5 mg/20 g BB mencit ditunjukkan dengan adanya penurunan jumlah sel eosinofil dan memiliki beda nyata terhadap kontrol negatif. Kandungan senyawa pada ekstrak biji jinten hitam berdasarkan uji kualitatif adalah polifenol, minyak atsiri, dan saponin. Kandungan senyawa pada ekstrak daun mahkota dewa berdasarkan uji kualitatif adalah alkaloid, saponin, flavonoid, dan polifenol. Menurut penelitian Kawai et al (2007) flavonoid mampu menghambat proses inflamasi dengan sebagai inhibitor IL-4 dan CD4+ pada aktivasi sel. Penghambatan IL-4 dan CD4+ berpengaruh terhadap aktivasi eosinofil, yang menyebabkan terjadinya penekanan terhadap akumulasi eosinofil didalam jaringan sehingga gejala asma akan berkurang.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak etanol 96% tunggal dan kombinasi dari biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dan daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) mempunyai efek antiasma pada model asma alergi dengan penurunan parameter hitung jumlah granul sel eosinofil bronkus pada mencit Balb/c.

kombinasi biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dan daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) dengan dosis ekstrak biji jinten hitam 37,5 mg dan daun mahkota dewa 12,5 mg/20 g BB mencit paling efektif menurunkan jumlah sel eosinofil pada model asma alergi dengan penurunan parameter hitung jumlah granul sel eosinofil bronkus pada mencit Balb/c

Saran

Pertama, perlu dilakukan uji toksisitas akut dan kronis untuk mengetahui kemungkinan adanya efek samping jika dipakai dalam jangka panjang pada manusia.

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang senyawa aktif yang mempunyai aktifitas sebagai antiasma

DAFTAR PUSTAKA

- [1] [Depkes RI]. 2009. Pedoman Pengendalian Penyakit Asma. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- [2] Harmanto N. 2001. Mahkota Dewa: Obat Pusaka Para Dewa. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- [3] Kartikawati H. 2003. Pengaruh Polifenol Teh Hijau Terhadap Respon Alergi Pada Mencit Balb/c yang Disensitisasi Ovalbumin [Tesis]. Semarang: Ilmu Biomedik, Universitas Diponegoro. Semarang.
- [4] Rohyami Y. 2007. Identifikasi flavonoid dari ekstrak metanol daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* Boerl) Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR, Laporan Penelitian PDM DIKTI 2007
- [5] Rothenberg ME. 1998. Eosinophilia. *N Eng J Med*. 338: 1592-1600.
- [6] Siswono. 2001. Mahkota Dewa ‘Racun’ Irian yang Berkhasiat, *Gizi.net* 4 Oktober 2001

Siswono. 2001. Mahkota Dewa ‘Racun’ Irian yang Berkhasiat, *Gizi.net* 4 Oktober 2001