

Penelitian

Efek Antimitogenik Fraksi Alkaloid *Achyranthes aspera* Linn. terhadap Induksi Apoptosis pada Mencit yang Terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*

(*The Antimitogenic Effect of Alkaloid Fraction of *Achyranthes aspera* Linn. on Apoptotic Induction in Mice Infected by *Mycobacterium tuberculosis**)

Dewa Ketut Meles¹, Wurlina², I Dewa Putu Anom Adnyana^{3*}, Sunarni Zakaria⁴
Dewa Made Sucipta Putra⁵, Niluh Suasanti⁶

¹Farmakologi Veteriner, ²Reproduksi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya
³Reproduksi Veteriner Universitas Brawijaya, Malang; ⁴Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya; ⁵Program Pendidikan Dokter Spesialis Obstetric, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
⁶Rumah Sakit Condong Catur, Yogyakarta

*Penulis untuk korespondensi: dewanom_adnyana@ub.ac.id
Diterima 25 Agustus 2014, Disetujui 5 Desember 2014

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi efek antimitogenik dari ekstrak fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn. terhadap induksi apoptosis, pertumbuhan dan perkembangan sel paru-paru yang diinfeksi oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Efek *antimitogenic* dari alkaloid *A. aspera* diujikan pada 120 ekor mencit yang diinfeksi dengan 100 sel/mL *M. tuberculosis* dan dibagi menjadi 6 kelompok sehingga masing-masing kelompok terdiri dari 20 ekor. Kelompok perlakuan terdiri dari: kontrol negatif dengan tikus sehat yang diberikan adjuvant saja, kontrol positif dengan diberikan rifampisin 600 mg/kgbb/hari, dan kelompok perlakuan P₀, P₁, P₂, dan P₃ yang diinfeksi *M. tuberculosis* dan diberikan alkaloid dengan dosis bertingkat 0, 60, 12, dan 180 mg/kgbb/po/hari selama 30 hari. Parameter pengamatan terdiri dari: jumlah total leukosit, jumlah total jenis leukosit, jumlah karbuncel di paru-paru, dan jumlah sel paru-paru yang mengalami apoptosis. Hasil penelitian menunjukkan pada tikus yang terinfeksi *M. tuberculosis* mengalami penurunan jumlah total dan jenis leukosit (eosinofil, neutrofil, limfosit dan monosit), dan jumlah karbuncel di paru-paru pada kelompok perlakuan alkaloid mulai dosis 60 mg/kgbb. Jumlah sel di paru-paru yang mengalami apoptosis juga mengalami penurunan pada kelompok pemberian alkaloid daun *A. aspera* mulai dosis 60 mg/kgBB sama dengan kelompok rifampisin. Kesimpulan dari penelitian bahwa alkaloid daun *A. aspera* menyebabkan penurunan jumlah total dan jenis leukosit, serta jumlah karbuncel dan sel paru yang mengalami apoptosis pada tikus yang terinfeksi oleh *M. tuberculosis*.

Kata kunci: *Achyranthes aspera* Linn., antimitogenik, paru-paru tuberkulosis, apoptotik, leukosit

ABSTRACT

The aims of this research was to determine the antimitogenic effect of alkaloid *Achyranthes aspera* Linn. on apoptotic induction, growth and cell development in lung cell infected by *Mycobacterium tuberculosis*. Antimitogenic effect of alkaloid *A. aspera* was tested in 120 mice that infected with 100 cell/mL *M. tuberculosis* and divided into 6 groups so that each group consist of 20 mice. The treatment groups were: negative control that healthy mice was given adjuvans only, positive control that was given rifampisin 600 mg/kg bb/day, and treatment group of P₀, P₁, P₂ and P₃ infected by *M. tuberculosis* and given alkaloid with dose 0, 60, 12 and 180 mg/kgbw/po/day continuously during 30 days. The parameter of observation were total leucocyte count, total differential leucocyte count, total carbuncel in lung, and percentage of apoptotic lung cells. The result showed that mice infected by *M. tuberculosis* have decreased in total leucocyte and differentiated leucocyte total (eosinophil, neutrophil, lymphocyte, and monocyte), and total carbuncel in lungs after treated by alkaloid *A. aspera* with dose begin 60 mg/kgbw. Apoptotic cell in lung was also decreased in the group treated by alkaloid *A. aspera* with dose begin 60 mg/kgbw that the value was equal to the group of rifampisin. In conclusion, treatment of alkaloid from

A. aspera caused depreciation in leucocyte total and leucocyte differentiation, and total of carbuncle and apoptotic cell in the lung in mouse that infected by *M. tuberculosis*.

Keywords: *Achyranthes aspera* Linn., antimitogenic, tuberculosis lung, apoptotic, leucocyte

PENDAHULUAN

Penyakit TBC merupakan penyebab kematian nomor tiga didunia setelah HIV/AIDS dan Malaria. *Mycobacterium tuberculosis* (TB) telah menginfeksi sepertiga penduduk dunia, menurut *world health organization* (WHO) pada tahun 2006 sekitar 8 juta penduduk dunia diserang TB dengan kematian 2 juta orang per tahun. Antara tahun 2002-2020 diperkirakan sekitar 1 miliar manusia akan terinfeksi. Dengan kata lain pertambahan jumlah infeksi lebih dari 56 juta tiap tahunnya. Jika dihitung, pertambahan jumlah pasien TBC akan bertambah sekitar 2,8-5,6 juta setiap tahun, dan 1,1-2,2 juta jiwa meninggal setiap tahun karena TBC. Angka ini adalah angka yang besar, karena 2-4 orang terinfeksi setiap detik, dan hampir 4 orang setiap menit meninggal karena TBC ini. Kecepatan penyebaran TBC bisa meningkat lagi sesuai dengan peningkatan penyebaran HIV/AIDS dan munculnya bakteri TBC yang resisten terhadap obat.

Penduduk Indonesia lebih dari 200 juta orang, Indonesia menempati urutan ketiga setelah India dan China dalam hal jumlah penderita di antara 22 negara dengan masalah TBC terbesar di dunia. Di Indonesia jumlah TBC paru dari tahun ketahun terus meningkat. Saat ini setiap menit muncul satu penderita baru TBC paru dan setiap dua menit muncul satu penderita baru TBC paru yang menular, bahkan dikatakan setiap empat menit sekali satu orang meninggal (Depkes RI, 2006).

Di Indonesia TB sebagai penyebab kematian utama setelah penyakit jantung dan saluran pernafasan. Penyakit TB paru, masih menjadi masalah kesehatan masyarakat. Hasil survey kesehatan rumah tangga (SKRT) tahun 2005 menunjukkan bahwa tuberculosis merupakan penyebab kematian nomor 3 setelah penyakit kardiovaskuler dan penyakit saluran pernapasan pada semua golongan usia dan nomor 1 dari golongan infeksi. Diperkirakan setiap tahun 450.000 kasus baru TB dimana sekitar 1/3 penderita terdapat disekitar puskesmas, 1/3 ditemukan di pelayanan rumah sakit/klinik pemerintah dan swasta, praktek swasta dan sisanya belum terjangkau unit pelayanan kesehatan. TBC merupakan masalah kesehatan baik dari sisi angka kematian (*mortalitas*), angka kejadian penyakit (*morbiditas*) maupun diagnosis dan terapinya. Kematian karena TB diperkirakan 175.000 per tahun. Penyakit TB menyerang sebagian besar kelompok usia kerja

produktif, penderita TB kebanyakan dari kelompok sosioekonomi rendah. Penderita TB Paru dengan strategi *Directly Observed Treatment Shortcourse Chemotherapy* (DOTS) atau pengawasan langsung menelan obat jangka pendek/setiap hari baru mencapai 36% dengan angka kesembuhan 87%. Sebelum strategi DOTS cakupannya sebesar 56% dengan angka kesembuhan yang dapat dicapai hanya 40-60%. Karena pengobatan yang tidak teratur dan kombinasi obat yang tidak cukup dimasa lalu kemungkinan telah timbul kekebalan kuman TB terhadap obat anti tuberculosis (OAT) secara meluas atau *multi drug resistance* (MDR) (Depkes RI, 2006).

Penyakit TBC adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Bakteri ini mudah mengalami resistensi terhadap beberapa jenis obat sehingga terapi terhadap penderita penyakit TBC harus menggunakan kombinasi dari beberapa jenis obat, dan resistensi *Mycobacterium tuberculosis* terus meningkat terutama di negara yang sedang berkembang (Koneman et al., 2000).

Iseman (2002) menyatakan bahwa resistensi terhadap isoniazid dan streptomycin sekitar 5%, resistensi terhadap rifampin 1,5%, dan prevalensi terhadap multi drug resistance TB (MDR-TB) sebesar 1%. Resistensi terhadap antibiotik tidak dapat dielakan karena bakteri ini dapat melakukan mutasi DNA dan dapat beradaptasi secara unik dalam tubuh manusia (Iseman, 2002; Lewis, 1995). Laju peningkatan resistensi dapat dihambat dengan cara pengawasan perkembangan infeksi, penemuan antibiotik baru, penggunaan obat secara tepat dan pengembangan vaksin yang efisien.

Antigen dari *Mycobacterium tuberculosis* menstimulasi proliferasi T-limposit (Haas et al., 2003), meningkatkan aktivitas sitolitik sel target dan produksi cytokine. Antigen mycobacterial diketahui dapat menginduksi apoptosis pada T-limposit dan meningkatkan proporsi T-limposit dalam darah perifer (Duarte et al., 2007).

Alkaloid yang berasal dari tanaman bekerja pada siklus sel dengan menghambat proses mitosis. Alkaloid sebagai antimitosis mempunyai kemampuan mengikat tubulin yaitu suatu protein yang menyusun mikrotubulus dengan menghambat atau memblokir polimerisasi protein ke dalam mikrotubulus sehingga terjadi penghancuran mikrotubulus. Akibatnya terjadi gangguan fungsi mikrotubulus dan gangguan enzim telomerase berakibat

pada proses mitosis dan pembelahan sel terhenti pada metafase. Tidak terbentuknya benang mitosis yang utuh menyebabkan kromosom masuk dalam sitoplasma sehingga kromosom bergerombol seperti bola atau bintang disebut dengan *explode mitotic*. Mikrotubulus berfungsi membentuk benang-benang mitosis dan berperan untuk pergerakan sel, pagositosis dan transportasi makanan dan hasil metabolisme dalam sel (Chabner et al., 2001).

Obat yang mempunyai efek antimitosis diduga juga mempunyai efek antitelomerase yang dapat menghambat pembelahan dan perkembangan sel. Yang sangat cepat seperti induksi apoptosis. Suatu sel normal dapat berubah menjadi abnormal, infeksi atau karbunkel karena adanya perubahan pada DNA sel tersebut. Ada 2 penyebab perubahan genetik yang dapat menyebabkan terjadinya infeksi atau karbunkel yaitu inaktivasi gen supresor dan aktivasi proto karbunkel menjadi karbunkel (Lantuejoul et al., 2004). Perubahan sel normal menjadi karbunkel dapat disebabkan adanya distorsi atau gangguan dari gen pengatur pertumbuhan sel. Protokarbunkel merupakan gen yang terlihat dalam pertumbuhan dan diferensiasi normal sel. Bila diaktivasi oleh adanya virus atau bakteri tertentu maupun sebagai hasil dari mutasi, protoonkogen dapat berkembang menjadi onkogen aktif dan memacu tumbuhnya keganasan sel atau karbunkel (Kocki et al., 2004; Yalon et al., 2004).

Obat anti tuberkulosis diharapkan memiliki toksisitas selektif, umumnya anti TBC menekan proliferasi sel dan menimbulkan toksisitas karena ikut menghambat pertumbuhan sel normal yang proliferasinya cepat seperti sumsum tulang, epitel germinatum, mukosa saluran pencernaan dan jaringan limposit. Hal ini disebabkan anti TBC tersebut membunuh sel melalui jalur nekrosis yang dapat menimbulkan inflamasi dan melibatkan sekelompok sel yang lain sehingga efek sampingnya meluas. Obat untuk tuberkulosis hendaknya membunuh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* melalui antimitosis dan menginduksi apoptosis.

Tujuan penelitian adalah membuktikan alkaloid *Achyranthes aspera* Linn dapat menghambat mitosis sel bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, merusak integritas membran, menginduksi apoptosis sel paru dan dapat berfungsi sebagai immunomodulator melawan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* melalui pemeriksaan: jumlah total leukosit, jumlah jenis leukosit, jumlah karbunkel pada paru, jumlah sel paru yang mengalami apoptosis. Manfaat penelitian adalah untuk mendapatkan obat antituberkulosis yang tidak menimbulkan resisten yang murah, aman dan nyaman. Hipotesis Penelitian: Apakah al-

kaloid *Achyranthes aspera* efektif untuk membunuh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang diinfeksi-kan pada hewan coba mencit tanpa menimbulkan resistensi.

BAHAN DAN METODE

Pembuatan Fraksi Alkaloid

Pembuatan fraksi alkaloid berdasarkan metode Pharmacope Indonesia, dan kadar alkaloid *Achyranthes aspera* diukur menggunakan *high performance liquid chromatography* (HPLC), yang didahului dengan pemeriksaan alkaloid menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dan proses fraksinasi menggunakan metode kromatografi kolom dengan fase diam silika gel dan fase gerak campuran etil aasetat, methanol, dan air dengan perbandingan 7 : 4 : 1.

Hewan Coba

Mencit sebanyak 120 ekor berumur 3 bulan diadaptasikan terhadap lingkungan selama 2 minggu, mencit tersebut dibagi dalam 6 kelompok masing-masing kelompok terdiri dari 20 ekor. Lima kelompok diinfeksi 10^3 sel/mL *Mycobacterium tuberculosis* (dibuktikan tertular dengan uji imunokromatografi adanya antibodi dalam darah), dan satu kelompok tidak diinfeksi (kontrol negatif) yang dilakukan di laboratorium BSL 3 UNAIR, dan telah mendapatkan ethical clearance dari komisi etik penelitian.

Keenam kelompok percobaan tersebut sebagai berikut: kelompok kontrol negatif: mencit sehat hanya diberi CMC 0,5% dengan dosis 0,5 mL/ekor / hari, kelompok kontrol positif : mencit diinfeksi *M. tuberculosis* diberi obat rifampisin 600 mg/50 kg manusia/ hari (2,184 mg/20 gram mencit/ po/per-hari), kelompok perlakuan yang terdiri dari P₀, P₁, P₂, dan P₃ masing-masing secara berurutan diberi alkaloid *Achyranthes aspera* dengan dosis 0 mg/kgbb, 60 mg/kg bb, 120 mg/kgbb dan 180 mg/kgbb/ secara peroral. Semua kelompok diberi perlakuan sama setiap hari selama 30 hari. Parameter yang diamati adalah 1) Imunohematologi yang meliputi pengaruhnya terhadap jumlah total leukosit dan hitung jenis leukosit, 2) Uji imunohistokimia yang meliputi jumlah sel tuberkel dan jumlah apoptosis sel paru yang mengalami apoptosis.

Uji Immunochromatografi

Uji Immunochromatografi dilakukan untuk mengetahui secara cepat apakah hewan coba telah terinfeksi TBC dengan mendeteksi antibodi dalam

darah. Uji ini dilakukan setiap bulan dan sesuai dengan petunjuk Syntron Bioresearch Inc catalog. 11065. Darah yang diambil melalui jantung mencit dari masing-masing kelompok ditampung dalam tabung yang berisi Lithium heparin. Teteskan darah (20-30 μ L) ke dalam well test cassette (pad) dan tunggu selama 30 detik. Selanjutnya tambahkan 7 tetes larutan buffer yang mengandung serum protein, Ditunggu selama 10 menit dan hasilnya dibaca. Jika timbul warna merah muda pada daerah T dan daerah C maka dinyatakan positif terinfeksi.

Uji Imunohematologi

Penghitungan jumlah total leukosit. Prosedur analisis total leukosit sebagai berikut: sebanyak 0,02 mL darah diambil dengan pipet dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi natrium sitrat 0,38% dan dicampur, Selanjutnya ditambahkan beberapa kristal $KMNO_4$ ditambahkan dan dicampur lagi, Gelas cover ditempatkan di atas kamar hitung newbar, selanjutnya setelah pengeluaran cairan dari pipet teteskan diatas penutup kira-kira 3 tetes jumlah leukosit dihitung dibawah mikroskop.

Hitung jenis leukosit (*Differential leucocyte count*). Prosedur analisis differential leukosit sebagai berikut: teteskan darah pada objek glass dan dibuat preparat ulas dan dikeringkan, fiksasi dengan alkohol sampai kering, warnai dengan pewarna Giemsa diteteskan diatas preparat dan biarkan selama 10 menit selanjutnya dicuci, dikeringkan, lalu hitung jenis leukosit diidentifikasi.

Pengamatan Histopatologi

Organ paru diambil dari mencit yang dianestesi dengan dietil eter. Masing-masing organ dipotong secara lateral dan dicuci dengan larutan saline (0,9% NaCl) dingin, diiris kecil-kecil secara terpisah dan difiksasi segera dalam formalin buffer fosfat 10% selama 48 jam. Jaringan kemudian dipindahkan ke dalam etil alkohol 70% dan disimpan sampai akan digunakan. Masing-masing spesimen diproses untuk pembuatan preparat histologi dengan metode paraffin. Blok parafin dipotong menggunakan mikrotom dengan ukuran 5 μ m dan diwarnai dengan hematoxylin dan eosin untuk pengujian histopatologi di bawah mikroskop. Pemeriksaan dilakukan terhadap gejala lesi dan nekrosis.

Menghitung Persentase apoptosis jaringan paru yang terinfeksi

Dibuat larutan acrydin orange konsentrasi 100 ppm dan larutan ethidium bromid konsentrasi 100 ppm dalam larutan PBS. Campurkan kedua zat

warna sama banyak dalam vial, Campurkan sebanyak 25 μ L suspensi sel dengan 1 μ L campuran zat warna (2) dalam vial segera diamati, pipet sebanyak 10 μ L, tempatkan gelas objek, tutup dengan cover glass, amati minimal 120 sel dengan mikroskop flourecein. Sel apoptosis: berwarna oranye dengan bitnik-bintik terang karena kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA, dan sel nekrosis berwarna oranye tanpa bintik terang, sedangkan sel hidup berwarna hijau.

%Sel apoptosis =

$$\frac{\Sigma \text{ sel Apoptosis}}{\Sigma \text{ sel Apoptosis} + \Sigma \text{ sel Nekrosis} + \Sigma \text{ sel hidup}} \times 100\%$$

HASIL

Jumlah total leukosit

Hasil penghitungan terhadap rata-rata jumlah total leukosit mencit setelah pemberian berbagai dosis alkaloid *Achyranthes aspera* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Rataan jumlah total leukosit setelah pemberian alkaloid *Achyranthes aspera*

Perlakuan	Jumlah total Leukosit
Kontrol negatif (K-)	14578 \pm 168,179 ^d
Kontrol + (K+) (Rifampisin)	16324 \pm 197,495 ^b
Perlakuan 0 (Alkaloid 0 mg/kgbb)	18162 \pm 337,508 ^a
Perlakuan 1 (alkaloid 60 mg/kgbb)	16374 \pm 143,619 ^b
Perlakuan 2 (alkaloid 120 mg/kgbb)	15700 \pm 223,308 ^c
Perlakuan 3 (alkaloid 180 mg/kgbb)	15110 \pm 62,003 ^c

Nilai dengan superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Jumlah jenis leukosit

Hasil penghitungan terhadap rata-rata jumlah jenis leukosit mencit setelah pemberian berbagai dosis *Achyranthes aspera* dapat dilihat pada Tabel 2.

Jumlah karbunkel pada permukaan paru.

Berdasarkan pengamatan yang dilakukan pada sediaan histologis terlihat adanya karbunkel pada paru yang terinfeksi tuberkolosis (Gambar 1). Hasil penghitungan terhadap rata-rata jumlah karbunkel pada paru setelah pemberian berbagai dosis *Achyranthes aspera* dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 2 Rataan jumlah jenis leukosit setelah pemberian alkaloid *Achyranthes aspera*

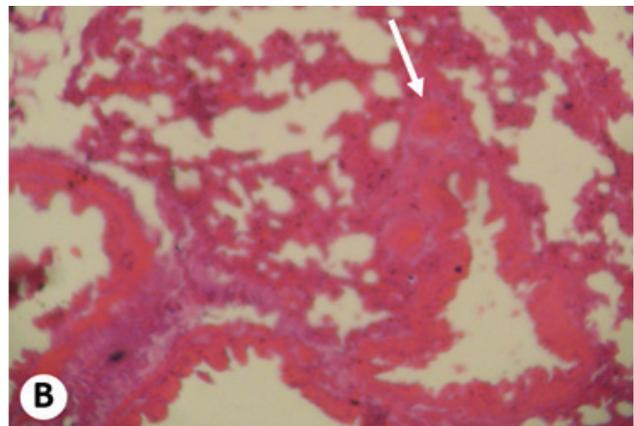
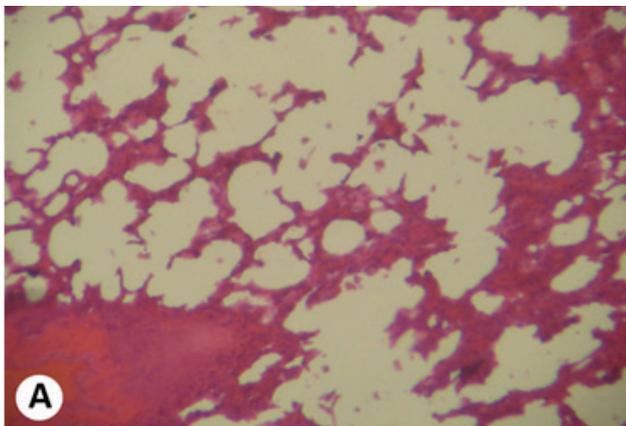
Perlakuan	Rata-rata jumlah jenis leukosit			
	Eosinofil	Neutrofil	Limfosit	Monosit
Kontrol -	471,40 ± 60,79 ^c	9000,80 ± 383,19 ^c	4638,98 ± 393,85 ^d	466,82 ± 61,51 ^d
Kontrol +	555,02 ± 84,30 ^b	9223,06 ± 37,63 ^a	5974,58 ± 120,0 ^b	571,34 ± 86,04 ^b
P ₀	607,68 ± 92,30 ^a	5612,12 ± 396,98 ^d	11304,20 ± 1214,13 ^a	607,68 ± 92,30 ^a
P ₁	540,34 ± 79,09 ^b	9136,69 ± 296,95 ^b	6140,25 ± 270,16 ^b	556,72 ± 84,55 ^b
P ₂	533,80 ± 81,07 ^b	9263,00 ± 314,00 ^a	5385,10 ± 305,60 ^c	518,10 ± 75,84 ^c
P ₃	498,63 ± 72,99 ^c	9050,89 ± 366,33 ^c	5046,74 ± 327,96 ^{cd}	513,74 ± 78,03 ^c

Nilai dengan superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Tabel 3 Rataan jumlah karbunkel pada permukaan setelah pemberian alkaloid *Achyranthes aspera*

Perlakuan	Jumlah karbunkel paru
Kontrol negatif (K-)	0,00 ± 0,00 ^c
Kontrol + (K+) (Rifampisin)	4,50 ± 0,80 ^b
Perlakuan 0 (Alkaloid 0 mg/kgbb)	10,80 ± 1,83 ^a
Perlakuan 1 (alkaloid 60 mg/kgbb)	4,80 ± 0,87 ^b
Perlakuan 2 (alkaloid 120 mg/kgbb)	4,40 ± 0,80 ^b
Perlakuan 3 (alkaloid 180 mg/kgbb)	3,93 ± 0,83 ^b

Nilai dengan superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)



Gambar 1 Mikrofotografi paru-paru normal (A) dan paru yang terinfeksi tuberkulosis (B), terlihat adanya karbunkel paru yang terinfeksi (anak panah).

PEMBAHASAN

Sel paru yang mengalami apoptosis

Hasil penghitungan terhadap rata-rata jumlah sel yang mengalami apoptosis pada paru setelah pemberian berbagai dosis *Achyranthes aspera* dapat dilihat pada Tabel 4.

Jumlah total leukosit

Berdasarkan analisis statistik menggunakan Anava diperoleh perbedaan yang nyata antara kontrol negatif dengan kontrol positif dan perlakuan 0 (P₀), perlakuan 1 (P₁), perlakuan 2 (P₂), dan perlakuan 3

Tabel 4 Rataan jumlah sel paru yang mengalami apoptosis setelah pemberian alkaloid *Achyranthes aspera*

Perlakuan	Apoptosis	Nekrosis	Sel hidup
K-	1,40 ± 0,49 ^d	0,20 ± 0,42 ^c	98,4 ± 0,52 ^a
K+ (Rifampisin)	36,80 ± 3,20 ^b	24,2 ± 2,82 ^a	39,00 ± 5,46 ^b
P ₀ (Alkaloid 0 mg/kgbb)	70,30 ± 4,22 ^a	17,10 ± 2,33 ^b	12,60 ± 5,42 ^d
P ₁ (alkaloid 60 mg/kgbb)	38,90 ± 5,11 ^b	24,30 ± 1,34 ^a	36,80 ± 4,96 ^c
P ₂ (alkaloid 120 mg/kgbb)	37,10 ± 2,21 ^b	23,50 ± 2,26 ^a	39,40 ± 3,85 ^b
P ₃ (alkaloid 180 mg/kgbb)	32,80 ± 3,92 ^c	25,80 ± 1,40 ^a	40,40 ± 4,80 ^b

Nilai dengan superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

(P₃) ($p < 0,05$). Kontrol positif tidak berbedadengan P₁. Ini berarti pemberian rifampisin dengan dosis 2,184 mg/20 gram mencit sama dengan pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* dosis 60 mg/kgbb. Pada Kontrol positif terdapat perbedaan jumlah leukosit dengan P₂ dan P₃ ($p < 0,05$) namun antara P₂ dan P₃ tidak terdapat perbedaan ($p > 0,05$). Ini berarti pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* 120 mg/kgbb dan 180 mg/kgbb lebih baik daripada pemberian rifampisin 2,184 mg/20 gram mencit. Leukosit merupakan salah satu sistem pertahanan tubuh. Leukosit sebagian besar di transpot ke daerah radang akibat kuman tuberkulosis dengan memberikan suatu sistem pertahanan yang cepat terhadap agen infeksi (Alberts, 2005).

Pada kontrol positif dengan menggunakan rifampisin sebagai obat antituberkulosis dimana menyebabkan radang akan menghambat pelepasan mediator radang sehingga terjadi penurunan total leukosit dibandingkan dengan P₀ yang hanya diberi pelarut ekstrak. Pada P₁ mempunyai efek yang sama dengan kontrol positif, sedangkan pada P₂ dan P₃ mempunyai efek lebih baik dari pada kontrol positif. Ini berarti pada pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* pada dosis 120 mg mempunyai efek lebih baik daripada rifampisin hal ini disebabkan alkaloid yang menghambat siklooksigenase.

Jumlah jenis leukosit

Berdasarkan analisis statistik menggunakan Anava diperoleh jumlah eosinofil berbeda nyata antara perlakuan kontrol negatif dengan kontrol positif dan kontrol perlakuan (P₀), perlakuan 1 (P₁), perlakuan 2 (P₂), dan perlakuan 3 (P₃) ($p < 0,05$). Kontrol positif tidak berbeda dengan P₁ dan P₂. Ini berarti jumlah eosinofil pada pemberian rifampisin sama dengan pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* ($p > 0,05$). Pada P₃ tidak terdapat perbedaan jumlah leukosit dengan kontrol negatif ($p > 0,05$). Ini berarti pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* 180 mg/kgbb lebih baik daripada pemberian rifampisin

dan hasilnya sama dengan kontrol negatif. Ini berarti peningkatan dosis alkaloid *Achyranthes aspera* yang diberikan pada mencit sebagai antituberkulosis menyebabkan efek semakin meningkat yaitu sama dengan kontrol negatif.

Berdasarkan analisis statistik menggunakan Anova diperoleh jumlah neutrofil yang berbeda nyata antara perlakuan kontrol negatif dengan kontrol positif dan perlakuan 0 (P₀), perlakuan 1 (P₁), perlakuan 2 (P₂) dan perlakuan 3 (P₃) ($p < 0,05$). Kontrol positif tidak berbeda dengan P₂. Ini berarti jumlah eosinofil pada pemberian rifampisin sama dengan pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* 60 mg/kgbb. Pada P₃ tidak terdapat perbedaan jumlah neutrofil dengan kontrol negatif ($p > 0,05$). Peningkatan maupun penurunan jumlah neutrofil tidak selalu menunjukkan perubahan jumlah total neutrofil yang sesungguhnya (Lewis, 1995) Pada keadaan yang disebut dengan neutrofilia semu terjadi peningkatan neutrofil didalam sirkulasi darah namun peningkatan ini sebenarnya disebabkan adanya pemindahan dari neutrofil marginal yang dapat disebabkan karena stress atau setelah melakukan suatu aktifitas.

Berdasarkan analisis statistik menggunakan Anova diperoleh jumlah limfosit berbeda nyata antara perlakuan kontrol negatif dengan kontrol positif dan kontrol perlakuan (P₀), perlakuan 1 (P₁), perlakuan 2 (P₂), dan perlakuan 3 (P₃) ($p < 0,05$). Kontrol positif tidak berbeda dengan P₁. Ini berarti jumlah limfosit pada pemberian rifampisin 2,184 mg/20 gram mencit sama dengan pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* 60 mg/kgbb. Pada P₂ dan P₃ tidak terdapat perbedaan jumlah limfosit, tetapi P₃ mempunyai jumlah limfosit yang sama dengan kontrol negatif ($p > 0,05$). Ini berarti pada pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* dosis 180 mg/kgbb mempunyai efek yang sama dengan kontrol negatif

Berdasarkan analisis statistik menggunakan Anova diperoleh jumlah monosit perbedaan yang nyata antara perlakuan kontrol negatif dengan kon-

tol positif dan kontrol perlakuan (P_0), perlakuan 1 (P_1), perlakuan 2 (P_2), dan perlakuan 3 (P_3) ($p < 0,05$). Kontrol positif tidak berbeda dengan P_1 . Ini berarti jumlah pada pemberian rifampisin sama dengan pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* 60 mg/kgbb. Pada P_2 dan P_3 tidak terdapat perbedaan jumlah limfosit, tetapi P_3 mempunyai jumlah monosit yang sama dengan kontrol negatif ($p > 0,05$). Ini berarti pada pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* dosis 180 mg/kgbb mempunyai efek yang sama dengan kontrol negatif. Menurunnya jumlah monosit dapat terjadi karena alkaloid *Achyranthes aspera* kemungkinan dapat menghambat siklooksigenase yang berperan pada konversi asam arakidonat sehingga pembentukan prostaglandin yang sangat berperan penting terjadinya radang dan jalur lipooksigenase juga dihambat (Ganiswara, 2001).

Perubahan leukosit pada darah mencit yang telah terinfeksi kuman tuberkulosis, setelah pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* merupakan cara pencarian dan penemuan obat antituberkulosis yang mempunyai khasiat sebagai antimitosis dan anti radang. Diduga alkaloid tersebut dapat menghambat jalur siklooksigenase sehingga metabolit prostaglandin yang terlibat pada proses radang saat terbentuknya tuberkel yang dapat menyebabkan vasodilatasi dan tidak terbentuk odema serta menghambat lipooksigenase.

Jumlah karbunkel pada permukaan paru

Berdasarkan analisis statistik menggunakan Anava diperoleh perbedaan yang nyata antara perlakuan kontrol negatif dengan kontrol positif dan perlakuan 0 (P_0), perlakuan 1 (P_1), perlakuan 2 (P_2), dan perlakuan 3 (P_3) ($p < 0,05$). Kontrol positif tidak berbeda dengan P_1 , P_2 dan P_3 . Ini berarti pemberian rifampisin dengan dosis 2,184 mg/20 gram mencit sama dengan pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* dosis 60 mg/kgbb, 120 mg/kg bb dan 180 mg/kgbb. Pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* 60 mg/kgbb dapat membunuh kuman tuberkulosis sehingga mengurangi jumlah terbentuknya karbunkel pada paru mencit yang tertular *Mycobacterium tuberculosis*.

Sel Paru yang Mengalami Apoptosis

Berdasarkan analisis statistik menggunakan Anava diperoleh perbedaan yang nyata antara perlakuan kontrol negatif dengan kontrol positif dan perlakuan 0 (P_0), perlakuan 1 (P_1), perlakuan 2 (P_2), dan perlakuan 3 (P_3) ($p < 0,05$). Kontrol positif tidak berbeda dengan P_1 , P_2 , dan P_3 . Ini berarti pemberian

rifampisin dengan dosis 2,184 mg/20 gram mencit sama dengan pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* dosis 60 mg/kgbb, 120 mg/kg bb dan 180 mg/kgbb. Pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* 60 mg/kgbb dapat membunuh kuman tuberkulosis sehingga mengurangi jumlah sel paru yang mati apoptosis.

Salah satu proses apoptosis dapat terjadi akibat adanya kerusakan pada mitokondria. Seperti diketahui mitokondria sangat berperan dalam proses reaksi oksidasi dan reduksi sel dalam menghasilkan *adenosine threephosphate* (ATP), disamping berperan dalam proses metabolisme sel juga sebagai tempat sintesis lemak dan protein yang diperlukan oleh sel. Adanya kerusakan pada mitokondria akan memicu terjadinya peningkatan sintesis Sitokrom C. Adanya peningkatan sitokrom C akan menstimulasi terbentuknya apoptosis aktifating faktor 1 (APAF 1) dan terbukanya PT pore. Akibat perubahan-an ini akan berakibat aktivasi caspase 3 yang merupakan caspase eksekutor yang berasal dari caspase inisiator (Caspase 9). Aktivasi caspase 3 akan menyebabkan enzim DNA ase yang berlebihan yang berakibat terjadinya fragmentasi DNA yang menyebabkan kematian sel dalam bentuk apoptosis (Lantuejoul et al., 2004; Meles et al., 2006). Jalur apoptosis yang melibatkan caspase terjadi saat ada rangsangan apoptosis yang selanjutnya menyebabkan pelepasan sitokrom-c kedalam sitosol, kemudian bersama adaptor Apaf-1 merangsang dimerisasi dan aktivasi caspase-9, selanjutnya akan mengaktifkan caspase-3 dan satu dari efektor caspase membelah, sejumlah target sel termasuk *inhibitor caspase deoxyribonuclease* (ICAD) yang selanjutnya akan terjadi apoptosis. Jalur lain terjadinya apoptosis adalah pelepasan *apoptotic induction factor* (AIF) dari mitokondria kedalam sitosol, yang berperan terjadinya pelepasan sitokrom-c melalui faktor sistolik yang selanjutnya akan mengaktifasi caspase 7 dan 8 yang merupakan caspase inisiator untuk selanjutnya mengaktifasi caspase-3 yang merupakan caspase eksekutor yang menentukan terjadinya apoptosis (Reed, 2000; Finkel, 2001).

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa alkaloid *Achyranthes aspera* menyebabkan penghambatan terbentuknya sel karbunkel dan penurunan sel paru yang mengalami apoptosis pada sel paru yang terinfeksi tuberkulosis. Pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* mulai pada 60 mg/kgbb menyebabkan penurunan jumlah total leukosit, jenis leukosit yang sama dengan pemberian rifampisin.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts B. 2005. Leucocyt function and percentage breakdown. *Molecular Biology of The Cell* 4: 41-43.
- Chabner BA, Bone SM, Coelin BM, Meinik II, Duona BN, Canter SW, Wiese TE, Cleveland TE, Mc-Lachian JA. 2001. Phytochemical Gliceolin Isolated from Soy Mediate Antihormonal Effect Throughh Estrogen Receptor Alpha anf Beta. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86: 1750-1758.
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2006. Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis, Cetakan ke-2. p1-131
- Duarte R, Kindlalan JM, Carracedo J, Guijo PS, Ramirez R. 2007. Mycobacterium tuberculosis induced apoptosis $\gamma\delta$ T lymphocytes from patients with advanced clinical froms of active tuberculosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 4: 14-18.
- Finkel E. 2001. The mitochondrian: is it central to apoptosis?. *Science* 292: 624-626.
- Ganiswara SG. 2001. Farmakologi dan Terapi. Editor bagian Farmakologi Universitas Indonesia. Jakarta.
- Haas WP, Pereria, Tonegawa S. 2003. Gamma/delta cells. *Annual Review Immunology* 11: 637-685.
- Iseman MD. 2002. Antibiotic in Tuberculosis: Clinical impact. A. *Clinician's Guide to Tuberculosis*. Philadelphia: Lipincott Williams & Wilkins.
- Kocki J, Kolano J, Cloch M, Dmoszynsk A, Wojclerowski J. 2004. The activity of Human Telomerase in the Cells of Acut Leukemia. *Folia Morphologica* 83: 127-129.
- Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Sommer HM and WC. Winn Jr. 2000. *Diagnostic Microbiology*. Third Ed. Lipincott Com. Pinnsyvania.
- Lantuejoul SJ, Soria C, Moro-Sibilot D, Morat L, Veyrenc S, Loriler P, Brichon PY, Sabatier L, Brabilia C, Brambilla E. 2004. Differential Expression of Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) in Lung Tumor. *British Journal of Cancer* 90: 1222-1229.
- Lewis R. 2005. The Rise of Antibiotic-Resistant Infections. *FDA Consumer magazine*. http://www.fda.gov/fdac/features/795_antibio.html. Download: April 15, 2013.
- Meles DK, Sastrowardoyo W, Zakaria S, Wurlina. 2006. Efek antibakterial ekstrak alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn. pada berbagai jenis bakteri. *Farmakologi FKH Unair*.
- Reed JC. 2000. Mechanism of apoptosis. *American Journal of Pathology* 157: 1415-1430.
- Yalon M, Gal S, Segev Y, Skorecki KL. 2004. Sister chromatid separation at human telomeric region. *Journal of Cell Science* 117: 1961-1970.