

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui adanya potensi neuroprotektif Pegagan melalui mekanisme peningkatan distribusi fosfolipid pada tikus pasca induksi TBI. Secara umum, penelitian ini ditujukan untuk membuktikan dan membandingkan efek neuroprotektor *phytosome* ekstrak Pegagan terhadap terapi Citicoline yang ditandai dengan peningkatan distribusi fosfolipid.

Penelitian ini menggunakan desain *True Experimental* di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Dalam penelitian ini digunakan tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan, usia 4 - 5 bulan, berat badan 200 - 300 gram. Desain penelitian dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2, dan kelompok perlakuan 3. Kelompok kontrol positif, perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3 diberikan induksi TBI. Kelompok perlakuan 1 diberikan *phytosome* ekstrak Pegagan 90 mg/kgBB pasca TBI. Kelompok perlakuan 2 diberikan Citicoline 250 mg/kgBB pasca TBI. Sementara, kelompok perlakuan 3 diberikan *phytosome* ekstrak Pegagan 90 mg/kgBB dan Citicoline 250 mg/kgBB. Pada keseluruhan kelompok dilakukan pembedahan otak pada hari ke-3 dan dilakukan analisa perhitungan distribusi fosfolipid melalui pengecatan imunohistokimia yang selanjutnya diamati dengan *software scan dot slide Olivya*. Berdasarkan rumus Federrer, jumlah sampel minimal / perlakuan pada penelitian ini adalah 5, dan dalam penelitian ini

menggunakan 6 sampel tiap perlakuan. Jumlah total yang dibutuhkan 30 tikus menggunakan *simple random sampling*.

Komponen utama sediaan terapi pasca TBI yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia herba Pegagan. Bagian tanaman Pegagan yang digunakan dalam ekstraksi adalah seluruh bagian (herba) sebagaimana tercantum dalam *WHO Selected Medicinal Plant* yang menyebutkan bahwa kandungan senyawa marker asiatikosida tersebar di seluruh bagian tanaman Pegagan (WHO, 1999). Proses ekstraksi herba Pegagan menggunakan metode maserasi. Pemilihan metode ini didasarkan pada sifat fisikokimia dari senyawa yang akan diekstraksi. Kadar asiatikosida dan senyawa triterpen di dalam herba Pegagan akan menurun seiring dengan peningkatan suhu dan juga aktivitas sebagai antiinflamasi juga akan menurun (Kormin, 2005). Sehingga pemilihan metode maserasi yang digunakan untuk ekstraksi sudah tepat karena metode maserasi merupakan metode ekstraksi dingin. Proses maserasi dilakukan selama 24 jam dan dilakukan remaserasi sebanyak empat kali agar pelarut tidak dalam keadaan jenuh sehingga terjadi kontak antara pelarut dengan sel tanaman sehingga dapat didapatkan hasil yang maksimal. Maserat yang didapat masih mengandung pelarut etanol, sehingga untuk didapatkan ekstrak kental dengan pelarut minimal, diperlukan penguapan menggunakan *rotary evaporator* dengan kecepatan putar 70 rpm dan suhu 40°C. Ekstrak kental yang didapatkan kemudian dikeringkan dengan menggunakan *vacum drying* untuk meminimalkan kandungan air pada ekstrak kering, sehingga tidak rentan mengalami ketidakstabilan akibat mikroorganisme.

Dalam proses ekstraksi Pegagan melalui proses maserasi, digunakan pelarut atau larutan penyari etanol dengan konsentrasi 70%. Hal ini

dikarenakan berdasarkan studi, luas area bercak asiaticosida yang terkandung dalam sari herba Pegagan hasil penyarian dengan etanol 70% menghasilkan nilai tertinggi dibandingkan dengan hasil penyarian dengan pelarut yang lain. Disebutkan pula, semakin polar cairan penyari yang digunakan semakin kecil kadar asiaticosida yang tersari. Hal ini menunjukkan bahwa aglikon triterpen dari asiaticosida tersebut bersifat non polar, sehingga walaupun kemudian berikatan dengan 3 molekul gula masih tetap kecil kelarutannya dalam air dan lebih larut etanol terutama etanol 70%. Penyari etanol 95% misalnya, jarang digunakan sebagai pelarut dalam industri ekstrak bahan obat alami, karena terlalu banyaknya klorofil yang ikut terlarut, sehingga ekstrak yang diperoleh menjadi sangat lengket dan sulit untuk dikeringkan (Pramono dan Ajiastuti, 2004).

Pegagan telah diketahui memiliki efek farmakologis pada sistem saraf dengan berbagai kandungan konstituen aktif, diantaranya adalah asiaticosida dan madekasosida yang termasuk dalam golongan senyawa saponin triterpenoid. Untuk memastikan adanya kandungan senyawa asiaticosida dalam ekstrak Pegagan dilakukan uji kualitatif. Sementara untuk mengetahui kadarnya dilakukan uji kuantitatif. Uji kualitatif dilakukan menggunakan KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Eluen sebagai fase gerak yang digunakan adalah kloroform - asam asetat glasial - metanol - air (60 : 32 : 12 : 8) dengan konstanta dielektriknya sebesar 13,575. Plat KLT disemprot menggunakan penampak noda anisaldehyd asam sulfat dengan pemanasan 110°C selama 10 menit atau hingga terlihat noda berwarna ungu dan akan memudar dengan cepat, sehingga perlu dilakukan pengamatan lebih lanjut menggunakan sinar UV pada panjang gelombang 365 nm. Hasil Rf standard asiaticosida sebesar 0,2875 dan Rf ekstrak Pegagan sebesar 0,2750. Hal ini dikarenakan asiaticosida cenderung terikat kuat oleh

lempeng KLT yang berupa gel silika bersifat polar, sedangkan eluen cenderung bersifat non polar. Sementara, uji kuantitatif ekstrak Pegagan dilakukan menggunakan LC-MS/MS (*Liquid Chromatography – Mass Spectra / Mass Spectra*). Kondisi operasional yang digunakan selama analisis, yaitu *autosampler* dengan tipe *Acella* yang diatur pada suhu 10°C dan volume injeksi sebesar 20 µl. Eluen yang digunakan adalah air dan asetonitril yang ditambahkan asam format 0,1% dengan kecepatan alir sebesar 250 µl/menit. Sebelum dilakukan penentuan kadar, dibuat terlebih dahulu kurva baku dari larutan standar. Larutan standar yang digunakan adalah pada konsentrasi 400, 600, 800, 1000, 2000, dan 4000 ppm, dimana penentuan konsentrasi ini didasarkan pada penentuan nilai LOD (Zulkarnaen, 2014). Hasil kromatogram LC-MS/MS menunjukkan adanya senyawa asiatikosida sebanyak 0.232 % dengan berat molekul $m/z = 957,00$ yang dikalkulasikan untuk $m/z = 469,54 - 470,89$. Menurut Wagner pada *Plant Drug Analysis* (1996), noda senyawa asiatikosida terletak pada rentang R_f 0.2 – 0.35. Sementara, menurut Bermawie *et al.* (2008), kadar asiatikosida dalam Pegagan, berada pada kisaran 0,15% - 1,49%. Dengan hasil tersebut secara kualitatif dan kuantitatif senyawa asiatikosida terdapat pada ekstrak etanol 70% Pegagan dan memenuhi rentang kadar sesuai dengan literatur.

Komponen kimia yang terkandung dalam ekstrak Pegagan cenderung bersifat polar, terutama asiatikosida, karena kandungan gugus gula di dalamnya yang memberikan sifat menjadi lebih polar. Sedangkan, salah satu karakteristik senyawa dapat menembus membran sawar otak atau *blood brain barrier* (BBB) adalah substansi yang memiliki koefisien partisi tinggi atau bersifat lipofilik (larut lemak) dan ukuran partikel yang kecil, sehingga dapat menembus sel endotel membran sawar otak (Gomes *et al.*, 2009). Oleh karena itu, diperlukan modifikasi

kepolaran dari ekstrak Pegagan dalam rangka meningkatkan absorpsinya ke dalam BBB, yaitu dengan memformulasikannya dalam bentuk *phytosome*.

Pada tahapan pembuatan *phytosome* ekstrak Pegagan, ekstrak dilarutkan terlebih dahulu dalam etanol 70% dengan perbandingan 1 : 1 menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah homogen, ditambahkan lesitin (sebagai fosfatidilkolin) dan dicampur dengan menggunakan *magnetic stirrer* dengan pemanasan pada suhu 40°C. Kecepatan putar *magnetic stirrer* sebesar 1700 rpm selama ± 4 jam. Untuk membentuk lapisan tipis dan menghilangkan pelarut organik maka dilakukan penguapan pelarut dengan *rotary evaporator* tanpa menggunakan suhu. Setelah lapisan terbentuk dilakukan hidrasi dengan menggunakan *aqua* bebas CO₂ dan distirer kembali selama ± 5 jam.

Untuk mengetahui morfologi dan ukuran partikel *phytosome* dilakukan evaluasi menggunakan TEM (*Transmission Electron Microscopy*). Berdasarkan hasil evaluasi, diperoleh bahwa ukuran partikel *phytosome* ekstrak Pegagan 50 – 200 nm. Hal tersebut terlihat dari keragaman ukuran partikel yang teramati pada hasil TEM. Morfologi *phytosome* ekstrak Pegagan terlihat bahwa adanya lapisan fosfatidilkolin yang mengelilingi ekstrak. Berdasarkan hasil pengamatan TEM, maka *phytosome* ekstrak Pegagan digolongkan ke dalam *Small Unilamellar Vesicle* (SUV). Didapatkan rentang diameter *phytosome* antara 1,39 – 2,06 µm. Keragaman ukuran partikel dari *phytosome* dikarenakan pada proses pembuatan menggunakan *magnetic stirrer*, alat tersebut tidak mampu menjangkau gelas kaca di setiap sudutnya, sehingga partikel *phytosome* yang terbentuk kurang homogen. Pada umumnya alat yang digunakan dalam proses pembuatan liposom yaitu *High Pressure Homogenizer* sehingga dihasilkan ukuran partikel yang seragam.

6.1.1 Mekanisme Perbaikan Sel Saraf melalui Distribusi Fosfolipid

Berdasarkan uji Anova dari hasil penelitian ini, menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 ($p < 0.05$) terhadap peningkatan distribusi fosfolipid. Hal ini disebabkan karena *phytosome* ekstrak Pegagan memiliki efek neuroprotektor dengan memperbaiki fungsi sel saraf melalui remielinasi saraf yang rusak. Pemberian terapi formulasi *phytosome* ekstrak Pegagan saja dan kombinasinya dengan Citicoline memiliki efek yang lebih baik daripada pemberian terapi Citicoline saja. Hal ini disebabkan *phytosome* dapat meningkatkan kelarutan konstituen aktif Pegagan dalam lipid BBB, sehingga efek terapeutik yang dihasilkan juga dapat meningkat. Selain itu, dengan kandungan fosfatidilkolin dari *phytosome*, dapat dijadikan sebagai tambahan nutrisi, yaitu sebagai penambah pasokan fosfolipid yang merupakan bahan dasar dalam sintesis mielin (Amin dan Bhat, 2012).

Pegagan telah diketahui memiliki efek neuroprotektif. Beberapa mekanisme farmakologis yang terkait dengan efek neuroprotektor, diantaranya adalah sebagai agen anti inflamasi, antioksidan, dan stimulator dari aktivasi *growth factor*. Kandungan konstituen aktif Pegagan yang diketahui memiliki efek neuroprotektor adalah asiatikosida dan madekasosida. Mekanisme lain, terkait efek neuroprotektor Pegagan adalah melalui inhibisi enzim, mencegah pembentukan plak *amyloid* pada penyakit Alzheimer, neurotoksisitas terhadap dopamin pada penyakit Parkinson, meningkatkan jumlah dendrit saraf, menurunkan apoptosis neuron, dan menurunkan stres oksidatif (Rao *et al.*, 2008; Orhan, 2012; Shinomol dan Muralidhara, 2008).

Berdasarkan penelitian ini, didapatkan bahwa *phytosome* ekstrak Pegagan memiliki efek neuroprotektor melalui mekanisme remielinasi saraf yang

rusak. Mekanisme Pegagan dalam remielinasi adalah dengan menstimulasi Neuregulin-1 pada oligodendrosit. Mielinasi dimulai dengan ekspresi NRG-1 oleh akson yang akan berinteraksi dengan reseptor ErBb pada oligodendrosit. Ikatan NRG-1 dengan ErBb akan memulai proses *cascade second messenger*, dimulai dari peningkatan akumulasi ion Ca^{2+} , pengaktifan *phosphatidylinositol-3-kinase* (PI3K), fokal adhesi kinase, dan pengaktifan mTOR kinase yang menyebabkan aktivasi gen mielin (*Krox-20* dan *P0*) pada inti sel oligodendrosit (Taveggia *et al.*, 2010). Aktivasi gen *Krox-20* diperkirakan menjadi pemicu pembentukan fosfolipid baru dalam sel saraf.

Mekanisme lain *phytosome* ekstrak Pegagan sebagai neuroprotektor adalah dengan melawan terjadinya proses kerusakan oksidatif. Hal ini terjadi karena fitokonstituen Pegagan mampu mereduksi terjadinya *lipid peroxidation* (LPO) dan mereduksi level *protein carbonyl* (PCO). Peroksidasi lipid dimonitoring dengan level *malonaldehyde* (MDA) di dalam darah, semakin rendah level MDA semakin rendah pula terjadinya peroksidasi lipid. *Intake* fitokonstituen Pegagan dapat menghambat aktivasi enzim *radical-scavenging* (*superoxide dismutase* dan *catalase*) yang ditentukan dengan penghambatan dekomposisi H_2O_2 dan peningkatan jumlah *nitrobluetetrazolium*. Mekanisme ini selanjutnya mampu menurunkan level MDA di dalam darah, yang mengindikasikan terjadinya penurunan peroksidasi lipid (EMA, 2010). Peroksidasi lipid merupakan proses yang bersifat kompleks akibat reaksi asam lemak tak jenuh ganda penyusun fosfolipid membran sel dengan *reactive oxygen species* (ROS), membentuk molekul hidroperoksida (Robles *et al.*, 2001). Reaksi ini terjadi melalui 3 tahap, yaitu inisiasi, propagasi, dan terminasi. Peroksidasi asam lemak tak jenuh merupakan reaksi rantai radikal bebas yang diinisiasi oleh abstraksi atom

hidrogen pada gugus metilen rantai asam lemak. Kecepatan reaksi propagasi ditentukan oleh energi disosiasi ikatan karbon-hidrogen rantai lipid. Radikal karbon yang terbentuk pada reaksi inisiasi cenderung menjadi stabil melalui reaksi dengan radikal karbon maupun radikal lain yang terbentuk pada tahap propagasi. Pada tahap reaksi terminasi, akan memicu peningkatan reaksi peroksidasi lipid. Molekul hidroperoksida yang terbentuk akan merusak struktur penting asam lemak tak jenuh pada membran fosfolipid sel saraf (Uchida *et al.*, 1998). Jika terjadinya peroksidasi lipid mampu dihambat, maka fosfolipid dapat terdistribusi normal pada membran sel saraf, sehingga efek neuroprotektor akan dihasilkan.

Disisi lain, pemberian *phytosome* ekstrak Pegagan yang dikombinasikan dengan Citicoline, yaitu pada kelompok perlakuan 3 memiliki hasil terbaik dalam peningkatan distribusi fosfolipid. Hal ini disebabkan Citicoline memiliki efek neuroprotektor. Penggunaan terapi Citicoline dalam studi disebutkan, mampu meningkatkan aktivitas *Insulin reseptor substrat-1* (IRS-1), yaitu anggota dari protein adaptor yang membentuk tautan sinyal dari aktivator ke beberapa efektor untuk memodulasi proses normal dalam pertumbuhan, metabolisme, kelangsungan hidup, dan diferensiasi sel. Meskipun sinyal protein IRS melalui banyak jalur, fungsi utamanya adalah mengatur jalur *extracellular signaling-regulated kinase* (ERK) dan jalur *phospholipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3-K). PI3-K dikenal untuk menghubungkan sinyal IGF-IR dengan aktivasi jalur Akt / PKB terkait perlindungan sel dari proses apoptosis. Aktivasi PI3-K mengatur Akt, yaitu *serine-threonine kinase* yang memainkan peran penting dalam kelangsungan hidup sel. Perlindungan Akt terhadap apoptosis

melibatkan penghambatan langsung (fosforilasi) dari sinyal pro-apoptosis seperti Bad dan FOXO3A (Pan, 2007).

Caspase merupakan protease yang terekspresi selama iskemia fokal dan global pada otak (Khoo, 2010). Pada kondisi TBI, caspase juga diekspresikan. Sehingga, melalui fosforilasi caspase, maka proses apoptosis sel saraf pasca TBI dapat dihambat dan efek neuroprotektif pun dihasilkan. Dengan terhambatnya proses apoptosis sel, maka distribusi fosfolipid plasma membran sel saraf tidak terganggu dan terhambat penurunan distribusinya.

Jalur lain menyebutkan PI3K berperan memfosforilasi *phosphatidylinositol-biphosphates* (PIP2) menghasilkan *phosphatidyl-inositol-trifosfat* (PIP3). PIP3 bertindak sebagai situs *docking* untuk Akt dan PDK di membran plasma. Setelah fosforilasi oleh PDK, Akt menjadi aktif dan memfosforilasi, sehingga terjadi aktivasi *mammalian target of rapamycin* (mTOR) yang berperan dalam regulasi pertumbuhan sel (Alshammari, 2014). Diketahui bahwa dengan terjadinya aktivasi mTOR, maka akan mengaktifkan gen mielin (*Krox-20* dan *P0*) pada inti sel oligodendrosit (Taveggia *et al.*, 2010). Aktivasi gen *Krox-20* diperkirakan menjadi pemicu pembentukan fosfolipid baru dalam sel saraf.

Selain itu, efek neuroprotektor Citicoline juga terjadi melalui mekanisme perbaikan membran sel saraf yang rusak dan pencegahan terbentuknya radikal bebas. Mekanisme ini diawali dengan pecahnya *CDP-choline* menjadi *choline* dan *cytidine*. *Choline* akan dimetabolisme dalam tubuh berturut-turut menjadi fosfokolin, *CDP-choline*, hingga menjadi fosfolipid yang bersama Triasil Gliserol akan membentuk membran sel saraf. Mekanisme lainnya *CDP-choline* bersama *diglyceride* akan dimetabolisme menjadi *phosphatidylcholine* dan *monoglyceride*

yang mencegah terbentuknya *free fatty acids* yang akan membentuk radikal bebas (Zweifler, 2002).

Hasil yang diuraikan di atas menunjukkan pemberian *phytosome* ekstrak Pegagan dengan kombinasi Citicoline mampu meningkatkan distribusi fosfolipid lebih tinggi pada perlakuan terhadap tikus pasca TBI. Sehingga, kelompok perlakuan 3 yang diberikan kombinasi terapi *phytosome* 90 mg/kgBB dan Citicoline 250 mg/kgBB dapat dikatakan paling optimal dalam memberikan efek neuroprotektor jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya yang dibuktikan dengan hasil peningkatan distribusi fosfolipid paling tinggi.

6.2 Implikasi terhadap Bidang Kefarmasian

Modifikasi sistem penghantaran obat baru dengan berbagai macam cara ditujukan untuk mengoptimalkan karakteristik senyawa, sehingga meningkatkan penghantarannya ke dalam tubuh dan berdampak pada peningkatan efektifitas terapi. Salah satu sistem penghantaran obat, yaitu *phytosome*. *Phytosome* merupakan teknologi penghantaran obat pengembangan dari teknologi liposom yang mampu meningkatkan absorpsi senyawa aktif, dengan ikatan kimia antara fosfatidilkolin dan fitokonstituen yang menunjukkan stabilitas baik diantara keduanya dan secara khusus ditujukan untuk meningkatkan penghantaran fitokonstituen ke dalam tubuh. Diharapkan dengan peningkatan penghantaran ke dalam tubuh, maka akan mampu meningkatkan pula efikasi. Melihat tingginya angka kejadian TBI, maka perlu terapi baru yang mampu menekan terjadinya keparahan TBI. Mengingat di Indonesia masih memakai terapi sintesis Citicoline sebagai obat neuroprotektor utama yang diketahui dapat memperbaiki dan mencegah kerusakan lebih lanjut pada membran sel saraf yang rusak akibat trauma, namun tidak memberikan perbaikan dari segi fungsional maupun kognitif

pasca TBI, maka Pegagan dengan kandungan asiatikosida ini berpotensi besar untuk dijadikan terapi pasca TBI. Melalui hasil penelitian ini yang menyatakan bahwa pemberian kombinasi *phytosome* ekstrak Pegagan dan Citicoline menunjukkan peningkatan distribusi fosfolipid lebih baik dibandingkan pemberian Citicoline saja, maka *phytosome* ekstrak Pegagan berpotensi menjadi obat standar baru dalam terapi pasca TBI.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini terkendala pada alat pembuatan *phytosome*. Alat pembuatan *phytosome* yang digunakan adalah *magnetic stirrer*, sehingga partikel *phytosome* yang dihasilkan kurang seragam. Selain itu, berdasarkan *roadmap* pengembangan obat, penelitian ini masih berada pada tahap uji pre klinis, yaitu secara *in vivo* terhadap hewan coba, sehingga perlu dilakukan studi lebih lanjut ke tahap uji klinis dan tahap-tahap berikutnya. Dari segi sediaan formulasi terapi, juga masih memerlukan uji farmakokinetika dan farmakodinamika, serta stabilitas dan toksisitas agar nantinya mampu diperoleh efektifitas terapi yang optimal untuk kondisi pasca TBI. Sehingga, ke depannya mampu diterapkan untuk terapi pada manusia dengan kondisi pasca TBI.