

Efek Ekstrak Daun Kitolod (*Isotoma longiflora*) Terhadap Neovaskularisasi Kornea Tikus Wistar Model Trauma Kimia

The Effect of Isotoma longiflora Leaves Extract to The Cornea Neovascularization of Wistar Rats Chemical Trauma Model

Hasbi Maulana Arsyad¹, Cicih Komariah², Muhamad Hasan³

¹Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

²Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

³Laboratorium Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Jalan Kalimantan No.37 Kampus Tegalboto, Jember 68121

Alamat email korespondensi arsyadhasbi13@gmail.com

ABSTRAK

Trauma kimia mata dapat disebabkan oleh pestisida. Di Indonesia, 78,9% petani mengalami keluhan pada mata akibat paparan pestisida. Kejadian trauma kimia basa pada mata dapat menyebabkan *cornea neovascularization* (CNV). Trauma kimia basa menyebabkan inflamasi hebat sehingga terbentuk vaskularisasi pada kornea yang seharusnya dalam keadaan avaskular. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek ekstrak daun kitolod (*Isotoma longiflora*) terhadap neovaskularisasi kornea tikus wistar model trauma kimia. Penelitian ini menggunakan metode *true experimental design* dengan rancangan *post-test only controlled group design*. Sampel penelitian ini tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) sebanyak 30 ekor yang dibagi menjadi enam kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol positif (*dexamethasone* 0,1%), 1 kelompok kontrol negatif (DMSO 0,1%), dan 4 kelompok perlakuan ekstrak daun kitolod (0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml; 2 mg/ml). Hasil uji *Shapiro-Wilk* dan *Levene's test* menunjukkan nilai $p > 0,05$ yang artinya data terdistribusi normal dan memiliki varian yang sama. Hasil uji *One Way ANOVA* didapatkan perbedaan signifikan antarkelompok pada hari ke-7 ($p = 0,001$). Hasil uji *Post Hoc LSD* didapatkan kelompok P3 dan P4 berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif, P1 dan P2. Kelompok P3 dan P4 dengan dosis ekstrak daun kitolod 1 mg/ml dan 2 mg/ml mampu menghambat neovaskularisasi kornea.

Kata kunci: ekstrak daun kitolod, CNV, trauma kimia mata

ABSTRACT

Eye chemical trauma was an eye trauma caused by a substance with a $pH < 7$ (acid) and $pH > 7$ (alkali). Chemical trauma can be caused by pesticides. In Indonesia, 78.9% of farmers had eye complaints due to pesticides exposure. The occurrence of alkali chemical trauma of eye could cause cornea neovascularization (CNV). Alkali chemical trauma caused intense inflammation resulting a vascularization of the cornea that was supposed to be avascular. The purpose of this study was to find out the effect of Isotoma longiflora leaves extract the cornea neovascularization of wistar rats chemical trauma model. This research used true experimental design method with post-test only controlled group design. The sample of this study were 30 male wistar rats (Rattus norvegicus) divided into six groups, 1 positive control group (dexamethasone 0.1%), 1 negative control group (DMSO 0.1%), and 4 treatment groups of Isotoma longiflora leaves extract (0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml). The result of Shapiro-Wilk and Levene's test showed that $p > 0.05$ that means the data was normally distributed and has the same variant. One Way ANOVA test results obtained significant differences between groups on the 7th day ($p = 0.001$). The result of Post Hoc LSD test showed that group P3 and P4 were significantly different to negative control, P1 and P2 groups. P3 and P4 groups with 1 mg/ml and 2 mg/ml Isotoma longiflora leaves extract could inhibit cornea neovascularization.

Keywords: *Isotoma longiflora leaves extract, CNV, eye chemical trauma*

Pendahuluan

Trauma kimia pada mata disebabkan oleh bahan-bahan kimia yang tersemprot atau terpercik pada wajah yang tidak menggunakan alat perlindungan diri (APD). Di Amerika Serikat, sekitar 2,4 juta trauma okuler setiap tahunnya, dimana sebanyak 20.000-68.000 orang mengalami trauma yang mengancam penglihatan dan 40.000 orang kehilangan penglihatan. Trauma kimia pada mata meliputi hampir 26,5% dari seluruh trauma pada mata dan lebih dari 23% pasien mengalami kecacatan penglihatan permanen (Randleman, 2010). Berdasarkan jenis zat kimia yang mengakibatkan trauma, trauma kimia pada mata dibedakan menjadi 2, yaitu trauma kimia asam dan trauma kimia basa. Angka kejadian trauma kimia basa lebih tinggi daripada angka kejadian trauma kimia asam akibat kecelakaan kerja (Schrage *et al*, 2011).

Trauma kimia dapat disebabkan oleh pestisida. Di Indonesia, 78,9% petani mengalami keluhan mata akibat paparan pestisida (Maranata, 2014). Hal ini menunjukkan bahwa trauma kimia mata akibat pestisida sangat tinggi karena penggunaan APD petani yang masih rendah. Trauma kimia basa menyebabkan inflamasi hebat sehingga terbentuk vaskularisasi (pembuluh darah) pada kornea yang seharusnya dalam keadaan avaskular yang disebut *cornea neovascularization* (CNV). (Shakiba *et al*, 2009).

Tanaman kitolod yang terbukti dapat digunakan sebagai obat tradisional, antara lain untuk penyakit asma, bronkhitis, radang tenggorokan, luka, obat anti kanker, obat mata, anti-neoplastik, anti-inflamasi, hemostasis, analgesik (Hariana, 2013). Daun kitolod memiliki kandungan alkaloid, saponin, flavonoida, dan polifenol (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 1994). Kandungan flavonoida dan polifenol yang terdapat pada tanaman kitolod tersebut dapat berperan sebagai anti-inflamasi sehingga dapat menurunkan neovaskularisasi pada kornea yang terbentuk akibat paparan zat kimia basa pada mata. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek ekstrak daun kitolod (*Isotoma longiflora*) terhadap neovaskularisasi kornea tikus wistar model trauma kimia.

Metode Penelitian

Sampel penelitian ini ialah tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*). Jumlah sampel penelitian

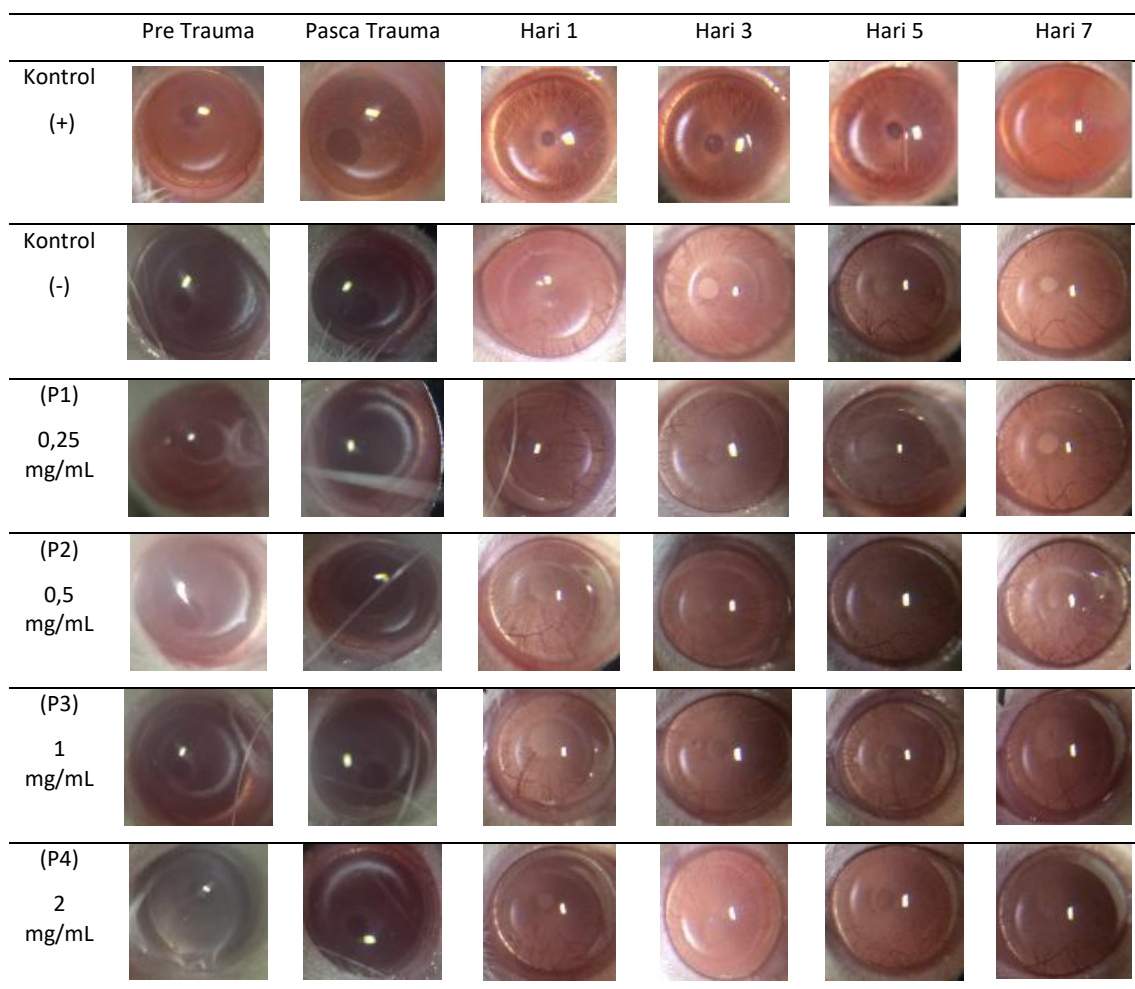
ini sebanyak 30 ekor yang dibagi menjadi enam kelompok masing-masing 4 ekor tikus uji dan 1 ekor tikus cadangan. Kelompok pertama merupakan kelompok positif yang diberikan trauma kimia mata pestisida Rotraz 200EC dan terapi *dexamethasone*, kelompok kedua merupakan kontrol negatif diberikan trauma kimia mata pestisida Rotraz 200EC dan DMSO 0,1%, kelompok P1 sampai P4 diberikan trauma kimia mata pestisida Rotraz 200EC dan ekstrak daun kitolod dengan dosis berturut-turut 0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml; dan 2 mg/ml.

Sebelum perlakuan, tikus diaklimatisasi selama 7 hari. Tikus dianastesi intraperitoneal dengan Midazolam dan Pantocain 0,5% topikal. Permukaan kornea dikeringkan terlebih dahulu menggunakan *cotton bud*. Pada sentral kornea mata kanan tikus ditempel dengan kertas filter dengan diameter 1 mm yang telah direndam dalam larutan insektisida Rotraz 200EC selama 2 menit. Kornea tikus kemudian dibilas dengan aquadest selama 2 menit hingga pH netral (Hepsen, 1998). Perlakuan diberikan segera setelah tikus diinduksi trauma kimia yaitu 1 tetes dan diberikan kembali dalam 1 jam kemudian. Setelah itu, perlakuan dilakukan secara rutin dengan frekuensi 4 kali 1 tetes per hari selama 7 hari menggunakan botol tetes mata komersial. Rincian waktu pemberian perlakuan setiap harinya, yaitu pada pukul 08.00; 11.30; 15.00; dan 18.30 pada sentral mata kanan tikus.

Pengukuran luas area neovaskularisasi dilakukan pada hari terakhir perlakuan atau hari ke 7 pascatrauma kimia. Tikus dianestesi dengan metode yg sama saat dilakukan induksi trauma kimia. Jari-jari kornea dan panjang neovaskularisasi diukur menggunakan *Castroviejo caliper* dalam satuan milimeter dengan bantuan *loop*. Luas area neovaskularisasi dihitung menggunakan rumus $C/12 \times \pi \times [r^2 - (r-L)^2]$ dan dinyatakan dalam satuan mm^2 . Data yang didapat kemudian dianalisis dengan uji normalitas *Shapiro-wilk*, uji homogenitas *Levene test*, uji *One Way Anova*, dan uji *Post-Hoc LSD* untuk mengetahui kelompok yang berbeda signifikan.

Hasil Penelitian

Hasil gambaran kornea hewan coba yang diberi perlakuan trauma kimia mata menggunakan pestisida menunjukkan neovaskularisasi kornea pada tiap kelompok yang didokumentasikan dengan perbesaran 30x dan dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Neovaskularisasi pada kornea

Hasil gambaran masing-masing kelompok didapatkan pembentukan neovaskularisasi pada kornea mata tikus. Neovaskularisasi kornea dapat terbentuk karena trauma kimia pada mata yang mengakibatkan inflamasi hebat yang akan mengakibatkan ketidakseimbangan faktor angiogenik dan faktor antiangiogenik pada kornea sehingga terjadi metabolisme asam arakhidonat dan siklooksigenase yang menghasilkan prostaglandin (PG) yang berperan penting dalam neovaskularisasi kornea (Heynes *et al*, 1989). Kelompok P4 dengan dosis ekstrak daun kitolod tertinggi (2mg/ml) merupakan kelompok dengan pertumbuhan pembentukan neovaskularisasi paling lambat, sedangkan kelompok P1 dengan dosis ekstrak daun kitolod terendah (0,25 mg/ml) merupakan kelompok dengan pembentukan neovaskularisasi paling cepat.

Hasil luas neovaskularisasi kornea hari ke 7 didapatkan data rata-rata±standar deviasi pada masing-masing kelompok dan hari yang disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Hasil rata-rata luas dan standar deviasi neovaskularisasi

Kelompok	Rata-rata ± Standar Deviasi
Kontrol +	17,61±1,15
Kontrol -	20,66±1,18
P1	20,59±2,05
P2	20,66±1,08
P3	16,50±1,80
P4	16,43±1,40

Hasil penelitian yang telah didapatkan selanjutnya dianalisis dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Rata-rata luas neovaskularisasi kornea dianalisis

persebaran data dan homogenitasnya menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan *Levene's test* yang dapat dilihat pada Tabel 2 dan 3.

Tabel 2. Tes normalitas *Shapiro-Wilk*

Kelompok	Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.
Kontrol +	,831	4	,170
Kontrol –	,987	4	,943
P1	,837	4	,188
P2	,791	4	,087
P3	,826	4	,157
P4	,979	4	,898

*Data terdistribusi normal $p>0,05$

Tabel 3. Tes homogenitas *Levene*

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,9480	5	18	,475

*Data homogen $p>0,05$

Pada hasil uji *Shapiro-Wilk* dan *Levene's test* didapatkan $p>0,05$ yang artinya data terdistribusi normal dan homogen. Selanjutnya, dilakukan uji *One Way Anova* untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Hasil uji *One Way Anova* dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji *One Way Anova*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Antar kelompok	89,756	5	17,951	8,065	,000
Dalam kelompok	40,067	18	2,226		
Total	129,823	23			

*Perbedaan rata-rata signifikan $p<0,05$

Hasil uji *One Way Anova* didapatkan nilai signifikansi sebesar $p=0,000$ ($p<0,05$) yang menunjukkan bahwa terdapat minimal dua kelompok yang memiliki rata-rata luas neovaskularisasi yang berbeda signifikan.

Hasil uji analisis *Pos Hoc* LSD didapatkan data antar kelompok signifikan ($p<0,05$). Pada kontrol positif didapatkan perbedaan yang signifikan dengan kontrol negatif, kelompok P1 dan kelompok P2. Pada kelompok P3 dan P4 didapatkan perbedaan yang signifikan dengan kontrol negatif, kelompok P1 dan kelompok P2. Pada kontrol positif dan kelompok P3

serta kelompok P4 tidak didapatkan perbedaan signifikan.

Pembahasan

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek ekstrak daun kitolod dalam menghambat neovaskularisasi kornea akibat trauma kimia mata oleh pestisida Rotraz® 200EC dengan bahan aktif amitraz. Dosis ekstrak daun kitolod yang diberikan yaitu 0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml; dan 2 mg/ml. Kontrol negatif diberikan DMSO 0,1% dan kontrol positif diberikan tetes mata *Dexamethasone* 0,1%. Ekstrak daun kitolod dijadikan sediaan tetes mata dan diberikan pada mata kanan sebanyak 1 tetes sebanyak 4 kali sehari.

Pestisida Rotraz® 200EC digunakan sebagai penyebab trauma kimia basa pada penelitian ini. Pestisida Rotraz memiliki pH 9-10 dimana pestisida tersebut bersifat basa. Substansi yang bersifat basa dapat menyebabkan terjadinya neovaskularisasi kornea, dimana terbentuknya pembuluh darah baru merupakan salah satu komplikasi yang diakibatkan karena adanya kontak zat kimia yang bersifat basa pada kornea (Fish & Davidson, 2010). Terjadinya inflamasi karena kontak zat kimia basa dengan permukaan kornea mengakibatkan terjadinya metabolisme asam arachidonat yang akan menghasilkan prostaglandin tipe E dan leukotrien yang berperan dalam proses neovaskularisasi kornea (Rochels, 1984).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek ekstrak daun kitolod dalam menghambat neovaskularisasi kornea akibat trauma kimia akibat pestisida Rotraz® 200EC. Didapatkan luas rata-rata neovaskularisasi pada kelompok negatif $20,66\pm 1,18$ mm² sedangkan pada kelompok positif didapatkan luas rata-rata neovaskularisasi kornea sebesar $17,61\pm 1,15$ mm². Hasil rata-rata luas neovaskularisasi kornea kelompok kontrol positif memiliki nilai yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dan menunjukkan perbedaan yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian *dexamethasone* 0,1% memberikan efek menghambat neovaskularisasi kornea akibat trauma kimia pestisida Rotraz® 200EC dengan bahan aktif amitraz.

Dexamethasone 0,1% sebagai kortikosteroid terbukti dapat menghambat neovaskularisasi pada kornea secara signifikan. Mekanisme steroid dalam menghambat neovaskularisasi yaitu dengan

menghambat metabolisme asam arachidonat. Metabolisme asam arachidonat menghasilkan prostaglandin tipe E pada siklus siklooksigenase dan leukotrin pada siklus lipooksigenase (Haynes *et al*, 1989). Prostaglandin berperan dalam memicu pembentukan neovaskularisasi kornea dengan mekanisme vasodilatasi, peningkatan permeabilitas vaskular, serta pembebasan histamin. Leukotrin berperan dalam memicu kemotaksis dari leukosit yang berperan memicu terbentuknya neovaskularisasi kornea (Smith *et al*, 1983).

Kelompok P1 memiliki rata-rata luas neovaskularisasi sebesar $20,59 \pm 2,05 \text{ mm}^2$, kelompok P2 sebesar $20,66 \pm 1,08 \text{ mm}^2$, kelompok P3 sebesar $16,50 \pm 1,80 \text{ mm}^2$, dan kelompok P4 sebesar $16,43 \pm 1,40 \text{ mm}^2$. Pada kelompok P1 dan P2 memiliki luas neovaskularisasi yang hampir sama luas dengan kontrol negatif, hal ini ditunjukkan dengan tidak didapatkannya perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok P1 dan P2. Pada kelompok P3 dan P4 dengan kelompok kontrol negatif, didapatkan rata-rata luas neovaskularisasi yang terbentuk lebih rendah dibandingkan pada kontrol negatif serta didapatkan perbedaan yang signifikan. Hal ini menunjukkan pada dosis 0,25 mg/ml dan 0,5 mg/ml ekstrak daun kitolod belum memberikan efek dalam menghambat neovaskularisasi, sedangkan pada dosis 1 mg/ml dan 2 mg/ml ekstrak daun kitolod terdapat efek dalam menghambat neovaskularisasi kornea akibat trauma kimia mata pestisida Rotraz© 200EC dengan bahan aktif amitraz.

Pada kelompok perlakuan, antara kelompok P1 dan P2 dengan kelompok P3 dan P4 memiliki perbedaan signifikan nilai rata-rata luas neovaskularisasi kornea. Kelompok P3 dan P4 memiliki nilai rata-rata luas neovaskularisasi lebih rendah dibandingkan kelompok P1 dan P2. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar dosis ekstrak daun kitolod, luas neovaskularisasi yang terbentuk semakin rendah.

Pada kelompok P3 dan P4 didapatkan rata-rata luas neovaskularisasi yang lebih rendah dibandingkan kontrol positif, akan tetapi tidak didapatkan perbedaan yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa dosis ekstrak daun kitolod dengan dosis 1 mg/ml dan 2 mg/ml mempunyai efek yang sama dengan pemberian *dexamethasone* 0,1% dalam menghambat neovaskularisasi kornea akibat trauma kimia Rotraz© 200EC dengan bahan aktif amitraz karena kandungan-kandungan senyawa yang terdapat dalam daun kitolod yaitu flavonoid,

alkaloid, saponin, dan polifenol (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 1994). Kandungan flavonoid dapat menghambat enzim oksidatif yaitu siklooksigenase (COX) yang mengkatalis pembentukan prostaglandin (PG) (Hidayati *et al*, 2008). Senyawa flavonoid juga mampu menghambat pelepasan asam arachidonat dan sudah terbukti memiliki efek antiinflamasi dengan menghambat siklooksigenase dan lipooksigenase (Mirzoeva & Calder, 1996). Senyawa alkaloid dapat menghambat angiogenesis secara selektif. Senyawa saponin dapat menghambat dehidrogenase prostaglandin dan juga dapat menghambat angiogenesis (Yanti, 2016), serta senyawa polifenol berperan sebagai antiinflamasi dan antiangiogenik. Senyawa-senyawa tersebut berperan dalam menghambat neovaskularisasi kornea akibat trauma kimia pestisida Rotraz© 200EC dengan bahan aktif amitraz.

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah hanya melakukan pengukuran luas neovaskularisasi pada kornea tikus wistar tanpa melakukan pengukuran kadar prostaglandin (PG), kadar faktor-faktor angiogenik dan anti-angiogenik yang juga berperan dalam neovaskularisasi kornea. Penggunaan alat-alat penunjang seperti slit lamp akan membuat penelitian ini menjadi lebih baik, namun tidak dapat diterapkan pada penelitian ini karena keterbatasan biaya.

Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kitolod (*Isotoma longiflora*) memiliki efek menghambat neovaskularisasi kornea setelah pemberian selama 7 hari pada mata yang mengalami trauma kimia akibat pestisida Rotraz© 200EC.

Saran

Perlu penelitian lebih lanjut mengenai penghitungan kadar prostaglandin (PG), faktor-faktor angiogenik dan anti angiogenik yang berperan dalam neovaskularisasi kornea akibat trauma kimia. Alat-alat pendukung penelitian seperti slit lamp akan sangat memudahkan penghitungan luas neovaskularisasi. Pada penelitian selanjutnya diharapkan dapat menentukan dosis efektif tetes mata ekstrak daun kitolod pada trauma kimia mata dan diharapkan dapat menggunakan hewan coba kelinci karena kornea mata kelinci yang lebih luas dibandingkan tikus.

Daftar Pustaka

- Bhanot, A., R. Sharma, dan M. N. Noolvi. 2011. Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. *International Journal of Phytomedicine* 3(1): 09–26.
- Hepsen, I.F., E. Hamdi, O. Cekic. 1998. Topically Applied Water Extract of Propolis to Suppress Corneal Neovascularization in Rabbits. *Ophthalmic Res* 31;426-431.
- Heynes, W.L., A.D. Proia, dan G.K. Klintworth. 1989. Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on corneal neovascularization in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 30:1588–1593.
- Hidayati, N.A., L. Shanti, dan D.S. Ahmad. 2008. Kandungan kimia dan uji antiinflamasi ekstrak etanol *Lantana camara* L. pada tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) jantan. *Bioteknologi* 5(1):10-17
- Hutapea, Johnny R, dkk. 1994. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*. Jilid I . Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Departemen Kesehatan RI.
- Kecova, H., Z. Hlinomazova, P. Rauer, dan A. Necas. 2004. Corneal Inflammatory Diseases – Infectious Keratitis in Dogs. *Acta Vet BRNO* 73:359-63.
- Maranata, R., I. Chahaya, dan D.N. Santi. 2014. Perilaku Petani dalam Penggunaan Pestisida dan Alat Pelindung Diri (APD) Serta Keluhan Kesehatan Petani Di Desa Suka Julu Kecamatan Barus Jahe Kabupaten Karo Tahun 2014. *Naskah Publikasi USU*.
- Mirzoeva, O.K., dan P.C. Calder. 1996. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 55:441–449.
- Randleman, JB. 2010. Chemical eye burn overview. <http://www.emedicine.com>. [Diakses tanggal 28 Agustus 2017].
- Schrage et al. 2011. *Chemical Ocular Burns: New Understanding and Treatment*. London: Springer.
- Shakiba, Y., K. Mansouri, D. Arshadi, dan N. Rezaeni. 2009. Corneal Neovascularization: Molecular Event and Therapeutic Option. *Inflammation & Allergy Drug Discovery* 3(3):221.