

Kafein Meningkatkan Ketebalan Tunika Muskularis Eksterna Rectum Embrio *Gallus gallus* Strain ISA Brown

Fitranto Arjadi ^{1*}, Evy Sulistyoningrum ²

¹Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto

²Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Indonesia Jogjakarta

email: ¹f.arjadi@yahoo.com, ²147110202@uii.ac.id

Abstrak > Kafein dipergunakan secara luas dalam konsumsi sehari-hari dan di bidang pengobatan. Kafein meningkatkan kadar katekolamin, merangsang pertumbuhan dan proliferasi otot polos dan dapat merangsang sistem saraf simpatis. Tujuan penelitian adalah mengetahui pengaruh pemberian kafein terhadap ketebalan tunika muskularis eksterna rectum embrio *Gallus-gallus strain ISA brown*. Metode penelitian adalah eksperimental dengan menggunakan tigapuluh butir telur *Gallus-gallus strain ISA brown* fertil dengan berat 60-70 gram dikelompokkan dalam 2 kelompok, 15 butir dalam perlakuan "caff" yaitu diberi kafein 0,1 mg/ml setiap hari sejak hari ke-4 masa inkubasi sampai hari ke-8 inkubasi dan kelompok kontrol mendapat aquabidestilasi dalam waktu yang sama. Hari ke-19 inkubasi, hewan coba dibedah dan diambil rectum, diukur ketebalan tunika muskularis eksterna (stratum sirkular dan stratum longitudinal) dibawah mikroskop. Hasil penelitian menunjukkan rerata ketebalan tunika muskularis rektum adalah 54,5313 μ m (stratum longitudinal, "caff") dibanding 42,0833 μ m (stratum longitudinal, "kontrol") dan 74,2969 μ m (stratum sirkular "caff") dibanding 72,7083 μ m (stratum sirkular, "kontrol") tetapi tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan dengan ketebalan tunika muskularis rektum stratum longitudinal ($t=0,442$) dan stratum sirkular ($t=0,135$) secara statistik. Kesimpulan terdapat peningkatan ketebalan tunika muskularis eksterna rektum embrio *Gallus-gallus strain ISA brown* setelah pemberian kafein walaupun secara statistik tidak signifikan.

Kata Kunci > kafein, tunika muskularis eksterna rektum, ketebalan

I. PENDAHULUAN

Kafein adalah derivat xantin yang banyak ditambahkan pada obat-obatan anti inflamasi non steroid (OAINS) yang banyak digunakan sebagai obat penghilang rasa sakit selama bertahun-tahun. Secara alamiah, kafein terkandung dalam kopi, teh, coklat, cola dan bermacam minuman ringan. Dosis satu cangkir kopi rata-rata mengandung 30-175 mg kafein, yaitu dosis yang mendekati dosis terapi [1]

Beberapa studi epidemiologis menyakini bahwa kafein meningkatkan resiko kejadian abortus spontan, tetapi hasil yang dicapai belum konsisten. Melalui mekanisme yang belum diketahui, kafein dapat melalui *barrier* plasenta masuk ke tubuh janin, sehingga dikhawatirkan dapat mengganggu proses perkembangan organ-organ tubuh [2]. Penelitian pada hewan coba menunjukkan bahwa kafein dapat memberikan efek teratogenik jika diberikan dalam dosis lebih dari 300 mg kafein tiap hari (setara kafein dalam 12-24 gelas kopi). Pada

manusia, dosis lebih dari 300 mg kafein tiap hari (setara 2-3 gelas kopi) dapat menyebabkan abortus spontan, mengganggu irama denyut jantung bayi, resiko melahirkan bayi lahir rendah, melipatduakan resiko abortus spontan dan meningkatkan kejadian *sudden infant death syndrome (SIDS)* [3].

Penelitian pada manusia, kafein dikonsumsi pada dosis sampai 400 mg/hari (6 mg/kg BB pada manusia usia 65-kg) tidak berhubungan dengan efek samping seperti gejala keracunan umumnya, efek kardiovaskuler seperti jantung berdebar-debar, status kepadatan tulang ataupun keseimbangan kalsium, perubahan kebiasaan perilaku manusia dewasa ataupun kesuburan pria. Data juga menunjukkan bahwa wanita usia reproduksi juga membutuhkan kafein dengan dosis ≤ 300 mg kafein/hari (4.6 mg/kg BB pada manusia usia 65-kg) sementara anak-anak mengkonsumsi pada dosis ≤ 2.5 mg/kg BB/hari [4].

Kafein mempunyai efek farmakologi yang bermanfaat secara klinis dengan merangsang sistem saraf pusat dan berpengaruh terhadap sistem saraf otonom, salah satunya otot polos (muskuli non striasi). Intestinum tenue sebagai bagian dari sistem gastrointestinal adalah organ tubuh yang mengandung unsur otot polos yang disebut muskuli intestinales, mendapatkan inervasi ekstrinsik dari sistem saraf simpatis maupun parasimpatis [1].

Kafein diabsorpsi semuanya di dalam sistem gastrointestinal dengan cepat dan segera didistribusikan ke seluruh jaringan tubuh. Konsentrasi puncak plasma adalah 50 μ M dan waktu paruh eliminasi antara 2.5-10 jam tetapi hal tersebut tergantung dari lingkungan dan faktor genetik. Bukti penelitian *in vitro* menunjukkan aksi seluler dapat menggambarkan efek kafein pada manusia secara *in vivo*, termasuk potensiasi kontraksi otot melalui induksi pelepasan kalsium retikulum sarkoplasma, penghambatan isoenzim fosfodiesterase dan akumulasi siklik monofosfat, inhibisi enzim glikogen fosforilase di hati dan otot, stimulasi pompa Na/K pada membran sel dan gangguan metabolisme fosfoinositida [5]. Mekanisme khas efek kafein pada otot polos pembuluh darah adalah kontraksi alamiah secara transien dan relaksasi garis prekontraksi yaitu kafein mampu menurunkan $[Ca^{2+}]_i$ setelah pengeluaran Ca^{2+} dari cadangan intrasel. Pengurangan $[Ca^{2+}]_i$ secara independen, sebagai *second messenger*, cAMP, dapat secara langsung mempengaruhi hubungan tekanan dalam otot [6].

Berbagai masalah keamanan konsumsi obat pada masa kehamilan adalah menyangkut sejauh mana obat dapat melalui *barrier* plasenta dan memberikan efek pada embrio. Oleh karena itu diperlukan penelitian lebih lanjut tentang

*) penulis korespondensi

pengaruh kafein terhadap embrio mengingat konsumsi kafein yang cukup luas di masyarakat. Penelitian ini dilakukan untuk mengamati pengaruh pemberian kafein dalam dosis tertentu pada embrio ayam (*Gallus gallus strain ISA brown*) agar dapat diperkirakan keamanan konsumsi kafein pada masa kehamilan. Pertimbangan memilih embrio ayam sebagai subyek penelitian adalah karena adanya persamaan sifat dan struktur anatomis sistem saraf otonom pada *aves* dan mamalia. Untuk membatasi ruang lingkup pembahasan diambil rektum sebagai organ yang mewakili karena mempunyai otot polos yang ketebalannya relatif besar sehingga diharapkan dapat mempermudah pengamatan dan analisisnya.

II. METODE PENELITIAN

Metode penelitian yang dilakukan adalah quasi eksperimental dengan *post test only*. Bahan penelitian adalah embrio *Gallus gallus strain ISA brown* umur 4 hari inkubasi sejumlah 30 telur, dibagi dalam kelompok kontrol dan perlakuan. Sampel penelitian adalah stratum muskularis eksterna (stratum sirkuler dan longitudinal) rektum embrio yang berumur 19 hari masa inkubasi. Alat penelitian meliputi inkubator, timbangan skala gram, bor gigi dan mata bor, lampu spiritus, spuit 1 cc, selotip steril, gelas obyek, gelas dek, satu set alat bedah, dan mikroskop. Bahan penelitian meliputi larutan kafein kadar 0,1 mg/ml, aquabides, larutan *bouin holland* dan pewarnaan HE.

Cara penelitian adalah telur ditimbang dengan berat antara 60-70 kg, dikelompokkan menjadi kelompok perlakuan kafein diberi kode "caff" sebanyak 15 butir dan kelompok kontrol diberi kode "kontrol" sebanyak 15 butir. Dinding cangkok telur diusap kapas beralkohol 70%, dibor melingkar dengan diameter 1cm, cangkok telur diangkat dengan pinset dan selaputnya dilepas dengan pinset steril dan gunting steril. Lubang kemudian ditutup dengan selotip steril dan diletakkan dalam inkubator dengan suhu 37°C dengan posisi lubang menghadap keatas dan dianggap sebagai hari ke-0. Hari ke-4 inkubasi dilakukan seleksi telur, yang memenuhi syarat adalah yang hidup ditandai dengan adanya berkas pembuluh darah dan yang tak memenuhi syarat disingkirkan.

Kelompok "caff" mendapat perlakuan dengan larutan kafein selama 5 hari terhitung dari hari ke-4 inkubasi sedangkan kelompok kontrol mendapat perlakuan dengan aquabidest selama 5 hari terhitung dari hari ke-4 inkubasi. Setiap telur mendapat perlakuan penetesan obat sebanyak 0,005 cc. Penetesan dilakukan secara steril dan dilakukan pada waktu yang relatif sama, kemudian semua telur dikembalikan ke inkubator.

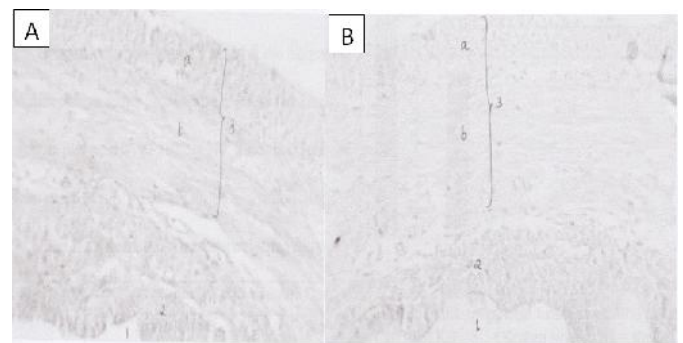
Hari ke-19 inkubasi dilakukan terminasi kehidupan embrio untuk diambil rektum dengan pisau bedah. Sampel dimasukkan ke tabung berisi larutan *bouin holande* untuk diawetkan dan dibuat preparat histologist dengan pewarnaan HE. Sediaan difoto dan diperiksa dengan mikroskop dan diukur ketebalan tunika muskularis rektum eksterna (stratum longitudinal dan sirkuler) dengan sudut 0°, 90°, 180° dan 270°, diambil rata-rata dan dibandingkan. Data

penelitian diuji dengan menggunakan f-test dan t-test untuk mengetahui kemaknaannya.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah sampel kelompok "caff" 4 ekor (26,67%) dan kelompok kontrol 3 ekor (20%). Gambaran histologis penampang transversal rektum terlihat pada gambar 1. Pada tabel 1 menunjukkan adanya perbedaan rerata ketebalan tunika muskularis rektum eksterna dalam μm antara kelompok "caff" dan kelompok "kontrol" baik pada stratum longitudinal (74,2969 : 72,7083) dan sirkuler (54,5313 : 42,0833).

Perhitungan statistik dengan t-test menunjukkan adanya perbedaan yang tidak bermakna ($t=0,135$) antara ketebalan tunika muskularis rektum eksterna stratum sirkuler antara kelompok "caff" dan kelompok "kontrol", demikian juga adanya perbedaan yang tidak bermakna ($t=0,442$) antara ketebalan tunika muskularis rektum eksterna stratum longitudinal antara kelompok "caff" dan kelompok "kontrol" (tabel 2).



Gbr 1. Gambaran anatomis tunika muskularis kelompok 'caff' (A) dan kelompok "kontrol" (B).

Keterangan :

- | | |
|-------------------------------|-------------------------|
| 1. Lumen | a. stratum sirkuler |
| 2. Tunika mukosa | b. stratum longitudinal |
| 3. Tunika muskularis eksterna | |

Otot polos meliputi semua jenis otot yang tidak memiliki garis melintang dan mempunyai kepentingan klinis yang besar karena terlibat pada fungsi banyak organ tubuh. Kerja otot polos misalnya pada intestinum, lambung dan organ dalam lain melalui mekanisme berbeda dengan otot skelet, tergolong jenis unit tunggal. Sel ototnya saling berhubungan melalui jembatan seluler (*gap junction*) yang berinduksi tinggi terhadap ion. Kontraksi otot sebagian besar tidak tergantung impuls saraf eksterna dan dapat bertahan lama [7]. Pada otot polos, pemicu pertama timbulnya kontraksi adalah peningkatan konsentrasi Ca^{2+} dalam sitosiol. Peningkatan Ca^{2+} terjadi akibat mobilisasi dari gudang penyimpanan Ca^{2+} intrasel yaitu pada retikulum sarkoplasma atau dari influx Ca^{2+} dari cairan ekstraseluler. Secara umum retikulum sarkoplasma tidak berkembang dengan baik sehingga

peningkatan Ca^{2+} intrasel yang membangkitkan kontraksi disebabkan terutama oleh *influx* Ca^{2+} dari cairan ekstrasel melalui saluran Ca^{2+} yang memiliki gerbang tegangan [8].

TABEL I
RERATA KETEBALAN TUNIKA MUSKULARIS EKSTERNA RECTUM ANTAR KELOMPOK PERLAKUAN

No prep	Ketebalan Tunika muskularis eksterna (μm)			
	Stratum sirkuler		Stratum longitudinal	
	Klp "caff"	Klp "kontrol"	Klp "caff"	Klp "kontrol"
1	97,8125	71,2500	54,0625	40,0000
2	64,3750	67,8125	57,1875	54,3750
3	87,1875	79,0625	67,0313	31,8750
4	47,8125		39,8438	
Rerata	74,2969	72,7083	54,5313	42,0833

TABEL III
UJI STATISTIK PERBANDINGAN TEBAL TUNIKA MUSKULARIS EKSTERNA RECTUM ANTAR KELOMPOK PERLAKUAN

	Kelompok	Tstat	Df	P (2tail)	Hasil
SL	"caff" vs "kontrol"	1,442	8	0,209	tidak signifikan
SC		0,135	8	0,900	tidak signifikan

Keterangan : SC = stratum sirkuler, SL = stratum longitudinal

Dinding intestinum mempunyai dua lapisan otot utama yaitu stratum longitudinal di bagian luar dan stratum sirkuler di bagian dalam. Kontraksi dari kedua lapisan ini menghasilkan gerakan usus yang menggerakkan makanan di sepanjang lumen. Otot polos intestinum dan kelenjar pada usus mendapat inervasi dari sistem saraf otonom. Pleksus submukosa Meissner menginervasi kelenjar dan lapisan otot sedangkan pleksus myenterikus Auerbach menginervasi lapisan otot, baik longitudinal maupun stratum sirkuler [9].

Kafein tergolong obat-obatan derivat xantin yang mempengaruhi saraf otonom dengan memperpanjang stimulasi dan memiliki aksi simpatomimetik serta pada otot polos mempunyai efek relaksasi [10]. Tiga dasar kerja kafein pada taraf seluler adalah berhubungan dengan translokasi Ca^{2+} . Kafein berikatan dengan *ryanodine* reseptor Ca^{2+} *release channel* (RyR) pada retikulum sarkoplasma dan menginduksi pembukaan kanal. Kadar kafein dalam plasma dapat menstimulasi pelepasan Ca^{2+} dari retikulum sarkoplasma sehingga kadar Ca^{2+} intrasel meningkat, tetapi untuk menghasilkan translokasi Ca^{2+} membutuhkan konsentrasi kafein yang sangat besar [11].

Kerja yang kedua adalah meningkatkan akumulasi senyawa nukleotid siklis terutama cAMP dan cGMP. Kafein terbukti mampu menghambat aktifitas cAMP-fosfodiesterase, meningkatkan kadar cAMP intraseluler dan meningkatkan reuptake Ca^{2+} oleh retikulum sarkoplasma [12]. Kafein pada kadar terapi atau obat bebas maksimal dalam plasma hanya dapat mengadakan hambatan minimal atas aktivitas fosfodiesterase. Kafein sebagai inhibitor fosfodiseterase hanya terjadi jika kadar plasma kafein mencapai rentang farmakologi yang toksik terhadap manusia [11].

Cara kerja ketiga adalah melalui blokade reseptor adenosine. Metixantin adalah antagonis kompetitif adenosine dan adenosin dapat menghambat lipolisis oleh hormon, mengurangi pelepasan norepinephrin dari akhiran saraf otonom dan menghambat pelepasan neurotransmitter di susunan saraf pusat. Adenosin juga mengadakan potensiasi terhadap -adrenergik tertentu yang mengakibatkan peningkatan kontraksi beberapa otot polos. Kadar kafein yang diperlukan untuk memberi efek antagonis terhadap adenosin jauh lebih rendah daripada kadar yang diperlukan untuk meningkatkan kadar Ca^{2+} intrasel dan menghambat fosfodiesterase [11].

Dosis terapi kafein dapat meningkatkan kadar katekolamin dalam darah sedangkan diketahui katekolamin dan angiotensin II merangsang pertumbuhan dan proliferasi otot polos. Kafein juga termasuk obat-obatan pemacu sistem saraf simpatis sehingga jika terjadi pemacuan yang berlebihan dapat akan terjadi hipertrofi pada sistem saraf [13]. Kedua hal ini yang menerangkan terjadinya peningkatan ukuran tebal tunika muskularis eksterna rektum pada kelompok "caff" dibandingkan kelompok "kontrol". Tetapi pada penelitian ini belum diketahui secara pasti mekanisme mana yang terlibat dalam peningkatan ukuran ketebalan tunika muskularis eksterna rektum terutama yang mendapat kafein.

Dari rerata ketebalan stratum, terdapat perbedaan rerata dimana rerata ketebalan "caff" lebih besar tetapi berdasarkan uji statistik tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna yang berarti pemberian kafein dapat meningkatkan ketebalan tunika muskularis eksterna rektum tetapi tidak terbukti secara statistik. Lama paparan kafein pada embrio merupakan faktor penting, yaitu semakin lama waktu pemaparan kemungkinan dapat meningkatkan ketebalan tunika muskularis eksterna rektum secara bermakna [14].

IV. KESIMPULAN

Terdapat peningkatan ketebalan tunika muskularis eksterna rektum dengan pemberian kafein tetapi tidak terbukti secara statistik. Penelitian lebih lanjut diperlukan dengan melihat durasi pemberian kafein yang lebih lama sehingga mungkin dapat memberikan efek penebalan yang lebih nyata dengan menjaga sterilitas sehingga viabilitas tetap terjaga. Teknis preparasi juga harus lebih baik agar pengamatan dapat berlangsung lebih optimal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami ucapkan kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman atas ijin penelitian dan Lab. Histologi serta Lab. Hewan Coba atas fasilitas penelitiannya.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Diaz-Reval, M.A. Irene. 2011. Effect of caffeine on Antinociceptive Action of Ketoprofen in Rats. *Archives on Medical research*. 32, hal 13-20
- [2] Martin, F.P., 2009. Caffeine. *Int. J. Obes Relat-Metab Disord*. 24, hal 252-258

- [3] Alm, B. 1999. Caffeine and Alcohol as a Risk factors to Sudden Infant death Syndrome. *Arc. Dis. Child.* 81, hal 107-111.
- [4] Nawrot P., S. Jordan, J. Eastwood, J. Rotstein, A. Hugenholtz, M. Feeley. 2003. Effects of caffeine on human health. *J Food Add & Contam.* 20 (1), hal 1-30
- [5] Magkos F., S. A. Kavouras. 2005. Caffeine Use in Sports, Pharmacokinetics in Man and Cellular Mechanisms of Action. *J Critic Rev in Food Sci and Nutrit.* 45 (17-8), hal 535-562
- [6] Watanabe C, H Yamamoto, K Hirano, S Kobayashi, H Kanaide. 2012. Mechanisms of caffeine-induced contraction and relaxation of rat aortic smooth muscle. *J Physiol.* 456: hal. 193–213
- [7] Rudiger W. G. 2014. *Atlas Berwarna dan Teks Fisiologi.* Eds 6. Rev. EGC
- [8] Ganong, W.F. 2015. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran.* Eds 24. EGC.
- [9] Atkins, D.L. 1999. *Comparative Vertebrate Anatomy.* Available at <http://gwis2.circ.gwu.edu/>
- [10] Laurence, D.R., P.N. Bennet and M.J. Brown. 1997. *Clinical Pharmacology.* 8th Eds. New York, Churchill Livingstone.
- [11] Kalmar, J.M., Cafarelli E. 2009. Effect of caffeine on neuromuscular Junction. *Journ. Of Appl. Physiol.* 87 (2), hal 801-808
- [12] Franssen P., Katnik C. S., Adam D.J., 1998. Ach- and Caffeine induced Ca Mobilization and Current Activation in Rabbit Arterial endothelial Cells. *Am J. Physiol Heart Circ.* 275 (5), hal 1748-58
- [13] Ritter, M., Su Z., Spitzer K.W., Ishida H., Barry W.H. 2010. Caffeine induced Ca Sparks in Mouse Ventricular Myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ.*, 278(2), hal 666-669
- [14] Yeniseti, S.C., Muralidhara. 2016. Beneficial Role of Coffee and Caffeine in Neurodegenerative Disease: A Minireview. *AIMS Public Health* 3(2), hal 407-44