

PERBEDAAN PENGARUH TERAPI EKSTRAK ETANOL DAUN *Polyalthia Longifolia* INDONESIA DAN FILIPINA TERHADAP HISTOPATOLOGI DAN EKSPRESI *Extracellular Signal Regulated Kinase (ERK)* KOLON TIKUS (*Rattus norvegicus*) INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD)

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

**IKKE ALMA ALUKA
155130100111018**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PERBEDAAN PENGARUH TERAPI EKSTRAK ETANOL DAUN *POLYALTHIA LONGIFOLIA* INDONESIA DAN FILIPINA TERHADAP HISTOPATOLOGI DAN EKSPRESI EXTRACELLULAR SIGNAL REGULATED KINASE (ERK) KOLON TIKUS (*RATTUS NORVEGICUS*) INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD)

Oleh:

IKKE ALMA ALUKA

155130100111018

Setelah dipertahankan didepan Majelis Penguji
pada tanggal 29 April 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Wibi Riawan, S.Si, M.Biomed
NIP. 19770131 200501 101

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc
NIP. 19631216 198803 1 002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Ikke Alma Aluka

NIM : 155130100111018

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Perbedaan Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Daun Polyalthia longifolia Indonesia Dan Filipina Terhadap Histopatologi dan Ekspresi Extracellular Signal Regulated Kinase (ERK) Kolon Tikus Inflammatory Bowel Disease (IBD)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termasuk di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 29 April 2019

Yang menyatakan,

Ikke Alma Aluka
NIM. 155130100111018

**Perbedaan Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Daun *Polyalthia Longifolia* Indonesia Dan
Filipina Terhadap Histopatologi dan Ekspresi Extracellular Signal Regulated Kinase
(ERK) Kolon Tikus (*Rattus norvegicus*) Inflammatory Bowel Disease (IBD)**

ABSTRAK

Inflammatory Bowel Disease (IBD) adalah penyakit gastrointestinal kronis disebabkan karena faktor kecacatan permeabilitas, genetik, iskemik, biokimia dan kelainan prikosomatik, infeksi dan agen parasit, dan efek negatif obat-obatan NSAID salah satunya adalah Indometasin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan efektifitas ekstrak daun *P. longifolia* yang berasal dari Indonesia dan Filipina terhadap ekspresi ERK dan gambaran histopatologi pada tikus model IBD. Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 2-3 bulan dengan berat 150 – 200 gram. Hewan coba dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok terapi menggunakan *goal standard* (Sulfasalazine dosis 20 mg/kgBB) secara per oral, kelompok dengan menggunakan ekstrak *P. longifolia* Indonesia (dosis 300 mg/kg BB) secara per oral, dan kelompok menggunakan ekstrak *P. longifolia* Filipina (dosis 300 mg/kgBB) secara per oral selama 7 hari. Data dianalisis dengan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji lanjutan BNJ (Beda Nyata Jujur) dengan $\alpha = 0,05\%$. Kemudian untuk melihat perbedaan antara terapi ekstrak Indonesia dan Filipina dianalisis dengan *Independent T-Test*. Hasil ekspresi ERK diamati dengan metode imunohistokimia dan perbaikan histopatologi mukosa kolon diamati dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE). Hasil perhitungan ANOVA menunjukkan ekspresi ERK pada kelompok terapi Sulfasalazine kelompok terapi ekstrak etanol daun *P. longifolia* dari Indonesia, dan kelompok terapi ekstrak etanol *P. longifolia* dari Filipina tidak berbeda signifikan ($P > 0,05$). Hasil uji *Independent T-Test* pada kelompok terapi ekstrak etanol daun *P. longifolia* dari Indonesia memiliki rata-rata ekspresi ERK lebih tinggi daripada kelompok terapi ekstrak etanol daun *P. longifolia* dari Filipina. Pada gambaran histopatologi kolon terlihat adanya perbaikan kolon dan berkurangnya infiltrasi sel radang.

Kata kunci: IBD (*Inflammatory Bowel Disease*), *Polyalthia Longifolia*,
Indometasin, ERK, Histopatologi Kolon

**The Difference Effect of *Polyalthia longifolia* Ethanol Extract from Indonesia and
Philippine Toward Histopathological and The Expression of Extracellular
Signal Regulated Kinase (ERK) of Colon on Inflammatory Bowel Disease
Rats (*Rattus norvegicus*)**

ABSTRACT

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a chronic gastro intestinal disease caused by disability, genetic, ischemic, biochemical and procosomatic abnormalities, parasitic infections and agents, and the negative effects of NSAIDs, one of which is indomethacin. This study aims to determine the differences in effectiveness of *P. longifolia* leaf extract originating from Indonesia and the Philippines against ERK expression and histopathological features in IBD model mice. This study used experimental animals, rats (*Rattus norvegicus*), Wistar strain, aged 2-3 months, weighing 150-200 grams. The experimental animals were divided into 3 groups, namely the therapy group using a standard goal (Sulfasalazine dose of 20 mg / kgBW) orally, the group using *P. longifolia* Indonesia extract (dose 300 mg / kgBW) orally, and the group using extract of *P. longifolia* from Philippines (dose 300 mg / kgBW) orally for 7 days. Data were analyzed by ANOVA and continued with continued BNJ (Honestly Different Difference) test with $\alpha = 0.05\%$. Then to see the differences between Indonesian and Philippine extract therapies were analyzed by the Independent T-Test. The results of ERK expression were observed by immunohistochemistry and histopathological repair of colon mucosa was observed by Hematoxylin-Eosin (HE) staining. The results showed that ERK expression in therapy group of Sulfasalazine, therapy group of *P. longifolia* ethanol extract from Indonesia, and therapy group of *P. longifolia* ethanol extract from the Philippines are not significantly different. The results of the Independent T-Test in the *P. longifolia* ethanol extract therapy group from Indonesia had a higher ERK expression than the therapeutic group ethanol extract of *P. longifolia* from the Philippines. In the histopathology view of colon, there is an improvement in the colon and reduced inflammatory cell infiltration.

Keywords : IBD (*Inflammatory Bowel Disease*), *Polyalthia Longifolia*,
Indometasin, ERK, Colon Histopathological view

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan berkat dan anugerah-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “**Perbedaan Pengaruh Terapi Ekstrak *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina Terhadap Histopatologi dan Ekspresi Extracellular Signal Regulated Kinase (ERK) Kolon Tikus Inflammatory Bowel Disease (IBD)**” sebagai syarat untuk menyelesaikan Program Sarjana (S1) pada Program Kedokteran Hewan, Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini tidak dapat terselesaikan tanpa dukungan dari berbagai pihak baik moril maupun ateril. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini, terutama kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES. dan Wibi Riawan S.Si, M.Biomed selaku dosen pembimbing skripsi yang telah berkenan memberikan tambahan ilmu dan solusi pada setiap permasalahan atas kesulitan dalam penulisan skripsi ini.
2. drh. Wawid Purwatiningsih, M.Vet dan Dhita Evi Aryani, S.Farm, Apt., M.Farm.Klin selaku dosen penguji atas segala waktu, bimbingan dan arahan dan saran yang telah diberikan kepada penulis.
3. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas kepemimpinan dan fasilitas yang telah diberikan.
4. Dr. Ma. Asuncion G. Beltran dari Veterinary Medicine, Tarlac Agricultural University, Philippine selaku tim dosen penelitian sudah banyak membantu penulis dan memberi masukan terkait penelitian ini
5. Seluruh dosen dan Staff Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan pembelajaran dan fasilitas kepada penulis selama Pendidikan .

6. Kedua orang tua beserta kakak dan adik tercinta yang telah memberikan doa dan dukungan selama proses pembuatan skripsi.
7. Tim Penelitian Tiara, Erica, dan Angger atas kerjasama, saran, dan bantuan yang telah diberikan selama penelitian berlangsung.
8. Seluruh sahabat Program Kedokteran Hewan angkatan 2015, teman teman Brachial, sahabat Pare, Addin, Kirana, Dita, Wilda, Nabila, Inge dan Faros yang selalu memberikan semangat, perhatian, saran, kritik, motivasi, dukungan, kebersamaan, serta doa kepada penulis selama menempuh pendidikan.
9. Bay Abdul Wahab selaku rekan setia yang selalu memberikan semangat, keceriaan, dan bantuan kepada penulis.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan proposal skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna dikarenakan terbatasnya pengalaman dan pengetahuan yang dimiliki penulis. Oleh karena itu, penulis mengharapkan segala bentuk saran serta masukan bahkan kritik yang membangun dari berbagai pihak. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi para pembaca dan semua pihak khususnya dalam bidang Kedokteran Hewan

Malang, 29 April 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	iii
LEMBAR PENYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 <i>Polyalthia longifolia</i>	6
2.2 Inflammatory Bowel Disease (IBD)	7
2.3 Indometasin	9
2.4 Kolon.....	11
2.5 ERK.....	12
2.7 Tikus putih	14
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	16
3.1 Kerangka Konsep	16
3.2 Hipotesis Penelitian	18
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	19
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	19
4.2 Alat dan Bahan.....	19
4.3 Rancangan Penelitian	20
4.4 Variabel Penelitian	21
4.5 Tahapan Penelitian	22
4.6 Prosedur Kerja.....	22
4.6.1 Preparasi Sampel Simplicia dan Ekstraksi	22
4.6.2 Aklimatisasi	23
4.6.3 Pembuatan Larutan CMC-Na dan Sulfasalazine.....	23
4.6.4 Pembuatan Ekstrak Etanol <i>P.longifolia</i>	23

4.6.5 Induksi Indometasin Tikus Model IBD.....	24
4.6.6 Pembedahan dan Pengambilan Organ Kolon.....	24
4.6.7 Pembuatan Preparat Histopatologi.....	25
4.6.8 Pewarnaan Preparat dengan HE	25
4.6.9 Pengamatan Histopatologi	26
4.6.10 Pembuatan Preparat IHK Ekspresi ERK.....	27
4.6.11 Analisis Ekspresi ERK Kolon.....	28
4.6.12 Analisis Data	28
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
5.1 Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol <i>P. longifolia</i> Terhadap Gambaran Histopatologi Kolon Tikus IBD	29
5.2 Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol <i>P. longifolia</i> Terhadap Ekspresi ERK Kolon Tikus IBD	33
BAB 6 PENUTUP.....	38
6.1 Kesimpulan.....	38
6.2 Saran.....	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN.....	44

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian	21
5.1 Deskripsi gambaran histopatologi organ kolon	31
5.2 Hasil Uji ANOVA Ekspresi ERK pada Jaringan Kolon Tikus IBD	34
5.3 Hasil Uji <i>Independent T-Test</i> Ekspresi ERK pada Jaringan Kolon Tikus IBD	36

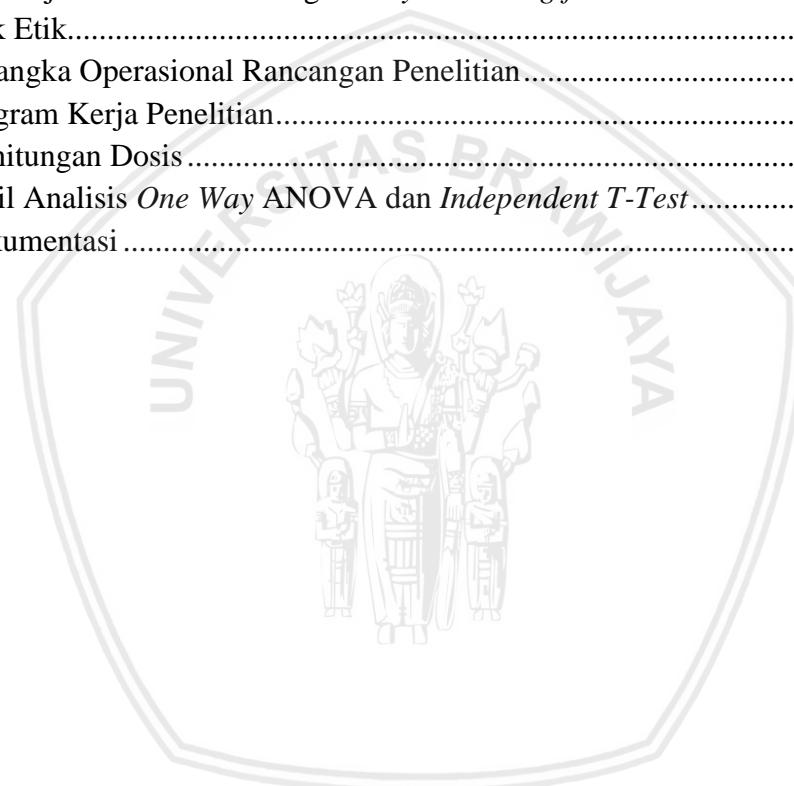


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tanaman Polyalthia longifolia	7
2.2 Struktur Indometasin	11
2.3 Histologi kolon tikus normal	13
2.4 Histologi kolon tikus Inflammatory Bowel Disease	13
2.5 Jalur ERK Pathway pada kasus Inflamasi	14
2.5 <i>Rattus norvegicus</i>	15
5.1 Gambar Histopatologi Kolon Tikus Terapi Sulfasalazine	29
5.2 Gambar histopatologi Kolon Tikus terapi Ekstrak etanol <i>P.longifolia</i> Indonesia	30
5.3 Gambar Histopatologi Kolon Tikus terapi Ekstrak Etanol <i>P.longifolia</i> Filipina	30
5.4 Gambar Ekspresi ERK pada Organ Kolon Tikus	33
5.5 Gambar Grafik Ekspresi ERK	35

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Taksonomi Daun <i>Polyalthia longifolia</i>	40
2. Hasil Uji Kualitatif Kandungan <i>Polyalthia longifolia</i>	41
3. Laik Etik.....	42
4. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian.....	43
5. Diagram Kerja Penelitian.....	44
6. Perhitungan Dosis	49
7. Hasil Analisis One Way ANOVA dan Independent T-Test	52
8. Dokumentasi	57



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

ANOVA	: Analisis of variant
BB	: Berat Badan
COX	: <i>Cyclooxygenase</i>
DAB	: Diaminobenzidine
ERK	: <i>Extracellular Signal Regulated Kinase</i>
EGFR	: <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
GEF	: <i>Guanine Exchange Factor</i>
GT	: <i>Guanin Triphosphate</i>
HE	: Hematoxyline-Eosin
IBD	: <i>Inflammatory Bowel Disease</i>
IL	: Inter Leukin
Kg	: Kilogram
KU	: Kolitis Ulserativa
Mg	: Milligram
mg/kg BB	: Miligram per Kilogram Berat Badan
mL	: Mililiter
MAPK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
NF- κ B	: Nuclear factor- κ B
NaCl	: Natrium klorida
NSAID	: <i>Non Steroid Inflammation Drugs</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PGE	: Prostaglandin
PC	: Penyakit Chron
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
SA-HRP	: <i>Staphyloavidin- Horseradish Peroxide</i>
TGF- β	: Transforming growth factor- β
Th	: T Helper

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

IBD merupakan penyakit gastro intestinal dengan penyebab belum diketahui secara pasti (Defarges 2016, Marks 2013, Mansfield 2011). Beberapa faktor penyebab diantaranya adalah kecacatan permeabilitas, genetik, iskemik, biokimia dan kelainan psikosomatik, infeksi dan agen parasit, allergen diare, dan efek negatif obat-obatan. Temuan terbaru menunjukkan penyebab lain berupa reaksi hipersensitifitas terhadap antigen contohnya makanan, bakteri, mukus, sel epitel di dalam lumen intestinal atau mukosa (Defarges 2016, Neiger 2014). Penyakit IBD bisa terjadi pada pencernaan bagian atas, usus kecil, usus besar atau disemua tempat secara bersamaan (Neiger, 2014).

Berdasarkan subtipe klinis nya IBD dibedakan menjadi dua yaitu penyakit Crohn (PC) dan kolitis ulcerativa (KU). Keduanya dianggap muncul dari respon imun yang terganggu terhadap usus individu dengan predisposisi genetik, meskipun etiologi tidak diketahui. Karakteristik inflamasinya berbeda, pada PC biasanya menyebabkan inflamasi pada seluruh bagian dinding intestinal dan kadang-kadang terkait dengan granuloma, sedangkan di KU biasanya inflamasi terbatas pada mukosa dan submukosa. (Rowe, 2011 dan Talley *et al.*, 2011). PC merupakan inflamasi yang terjadi pada bagian yang lapisan dinding usus dan bagian saluran pencernaan meliputi mulut, esophagus, perut dan usus halus, sedangkan KU hanya terbatas pada usus besar, rektum dan peradangan terjadi pada lapisan usus (korpacka *et al.*, 2009)

IBD bisa disebabkan karena virus dan bakteri patogen yang menginfeksi saluran pencernaan, tetapi beberapa penelitian menyebutkan bahwa IBD dapat disebabkan oleh efek samping penggunaan obat anti inflamasi non steroid seperti indometasin (Podolsky, 2002). Dalam aksi kerja, indometasin akan menghambat cyclooxygenase 1 (COX-1). Pada usus, COX-1 berperan dalam pembentukan prostaglandin pada usus. Penurunan prostaglandin menyebabkan penurunan perlindungan terhadap mukosa *barrier* usus, sehingga memudahkan invasi bakteri patogen (Takeuchi *et al.*, 2003).

Obat antiinflamasi non steroid (NSAID) menghambat enzim siklooksigenase sehingga konversi asam arakidonat menjadi endoperoksid terganggu. Setiap obat antiinflamasi non steroid seperti indometasin, menghambat siklooksigenase dengan kekuatan dan selektivitas yang berbeda. Indometasin menghasilkan toksitas pada gastrointestinal melalui beberapa mekanisme seperti peningkatan sekresi asam lambung, produksi radikal bebas, pengurangan kadar oksida lambung dan invasi neutrofil aktif serta induksi apoptosis sel lambung. Penurunan prostaglandin menyebabkan menurunnya proteksi pada mukosa lambung dan membuat bakteri patogen mudah diserang (Kaseret dkk., 2010). Indometasin dengan dosis 15 mg/kgBB (Aulanni'am *et al.*, 2012) dapat mengaktifkan makrofag dan akan melepaskan ROS (*reactive Oxygen Species*). Produksi ROS berlebih dalam sel menyebabkan aktivasi NF-kB dan fosforilasi NF-kB berpindah menuju nucleus untuk mengekspresikan sitokin pro-inflamasi seperti TNF α . Produksi TNF α berlebih pada sel ini akan menyebabkan inflamasi pada usus termasuk kolon (Campbell *et al.*, 2006; Houser *et al.*, 2012).

Perbedaan geografis antara Indonesia dan Filipina akan menyebabkan perbedaan kandungan senyawa aktif dalam tanaman, sehingga dapat memiliki perbedaan aktivitas farmakologis yang akan dihasilkan (Collegate and Molyneux, 2008). Pada penelitian ini, akan dilakukan perbandingan efektifitas ekstrak daun *Polyalthia longifolia* yang berasal dari Indonesia dan Filipina sebagai obat herbal IBD.

Terapi penanganan IBD dengan menggunakan obat-obatan berbahan kimia dapat memberikan efek samping berupa akumulasi dari bahan kimia yang digunakan, sehingga diperlukan terapi anti inflamasi alternatif berbahan dasar alam. Penerapan metode ini dapat dilakukan dengan memberikan ekstrak tanaman. Tanaman herbal pada penelitian sebelumnya yang dimanfaatkan sebagai terapi untuk kasus IBD diantaranya daun kedondong (*Lannea coromandelica*) (Sholicha dkk., 2012), bawang prei (*Allium fistulosum*) (Masbuchin dkk., 2014), lidah buaya (*Aloe vera*) (Mustaqim dkk., 2017), Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum*) (Aulanni'am dkk., 2011) yang mengandung senyawa antioksidan seperti flavonoid. Salah satu tanaman yang memiliki potensi sebagai obat IBD yaitu ekstrak daun *Polyalthia longifolia*.

Penelitian lain yang mempelajari potensi ekstrak *Polyalthia longifolia* mengandung senyawa aktif berupa flavonoid, alkaloid, tannin, steroid, dan glikosida (Nur, 2016). Berbagai senyawa aktif yang terkandung dalam daun *Polyalthia longifolia* berfungsi sebagai aktivitas antioksidan dan anti-inflamasi yang akan diuji pada penelitian ini untuk terapi IBD.

Dalam penyembuhannya bergantung pada respon inflamasi yang muncul saat terjadi peradangan tergantung pada stimulasi *signaling pathways* di dalam sel.

MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) merupakan kelompok enzim yang mengatur bermacam-macam *signaling pathways*. ERK (*Extracellular Regulated Kinase*) merupakan komponen lanjutan dari *signaling pathways* yang diaktifasi oleh MAPK. ERK 1/2 menginisiasi proses proliferasi sel dan metastasis tertentu pada aktifasi EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) pada permukaan sel (Roberts, 2007).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan berikut:

1. Apakah terdapat perbedaan pengaruh ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dan Filipina terhadap gambaran histopatologi organ kolon pada tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi Indometasin ?
2. Apakah terapi ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dan Filipina memiliki perbedaan terhadap ekspresi ERK pada kolon tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi Indometasin ?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi oleh:

1. Hewan coba yang digunakan merupakan tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar, umur 8-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram berasal dari Laboratorium Biosains yang diperoleh dari penyedia Hewan Laboratorium Bandung dan telah didapat sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Univeristas Brawijaya (KEP UB) No. 1035-KEP-UB.

2. Pembuatan hewan model IBD dilakukan dengan induksi obat NSAID, Indometasin dengan dosis 15 mg/kgBB, sekali induksi.
3. Daun *Polyalthia longifolia* yang digunakan diperoleh dari wilayah Malang untuk ekstrak *Polyalthia longifolia* Indonesia, sedangkan daun *Polyalthia longifolia* dari Filipina diperoleh dari Dr. Ma. Asunction Beltran
4. Dosis terapi ekstrak etanol *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina sebesar 300 mg/kgBB 1 x sehari selama 7 hari
5. Ekstrak daun *Polyalthia longifolia* diperoleh dengan metode maserasi dan pelarut etanol 70%.
6. Obat IBD Sulfasalazine digunakan sebagai pembanding dengan dosis 20 mg/kgBB.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini bertujuan sebagai berikut:

1. Mengetahui perbedaan pengaruh terapi ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* yang berasal dari Indonesia dan Filipina terhadap histopatologi organ kolon tikus model IBD yang diinduksi Indometasin.
2. Mengetahui perbedaan pengaruh terapi ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* yang berasal dari Indonesia dan Filipina terhadap ekspresi ERK pada kolon tikus model IBD yang dinduksi Indometasin.

1.5 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi terkait manfaat penggunaan daun *Polyalthia longifolia* sebagai terapi herbal alternatif untuk penyakit IBD.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Polyalthia longifolia*

Polyalthia longifolia merupakan tanaman yang berasal dari daerah kering dari India yang secara lokal dikenal sebagai “ashoka”. Tanaman ini bermanfaat sebagai agen antipiretik dalam sistem pengobatan. Beberapa uji farmakologis lain menuliskan bahwa tanaman ini menunjukkan aktivitas antimikroba yang baik, dan efektif. Selain itu, berperan pada fungsi sitotoksik pada sel kanker, aktifitas anti bakteri dan anti ulcer.



Gambar 2.1 *Polyalthia longifolia* (Annan et al., 2013)

Klasifikasi dari tanaman *Polyalthia longifolia* :

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Order	: <i>Magnoliales</i>
Family	: <i>Annonaceae</i>
Genus	: <i>Polyalthia</i>
Spesies	: <i>Polyalthia longifolia</i>

Tanaman ini tumbuh pada daerah tropis dan subtropis hingga mencapai ketinggian 1500 m. Tanaman dengan karakteristik tinggi, hijau, dan berbentuk seperti pyramid, batang utama lurus tidak bercabang, cabang ramping dan pendek. Bunga muncul pada cabang bagian bawah daun, tidak beraroma, tangkai daun memiliki panjang sekitar 6 mm. tanaman ini mulai berbuah dan berbunga pada bulan Februari sampai Juni.

Ekstrak daun *Polyalthia longifolia* dalam pelarut etanol mengandung flavonoid yang menghasilkan aktivitas antiinflamasi. *Polyalthia longifolia* sebagai antiinflamasi bekerja dengan menghambat labih dari satu mediator inflamasi atau menginisiasi aktivitas penyembuhan sel (Mandal, *et al.* 2012). Beberapa kandungan lain dari *Polyalthia longifolia* yang sudah ditemukan dan banyak digunakan sebagai kandungan dari obat tradisional diantaranya flavonoid, alkaloid, sesquiterpenes, diterpenes, dan sapoin.

Ekstrak etanol dari daun *Polyalthia longifolia* banyak diuji untuk melihat aktivitas antiulser pada tikus yang diinduksi aspirin. Ulkus diinduksi dengan aspirin untuk memicu ulcer. Penggunaan ekstrak daun *Polyalthia longifolia* sebanyak 300 mg/kgBB dengan etanol menunjukkan respon yang efektif dalam mengobati ulkus pada tikus sampai 89,71% (Katkar, 2010).

2.2 Inflammatory Bowel Disease (IBD)

Inflammatory Bowel Disease merupakan penyakit peradangan usus yang memiliki gejala antara lain diare, sembelit, rasa nyeri pada perut, dan kembung. IBD dibagi menjadi dua subtipe klinis yaitu Penyakit *Chorn* (PC) dan Kolitis ulserativa (KU). PC merupakan inflamasi yang terjadi pada bagian yang lapisan dinding usus dan bagian saluran pencernaan meliputi mulut, esofagus, perut, dan

usus halus, usus besar. Sedangkan KU hanya terbatas pada usus besar, rektum, dan peradangan terjadi pada lapisan usus (Korpaska *et al.*, 2009).

Penyebab IBD belum diketahui secara pasti. Faktor lingkungan dalam saluran cerna seperti perubahan bakteri usus, dan peningkatan permeabilitas epitel saluran cerna. Kasus IBD pertama kali ditemukan pada abad ke-20. Tingkat kejadian kasus IBD mencapai 4-10 per 100.000 orang per tahun pada wilayah Skandinavia, Amerika Serikat dan Inggris (Neuman, 2011)

Secara umum, diperkirakan bahwa proses patogenesis IBD diawali adanya infeksi, toksin, produk bakteri interlumen kolon pada individu rentan dan dipengaruhi oleh defisiensi imun, lingkungan sehingga terjadi proses inflamasi pada dinding usus (Firmansyah, 2013).

Dalam patogenesis IBD, terdapat dua mekanisme. Pada IBD subtipo PC difokuskan pada sel T Helper 1 (Th1) yang mengeluarkan sitokin seperti TNF α , IL-12, dan IFN γ sebagai inisiator terjadinya inflamasi. Sedangkan pada kolitis ulseratif (KU) sel T helper 2 (Th2) mengeluarkan sitokin seperti IL-4, IL-3 dan TGF β untuk menginisiasi terjadinya inflamasi. Kedua jalur Th1 dan Th2 akan dilibatkan pada tiap fase yang kemungkinan terjadi bersamaan atau terpisah (Neuman, 2011)

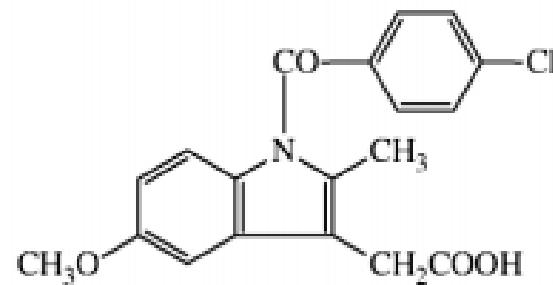
Aktivasi dari sel T helper sebagai bentuk respon imun dimulai ketika T sitotoksik (CD8+) atau (CD4+) pada dinding saluran pencernaan mengenali adanya antigen atau kemunculan dari sitokin inflamasi yang dipicu dengan penggunaan obat-obat NSAID. Obat-obat golongan NSAID akan menghambat sintesis prostaglandin, sehingga menghambat cyclooxygenase (COX) hal tersebut menimbulkan penyakit IBD (Guslandi, 2005).

Obat NSAID masing-masing mempunyai potensi yang berbeda dalam menghambat COX-1 maupun COX-2 dan ini juga menunjukkan efek samping yang bervariasi. Hambatan pada COX-1 menyebabkan gangguan terutama pada saluran cerna, sedangkan COX-2 tidak terdapat pada keadaan normal, melainkan diinduksi pada keadaan inflamasi. Salah satu jenis NSAID yang dapat menyebabkan IBD yaitu Indometasin (Guslandi, 2005).

2.3 Indometasin

Indometasin merupakan suatu senyawa turunan indol termetilasi. Efek antiinflamasi dicapai melalui mekanisme penghambatan enzim siklooksigenase secara tidak selektif, obat ini juga diketahui dapat menghambat migrasi leukosit polimorfonuklear. Obat ini memiliki sifat anti radang yang lebih poten dan analgetik-antipiretik yang mirip dengan obat-obat turunan system saraf pusat dan perifer (Roberts & Morrow, 2001).

Indometasin banyak digunakan untuk mengatasi nyeri pada penyakit-penyakit seperti osteoarthritis, *rheumatoid arthritis*, ankylosing spondylitis, bursitis, dan tendinitis. Penggunaan indometasin pada dosis tinggi memiliki efek samping seperti halnya obat-obat antiinflamasi non-steroid yang lain. Efek samping tersebut antara lain gangguan pencernaan, reaksi anafilaksis, dermatitis, hipersensitivitas, serta gangguan pada system saraf pusat. Indometasin dapat berinteraksi dengan beberapa obat anti hipertensi, diuretik, probensid, dan penggunaan bersama antikoagulan oral dapat berpotensi meningkatkan peredaran saluran cerna (Roberts & Morrow, 2001)



Gambar 2.2 Struktur Indometasin (Borne dkk., 2008)

Indometasin memiliki efek farmakologis yang menghambat sintesis prostaglandin. Penghambatan sintesis prostaglandin ini dilakukan dengan memanfaatkan kandungan analgesic dan antipiretik didalamnya. Sintesis prostaglandin muncul ketika terjadi sakit, demam, dan adanya inflamasi. Indometasin menghambat aktivitas katalis dari enzim COX yang bertanggung jawab untuk mempercepat laju pembatasan dari proses sintesis prostaglandin melalui jalur asam arakidonat. Indometasin mampu menghambat dua macam COX, COX-1 dan COX-2, dengan kecenderungan selektivitas pada COX-1. COX-1 bekerja menekan enzim yang terlibat dalam perlindungan dinding mukosa lambung, platelet dan fungsi ginjal, COX-1 menstimulasi perubahan dari asam arakidonat menjadi Prostaglandin G2, kemudian menjadi PGH2. Enzim COX-2 teraktivasi terutama ketika ada ransangan mediator inflamasi atau endotoksin bakteri di jaringan.

Indometasin akan menghambat cyclooxygenase 1 (COX-1) yang berperan dalam pembentukan prostaglandin menyebabkan penurunan perlindungan terhadap mukosa barrier usus, sehingga memudahkan invasi bakteri patogen. Selain itu,

dalam metabolism indometasin akan menghasilkan metabolit imunokuinon yang sangat reaktif. Peningkatan imunokuinon akan menyebabkan terjadinya stress oksidatif, invasi bakteri patogen pada gastrik akan mengaktifkan neutrophil yang berperan dalam perusakan mikroorganisme secara fagositosis yang selanjutnya didegradasi oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan Protease. Pelepasan protease menyebabkan terjadinya kerusakan dan inflamasi (Segal, 2005). Imonokuinon juga menginduksi proses inflamasi dengan mengaktifkan NF- κ B yang mampu melepaskan sitokin seperti Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) dari mukosa lambung. TNF- α mengaktifkan neutrofil, serta melepaskan enzim protease yang mengakibatkan kerusakan lambung (Fornai, dkk., 2011).

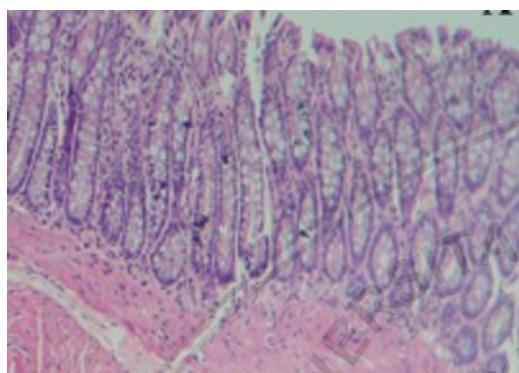
Dosis pemberian indometasin adalah sebesar 15 mg/Kg BB per oral dengan inkubasi selama 24 jam (Aulanni'am dkk., 2012) untuk mendapat kolon yang terinfeksi IBD. Asupan oral indometasin pada tikus (*Rattus norvegicus*) dosis 15-16 mg/kg BB dapat menginduksi ulserasi pada mukosa, edema, dan perdarahan (Kreiglstein, 2001)

2.4 Kolon

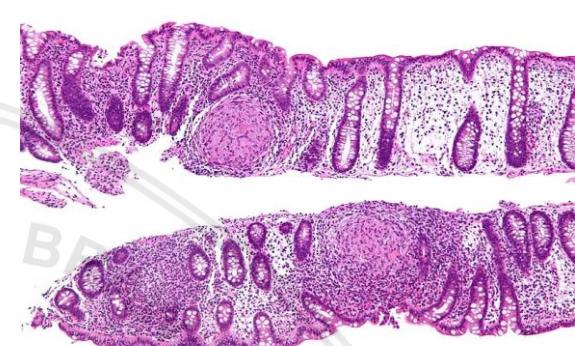
Kolon adalah bagian usus yang berfungsi untuk absorbs air dan elektrolit untuk membentuk feses yang padat dan penimbunan bahan feses sampai dapat dikeluarkan. Banyak bakteri khususnya basil kolon, bahkan terdapat secara normal pada kolon untuk mengabsorbsi air. Bakteri-bakteri ini mampu mencernakan sejumlah kecil selulosa, dengan cara ini menyediakan beberapa kalori nutrisi tambahan untuk tubuh (Guyton, 2008).

Gambaran histopatologis kolon mempunyai kripta Liberkuhn lebih panjang dan lebih lurus pada tunika mukosa dibandingkan dengan usus halus. Dinding dari

kolon dari empat lapisan yaitu mukosa, submukosa, muskularin eksterna dan serosa. Mukosa terdiri atas epitel selapis silindris, kelenjar intestinal, lamina propria, dan muskularis mukosa (Eroschenko, 2003). Epitel kolon berbentuk silinder dan mempunyai lebih banyak sel goblet daripada usus halus. Tunika mukosa dari kolon tersusun atas lapisan sirkular sebelah dalam dan lapisan longitudinal sebelah luar.



Gambar 2.3 Histologi Kolon Tikus Normal (Vicki, 2017)



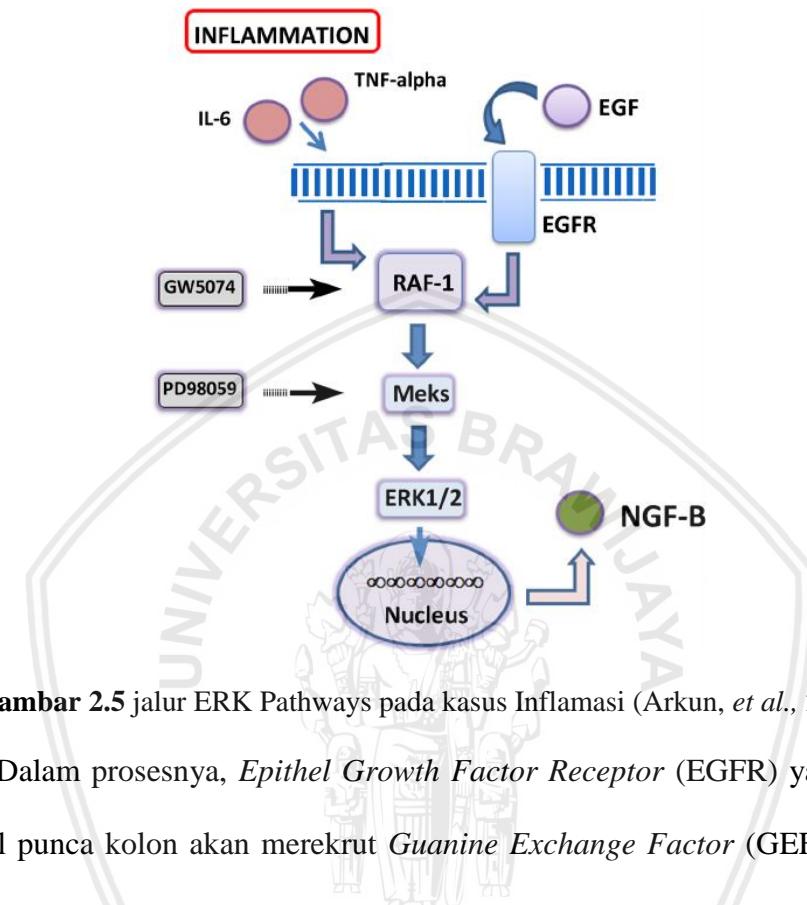
Gambar 2.4 Histopatologi Kolon Tikus Inflammatory Bowel Disease (IBD) (Vicki, 2017)

Terlihat dari histopatologis kolon yang mengalami inflamasi akan terlihat adanya kerusakan pada lapisan mukosa, hilangnya sel goblet dan infiltrasi sel radang. Bentuk mukosa tampak tidak teratur jika dibandingkan dengan kondisi normal (Geboes, 2003).

2.5 ERK

ERK merupakan komponen lanjutan dari *signaling pathways* yang diaktifasi oleh Raf serine/threonine kinase. Raf mengaktifkan MAPK/ERK Kinase (MEK1/2) yang selanjutnya mengaktifkan ERK. ERK menginisiasi proses proliferasi sel dan metastasis tertentu pada aktivasi *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR). Jalur ERK biasanya diaktifasi oleh sel stimulasi *Growth-factor* reseptor di permukaan, yang selanjutnya akan mengaktifasi faktor transkripsi untuk memulai pertumbuhan epitel. Substrat dari ERK banyak ditemukan pada nukleus,

beberapa juga ditemukan pada sitoplasma dan organela lain didalam sel (Gambar2.5) (Roberts, 2007).



Gambar 2.5 jalur ERK Pathways pada kasus Inflamasi (Arkun, et al., 2018)

Dalam prosesnya, *Epithel Growth Factor Receptor* (EGFR) yang terletak pada sel punca kolon akan merekrut *Guanine Exchange Factor* (GEF) ke dalam membran sel. Rekrutan GEF selanjutnya memfasilitasi terjadinya ikatan antara *Guanin Triphosphate* (GT) dan Ras serta teraktifasinya Ras-GTP. Kompleks Ras-GTP akan mengaktifasi Raf Serine/Threonin kinase untuk kemudian menginduksi *Mitogen Activated Protein* (MEK) 1 dan 2. MEK 1 dan MEK 2 akan memicu induksi *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (ERK) 1 dan 2 untuk membentuk faktor transkripsi dan menginisiasi proliferasi sel epitel pada kolon (Jayalie, dkk., 2016)

2.6 Tikus Putih

Hewan model yang dipakai adalah tikus putih dengan nama ilmiah *Rattus novergicus* merupakan spesies tikus yang paling sering digunakan sebagai hewan model pada penelitian mengenai mamalia. Menurut (Hendrich, 2006), secara garis besar fungsi dan bentuk organ serta proses biokimia dan biofisika antara tikus dan manusia memiliki banyak kesamaan sehingga hasil penelitiannya dapat diaplikasikan pada manusia.

Hewan coba tikus (*Rattus novergicus*) memiliki waktu hidup 2,5 tahun sampai 3,5 tahun, berat badan jantan 300-500 g dan betina 250-300 g, denyut jantung 330-480 kali permenit, frekuensi respirasi 85 kali permenit dan memasuki masa dewasa pada usia 40-60 hari (Epstein, 2004). Tikus putih (*Rattus novergicus*) galur Wistar memiliki klasifikasi sebagai berikut:



Gambar 2.6 *Rattus novergicus* (Mas'ud dkk., 2009)

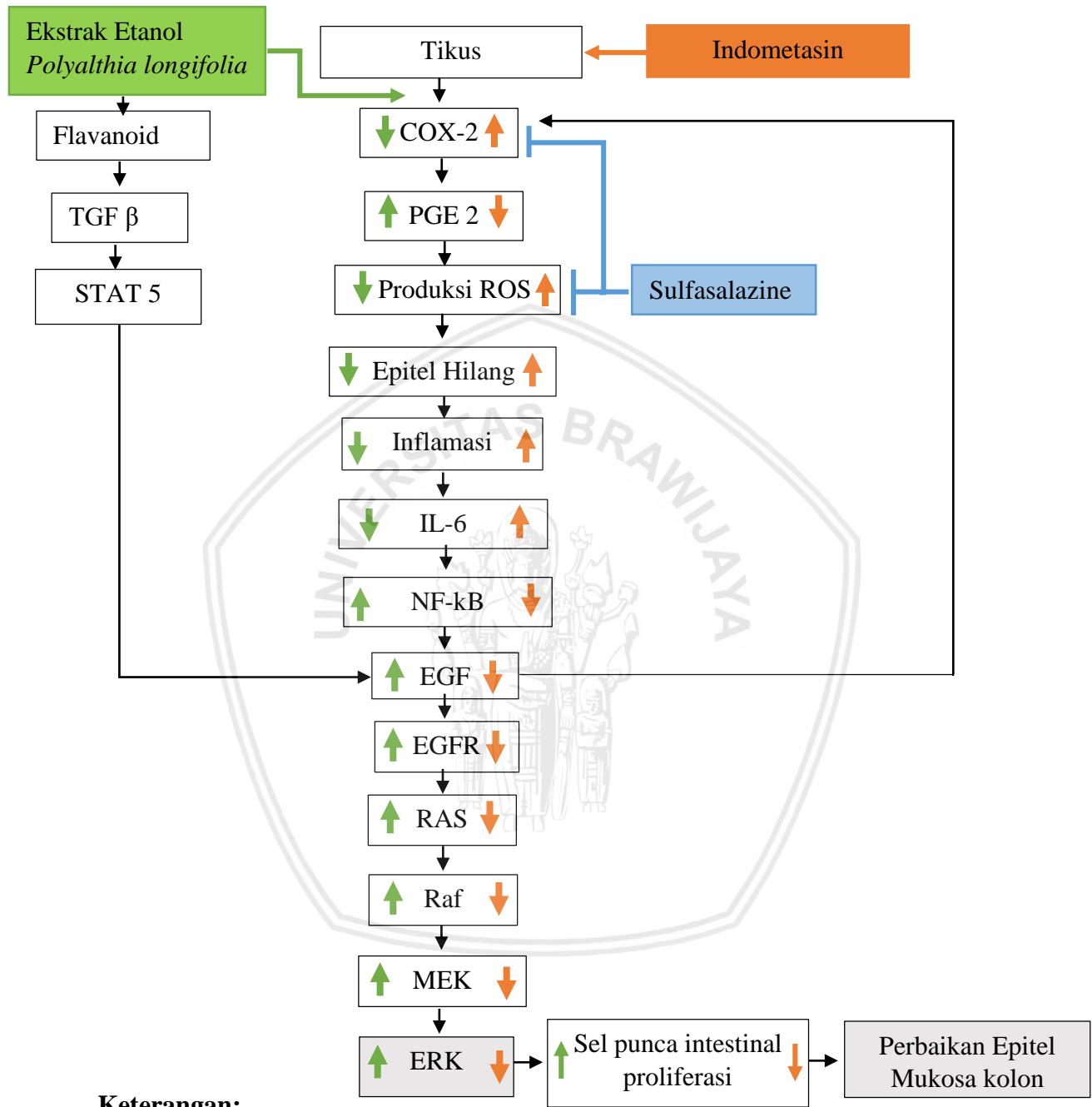
Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Ordo	: Rodentia
Familia	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus novergicus</i> (Amitage, 2004)

Kelebihan dari tikus putih sebagai hewan coba antara lain yaitu kemampuan reproduksi yang tinggi, masa kebuntingan singkat, penanganan yang mudah, sehat, bersih dan cocok digunakan untuk penelitian. Kebutuhan pakan atau nutrisi berupa ikan, daging, biji-bijian dan lain-lain sebesar 28 g/hari. Kucing, anjing dan tikus (*Rattus novergicus*) memiliki kesamaan yakni resisten terhadap pakan yang mengandung kolesterol (Sirois, 2005)



BAB 3 KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan:

↓ = Efek pemberian indometasin

↑ = Efek terapi ekstrak daun *P. longifolia*

= Parameter yang diteliti

— = menghambat produksi

Induksi indometasin pada hewan tikus *Rattus novergicus* menyebabkan adanya hambatan pada enzim siklookksigenase 1 (COX-1) dalam pembentukan prostaglandin pada usus, dan peningkatan COX-2. Prostaglandin yang menurun menyebabkan menurunnya perlindungan terhadap mukosa usus sehingga menyebabkan kerusakan mukosa usus (inflamasi). Kerusakan mukosa usus memicu sitokin IL-6 untuk memediasi efek prolifatif dari aktifasi Nf- κ B yang kemudian mengaktifasi *Epithel Growth Factor* (EGF). Selanjutnya, EGF berikatan dengan EGFR dan merekrut *Guanine nucleotide exchange factor* (GEF) ke membran sel. Rekrutan GEF akan memfasilitasi terjadinya ikatan antara *Guanosine Triphosphate* (GTP) dan Ras serta teraktifasinya Ras-GTP. Selanjutnya kompleks Ras-GTP akan mengaktivasi Raf Serine/Threonin kinase dan menginduksi *Mitogen Activated Protein* (MEK 1 dan MEK 2). Selanjutnya MEK 1 dan MEK 2 akan memicu *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (ERK) 1 dan 2 sehingga terjadi pembentukan faktor transkripsi yang akan menginisiasi proliferasi epitel (Jayalie, dkk., 2016)

Ekstrak daun *Polyalthia longifolia* dengan larutan etanol menghasilkan aktivitas anti-inflamasi dengan memediasi aktivitas penyembuhan dari sel. Kandungan ekstrak berupa flavonoid berperan sebagai antioksidan, anti-inflamasi, dan antibakteri. Kandungan flavonoid akan meningkatkan kemampuan proliferasi dari TGF- β . Selanjutnya, TGF- β memberikan *signal* ke STAT5 untuk memulai proses prolifesi. Aktivasi dari STAT5 memberikan mekanisme langsung untuk mentranslasi *Extracellular signal Regulated Kinase* (ERK 1/2) sebagai faktor transkripsi proliferasi sel (Vezza *et al.*, 2016). Flavonoid juga membantu menstimulasi produksi sitokin TGF- β untuk memaksimalkan penyembuhan

inflamasi pada epitel kolon tikus (Yuslanti dkk., 2016). Pemberian obat sulfasalazine sebagai *gold standard* bekerja dengan menurunkan produksi ROS dan menurunkan COX-2 dalam menyembuhkan inflamasi pada pencernaan tikus (Couto *et al.*, 2010).

3.3. Hipotesis

Berdasarkan rumusan masalah, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut:

1. Pemberian ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* mampu memperbaiki jaringan kolon pada tikus model IBD yang diinduksi Indometasin dilihat dari gambaran hispatologi.
2. Ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* mampu meningkatkan ekspresi ERK pada kolon tikus model IBD yang diinduksi Indometasin.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan mulai pada bulan Oktober sampai Desember 2018. Pelaksanaan preparasi dan uji fitokimia, dilakukan di Laboratorium Biokimia jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya Malang. Pemeliharaan, induksi Indometasin, pembedahan, analisa ERK (*Extracellular Regulated Protein Kinase*) dilaksanakan di Laboratorium Biosains, Universitas Brawijaya Malang.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini antara lain: mesin ayakan no. 60, *rotary evaporator*, kandang tikus, *sterofoam*, *microtome*, *object glass*, mikroskop, *shaker*, *cover glass*, tempat minum untuk tikus, *glove*, *masker*, alat bedah (*scalpel handle*, *blade*, pinset anatomis, dan gunting tajam-tumpul), oven, freezer, tissue.

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain: Daun *Polyalthia longifolia* yang berasal dari Indonesia dan Filipina, aquades, etanol, Tikus (*Rattus norvegicus*) strain *Wistar* jantan berumur 8-12 bulan dengan berat badan 150-180 gram, Indometasin, *corn oil*, *Phosphate buffer salin* (PBS) pH 7,4, formalin buffer, kertas Whatman, Indometasin, Sulfasalazine, Xylol, paraffin, skim susu, PBS Tween, Antibodi Primer *rat anti-ERK*, Antibodi sekunder *goat anti rabbit IgG*, *Strep Avidin Radish Peroxidase* (SA-HRP), *Diamino Benzidine* (DAB), Entelan, *Ethylen Diamine Tetra Acetic Acid* (EDTA).

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena media yang digunakan dalam penelitian ini dianggap sama atau seragam (Kusriningrum, 2008). Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang terbagi menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu kelompok 1 (tikus sehat tidak mendapat induksi Indometasin), kelompok 2 (induksi Indometasin dan terapi obat sulfasalazine), kelompok 3 (induksi Indometasin dan terapi ekstrak etanol *Polyalthia longifolia* Indonesia) dan kelompok 4 (induksi Indometasin dan terapi ekstrak etanol *Polyalthia longifolia* Filipina). Pengulangan sampel dihitung berdasarkan rumus Federer:

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(4-1) \geq 15$$

$$(n-1)3 \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

keterangan:

t = jumlah kelompok

r = jumlah pengulangan tiap perlakuan

Berdasarkan hasil perhitungan di atas, didapat empat macam kelompok perlakuan dengan jumlah ulangan sebanyak 6 kali dalam setiap kelompok sehingga diperlukan 24 ekor hewan coba.

Table 4.1 Rancangan Kelompok Penelitian

Variabel yang diamati (Ekspresi ERK dan Gambaran Histopatologi Kolon)	ULANGAN					
	1	2	3	4	5	6
Kelompok 1 Kelompok kontrol negatif						
Kelompok 2 Induksi Indometasin 15 mg/kgBB + terapi obat <i>Sulfasalazine</i> dosis 20 mg/kgBB						
Kelompok 3 Induksi Indometasin 15 mg/kgBB + terapi ekstrak etanol daun <i>P. Longifolia</i> dari Indonesia dosis 300 mg/kgBB						
Kelompok 4 Induksi Indometasin 15 mg/kgBB + Teapi ekstrak etanol daun <i>P. Longifolia</i> dari Filipina dosis 300 mg/kgBB						

4.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas : dosis Indometasin, ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia*
dari Indonesia dan ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia*
dari Filipina

Variabel terikat : Ekspresi ERK, dan gambaran histopalogi kolon tikus

Variable terkendali : umur tikus, berat badan, jenis kelamin tikus, lingkungan,
pakan, dan minuman.

4.5 Tahap Penelitian

1. Preparasi sampel simplisia dan ekstraksi daun *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina.
2. aklimatisasi
3. Induksi Indometasin sebagai pemodelan tikus IBD
4. Pembuatan pengencer CMC-Na dan larutan Sulfasalazin
5. Pembuatan ekstrak etanol *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dan Filipina
6. Pembuatan hewan model IBD dan Perlakuan terapi Sulfasalazine, ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dan Filipina
7. Pembedahan
8. Uji ekspresi ERK
9. Uji gambaran Histopatologi
10. Analisa

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Preparasi sampel simplisia dan ekstraksi daun *Polyalthia longifolia*

Sampel daun *Polyalthia longifolia* dikumpulkan dari wilayah Kota Malang, sedangkan sampel daun *Polyalthia longifolia* dari Filipina berasal dari pemberian sampel oleh Dr. Ma. Asuncion. Sampel kemudian dicuci dengan air bersih, kemudian dikeringkan dan dihaluskan sehingga diperoleh serbuk. Serbuk kemudian diayak dengan ayakan No. 60.

Ekstraksi daun *Polyalthia longifolia* dilakukan dengan merendam 25 gram serbuk daun *Polyalthia longifolia* didalam etanol 70% selama 24 jam. Kemudian diaduk secara konstan selama 3 jam menggunakan *shaker*. Hasilnya kemudian disaring menggunakan kertas Whatman, dan dilakukan pengulangan sampai

diperoleh ekstrak jernih. Pemekatan filtrat dilakukan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C.

4.6.2 Aklimatisasi

Hewan coba tikus putih jantan diaklimatisasi di Laboratorium Biosains selama 1 minggu di dalam kandang khusus untuk mengelompokkan dan menyeragamkan cara hidup, serta penyesuaian terhadap kondisi kandang percobaan. Setiap kandang disediakan pakan dan minum secara *ad libitum* dan diberi sekam kayu sebagai alas yang dilakukan pergantian selama 3 hari sekali.

4.6.3 Pembuatan Larutan CMC-Na dan Sulfasalazine

Serbuk CMC-Na ditimbang sebanyak 0,5 g dengan neraca analitik, dimasukkan dalam *beaker glass* 50 mL dan dilarutkan dengan akuades hangat ± 50 mL (dilakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer* sampai larut sempurna). Setelah larut semua, dimasukkan dalam labu takar 50 mL dan ditandabataskan dengan menambahkan pelarut akuades. Sehingga diperoleh larutan 100 mL CMC-Na 0,5%. Selanjutnya sulfasalazine sebanyak 20 mg/kgBB dilarutkan dalam 2 mL larutan CMC-Na dengan menggunakan *magnetic stirrer*.

4.6.4 Pembuatan Ekstrak Etanol *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina

Daun glodokan tiang (*Polyalthia Longifolia*) dicuci hingga bersih dengan menggunakan air, kemudian daun dikeringkan dengan cara diangin anginkan. Untuk *sample* daun yang berasal dari Filipina sudah didapat dalam bentuk kering. Daun yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan menggunakan alat penggiling/*blender* hingga menjadi serbuk. Serbuk yang telah jadi kemudian ditimbang dan diayak menggunakan ayakan nomor 60.

Pembuatan ekstrak daun glodokan tiang (*Polyalthia longifolia*) dilakukan dengan cara maserasi dingin. Serbuk daun sebanyak 25 gram direndam dengan etanol 70% selama 24 jam. Selama perendaman berlangsung dilakukan pengadukan konstan dengan *shaker* selama 3 jam. Hasil maserasi tersebut kemudian disaring dengan corong *buchner*, kertas saring dan pompa vakum. Penyaringan terus diulang hingga mendapatkan filtrat yang jernih. Filtrat yang didapat kemudian di pekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C untuk memisahkan ekstrak dan pelarut etanol dan ekstrak yang pekat.

4.6.5 Induksi Indometasin sebagai Pemodelan Tikus IBD dan Pemberian

Terapi Sulfasalazine, Ekstrak Etanol Daun *P.longifolia* Indonesia dan Filipina

Hewan coba diinduksi dengan Indometasin yang telah dilarutkan dengan minyak jagung, sesuai pengelompokan. Dosis indometasin yang disondakan pada hari pertama sebanyak 15 mg/kgBB. Selanjutnya dilakukan terapi pada hewan di hari kedua dengan menggunakan Sulfasalazine 20 mg/kgBB pada kelompok 1, Ekstrak *Polyalthia longifolia* Indonesia dosis 300 mg/kgBB pada kelompok 2, dan Ekstrak *Polyalthia longifolia* Filipina dosis 300 mg/kgBB pada kelompok 3. Terapi dilakukan dua kali sehari selama 7 hari. Selanjutnya dilakukan pembedahan untuk pengambilan organ kolon dan dianalisis.

4.6.6 Pembedahan dan Pengambilan Organ Kolon

Hewan coba di *euthanasi* dengan metode dislokasi leher. Kemudian, diletakkan hewan coba diatas papan *sterofoam* dengan posisi rebah dorsal, ekstremitas pada hewan ditahan dengan menggunakan pin. Pembedahan dilakukan dengan membuka bagian perut dengan menggunakan gunting pada *linea alba*.

Kemudian, organ kolon dipisahkan dari organ yang lainnya. Selanjutnya organ kolon dibilas dengan menggunakan NaCl Fisiologis dingin dan dibagi menjadi dua bagian untuk kemudian dimasukkan kedalam larutan *Phosphate Buffer Saline-azida* (PBS) pH 7,4 dan larutan formalin buffer.

4.6.7 Pembuatan Preparat Histopatologi

Sampel organ yang telah dikoleksi difiksasi dengan menggunakan formalin buffer, kemudian dilakukan dehidrasi dengan menggunakan etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95% dan absolut) selama 1 jam tiap kosentrasi. Kemudian dilakukan *clearing* dengan melakukan perendaman sampel pada larutan xylol I selama 1 jam, xylol II selama 30 menit, dan xylol III selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan proses infiltrasi dengan menggunakan paraffin cair dan dilakukan *embedding* pada blok paraffin, didinginkan pada suhu 4°C. Blok parafin dipotong (*sectioning*) dengan ketebalan 5 µm menggunakan *rotary microtome*. Selanjutnya, potongan organ dicelupkan dalam air hangat, lalu diambil menggunakan *object glass*, kemudian dikeringkan pada suhu ruang pada suhu 26-27°C. Kemudian disimpan pada incubator 37°C selama 24 jam. Selanjutnya preparat diwarnai dengan menggunakan Hematoksilin Eosin.

4.6.8 Pewarnaan Preparat dengan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Pewarnaan bertujuan untuk mewarnai jaringan dengan zat warna hematoksilin yang memberikan warna biru pada inti sel dan eosin untuk memberi warna merah muda pada sitoplasma sel. Langkah pertama pewarnaan dilakukan dengan deparafinasi untuk menghilangkan dan melarutkan parafin yang terdapat pada jaringan. Preparat dimasukkan kedalam xylol sebanyak 2 kali selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan rehidrasi untuk memasukkan air ke dalam jaringan, dengan

memasukkan preparat ke dalam alkohol 100%, 90%, 80% masing-masing selama 5 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir selama 1 menit. Selanjutnya proses pewarnaan dengan menggunakan hematoksilin dilakukan dengan memasukkan preparat ke dalam zat warna hematoksilin selama 5 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 1 menit. Warna biru dari zat warna hematoksilin mewarnai inti sel dan sitoplasma jaringan. Selanjutnya, dilakukan deferensiasi untuk mengurangi warna biru yang pekat pada inti sel dan menghilangkan warna biru pada sitoplasma untuk kemudian diwarnai dengan zat warna eosin.

Proses deferensiasi dilakukan dengan memasukkan preparat ke dalam *hydrolic acid* (HCl) selama 1 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir selama 1 menit. Preparat selanjutnya dimasukkan dalam *lithium carbonat* 0,5 % selama 3 menit untuk memperjelas warna biru pada inti sel. Kemudian preparat dicuci dengan air mengalir selama 1 menit. Proses pewarnaan II dengan menggunakan eosin dilakukan dengan memasukkan preparat dalam zat pewarna eosin selama 3 menit. Setelah proses pewarnaan lengkap, dilakukan dehidrasi dengan memasukkan preparat dalam alkohol 80%, 90%, dan 100% masing-masing 5 menit. Dehidrasi dilakukan untuk menghilangkan air dari jaringan. Kemudian dilakukan *clearing* untuk membuat jaringan jernih dan transparan dengan memasukkan preparat dalam xylol I dan II selama 1 menit. Tahap akhir dari proses pewarnaan adalah dengan mengawetkan jaringan yang telah diwarnai. Preparat diberi *entellan* dan ditutup dengan *cover glass*.

4.6.9 Pengamatan Histopatologi

Pengamatan histopatologi kolon dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x dan 1000x. Gambaran

histopatologi kolon diambil dengan menggunakan kamera digital kemudian diamati berdasarkan gambaran histopatologi yang terlihat.

4.6.10 Pembuatan Preparat Immunohistokimia ERK

Preparat organ yang sudah terbuat dicelupkan ke dalam xylol bertingkat 1, 2, 3 untuk proses deparafinasi. Proses ini dilakukan untuk mengeluarkan paraffin pada jaringan. Selanjutnya direndam dengan etanol bertingkat 95%, 90%, 80%, 70% untuk proses rehidrasi. Masing-masing proses dilakukan selama 15 menit. Kemudian, preparat selanjutnya diinkubasi suhu 4°C selama semalam untuk menghilangkan sisa-sisa etanol. Kemudian sampel dicuci dengan akuades 3x3 menit. Selanjutnya preparat ditetesi dengan Peroksidase yang berisi H₂O₂ 3% didiamkan selama 40 menit. Selanjutnya, preparat dicuci dengan PBS 3 x 3menit. Selanjutnya dilakukan serum blocking dengan menggunakan serum albumin (FBS 1% dan triton 0,2%) dan PBS *tween* sebanyak 50 mikrolit dan diinkubasi *overnight* suhu 4°C. Kemudian sampel dicuci dengan PBS 3 x 3 menit. Selanjutnya, dilakukan penambahan antibodi primer anti rat ERK sebanyak 10 μ l dan didiamkan pada suhu 4°C selama semalam. Sampel yang telah ditetesi antibodi primer dicuci dengan PBS 3 x 3 menit dan dilakukan pemberian antibodi sekunder *goat anti rabbit* selama 1 jam sebanyak 10 μ l pada suhu ruang, selanjutnya dicuci kembali dengan PBS 3 x 3 menit. Sampel diberi *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP) 1 tetes per jaringan dan diinkubasi selama 40 menit suhu ruang. Sampel kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 x 3 menit, lalu ditetesi *Diamino Benzidine* (DAB) sebanyak 100 μ l dan diinkubasi selama 10 menit dalam suhu ruang. Pencucian kembali sampel dengan akuades, kemudian ditetesi *mayer hematoxilen* dan didiamkan 2-5 menit. Selanjutnya ditetesi akuades terus

didiarkan 10 menit. Kemudian preparat dicuci dengan akuades mengalir kemudian dikeringkan suhu ruang. Sampel ditetesi entelan dan ditutup *cover glass*. Preparat diamati dibawah mikroskop Olympus CX-31 dengan pembesaran 1000 kali.

4.6.11 Analisis Ekspresi ERK Kolon dengan metode Immunohistokimia (IHK)

Keberadaan ERK dalam kolon dianalisis secara kualitatif dengan cara membandingkan jumlah ERK dalam sediaan histologi masing-masing kelompok penelitian dengan perlakuan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x dan difoto serta di analisa menggunakan *Image-Raster (Optilab Software)*. Chromogen DAB pada proses pewarnaan immunohistokimia digunakan untuk menunjukkan adanya ikatan antara antigen dengan antibodi, dengan memunculkan warna coklat spesifik yang dapat terlihat dengan mikroskop cahaya biasa.

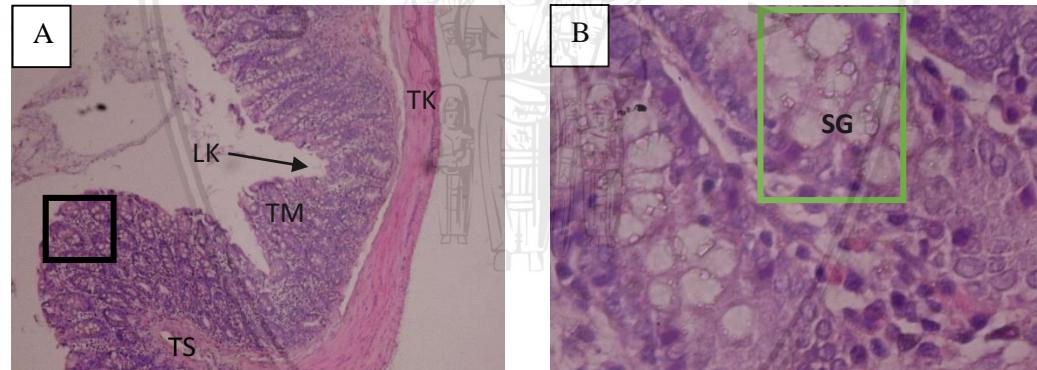
4.6.12 Analisis Data

Data hasil perlakuan berupa ekspresi ERK dianalisis secara kuantitatif menggunakan analisis ragam (ANOVA) dilanjutkan dengan uji lanjutan *Tukey* ($\alpha = 5\%$) untuk melihat hasil terapi dari kelompok sulfasalazine, ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dan Filipina. Menggunakan uji *Independent T-Test* untuk membandingkan antara kelompok terapi ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dan Filipina. Semua uji dilakukan menggunakan *Software Statistic Packed for The Social Science* (SPSS). Data hasil pengamatan histopatologi kolon dianalisis secara deskriptif.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Daun *Polyalthia longifolia* Terhadap Perbaikan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus (*Rattus norvegicus*) Inflammatory Bowel Disease (IBD) Hasil Induksi Indometasin

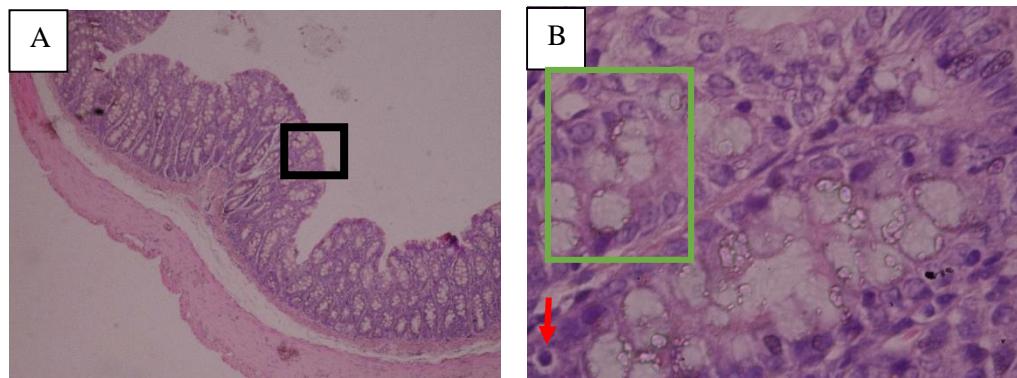
Penggunaan obat Indometasin menyebabkan hambatan pada COX-1 sehingga menyebabkan peningkatan perlekatan leukosit PMN pada endotel vaskuler yang menyebabkan peningkatan ROS yang berakibat kerusakan mukosa kolon ditunjukkan oleh pemendekan kripta liberkuhn dan kurangnya sel goblet. Keberhasilan pemberian terapi ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* pada tikus IBD selain diamati dari tingginya ekspresi ERK, juga dapat diketahui melalui pengamatan histopatologi kolon dengan pewarnaan hematoxylin eosin (HE).



Gambar 5.1 Gambar Histopatologi kolon tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok terapi sulfasalazine *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dengan pewarnaan HE

Keterangan : (A) Gambar histopatologi kolon tikus kelompok terapi Sulfasalazine perbesaran 100x, (B) Gambar Histopatologi kolon tikus kelompok terapi Sulfasalazine perbesaran 1000x terlihat adanya sel goblet

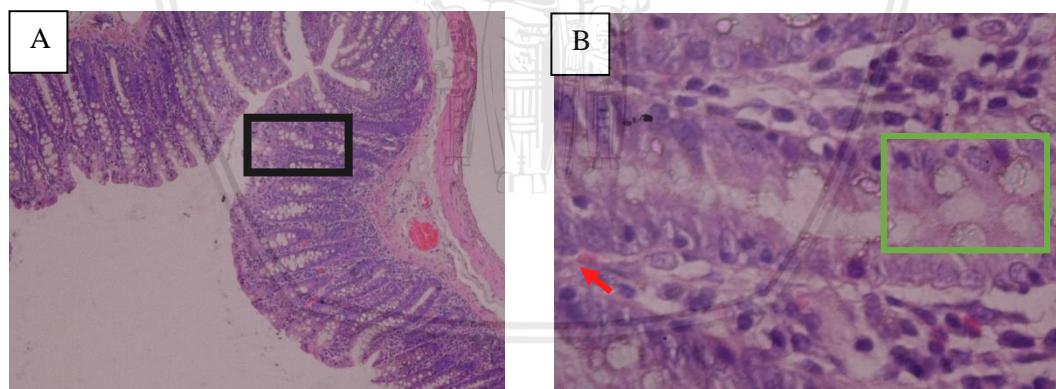
	= adanya perbaikan pada kolon	LK= Lumen Kripta
SG	= Sel Goblet	TM= Tunika Mukosa
TK	= Tunika Muskularis	
TS	= Tunika Submukosa	



Gambar 5.2 Gambar Histopatologi kolon tikus (*Rattus norvegicus*) Inflammatory Bowel Disease (IBD) kelompok terapi ekstrak etanol *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dengan pewarnaan HE

Keterangan : (A) Gambar histopatologi kolon tikus kelompok terapi ekstrak etanol *Polyalthia longifolia* dari Indonesia perbesaran 100x, (B) Gambar Histopatologi kolon tikus kelompok terapi ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia perbesaran 1000x terlihat adanya sel goblet pada epitel, tetapi masih ditemukan sedikit sel radang

- = adanya perbaikan kolon berupa adanya sel goblet
- = adanya infiltrasi sel radang



Gambar 5.3 Gambar Histopatologi kolon tikus (*Rattus norvegicus*) Inflammatory Bowel Disease (IBD) kelompok terapi ekstrak etanol *Polyalthia longifolia* dari Filipina dengan pewarnaan HE

Keterangan : (A) Gambar histopatologi kolon tikus kelompok terapi ekstrak etanol *Polyalthia longifolia* dari Filipina perbesaran 100x (B) Gambar Histopatologi kolon tikus kelompok terapi ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Filipina perbesaran 1000x terlihat adanya sel goblet pada epitel, tetapi masih ditemukan sedikit sel radang

- = adanya perbaikan kolon
- = adanya infiltrasi sel radang

Tabel 5.1 Deskripsi gambaran histopatologi organ kolon

Kelompok Perlakuan	Keterangan
Kelompok Terapi Sulfasalazine	Adanya Sel Goblet, permukaan epitel terlihat teratur
Kelompok Terapi Ekstrak Etanol Daun <i>Polyalthia longifolia</i> Indonesia	Adanya sel goblet, masih ditemukan infiltrasi sel radang, permukaan epitel terlihat kurang teratur
Kelompok Terapi Ekstrak Etanol Daun <i>Polyalthia longifolia</i> Filipina	Adanya sel goblet, masih ditemukan sel radang, susunan epitel kolumnar terlihat tidak teratur

Gambaran hasil histopatologi tikus kelompok terapi sulfasalazine (**Gambar 5.1**) menunjukkan perbaikan pada jaringan kolon. Hal ini ditunjukkan dengan adanya sel goblet pada lapisan mukosa epitel kolon. Sel goblet pada kolon berfungsi sebagai *barrier* pada bagian mukosa kolon dengan mengeluarkan senyawa mucin. *Barrier* pada sel goblet berfungsi melindungi kolon terhadap zat kimia dan mencegah penempelan bakteri yang akan masuk ke epitel (Himah, 2017). Adanya sel goblet pada perbaikan jaringan kolon dikarenakan sulfasalazine memiliki kemampuan menekan produksi radikal bebas sehingga mempercepat masa waktu inflamasi dan meningkatkan kerja TGF- β sebagai sitokin antiinflamasi untuk regenerasi sel punca intestinal dan berdiferensiasi menjadi beberapa macam sel yaitu enterosit, sel goblet, dan sel paneth (Craven *et al.*, 2002).

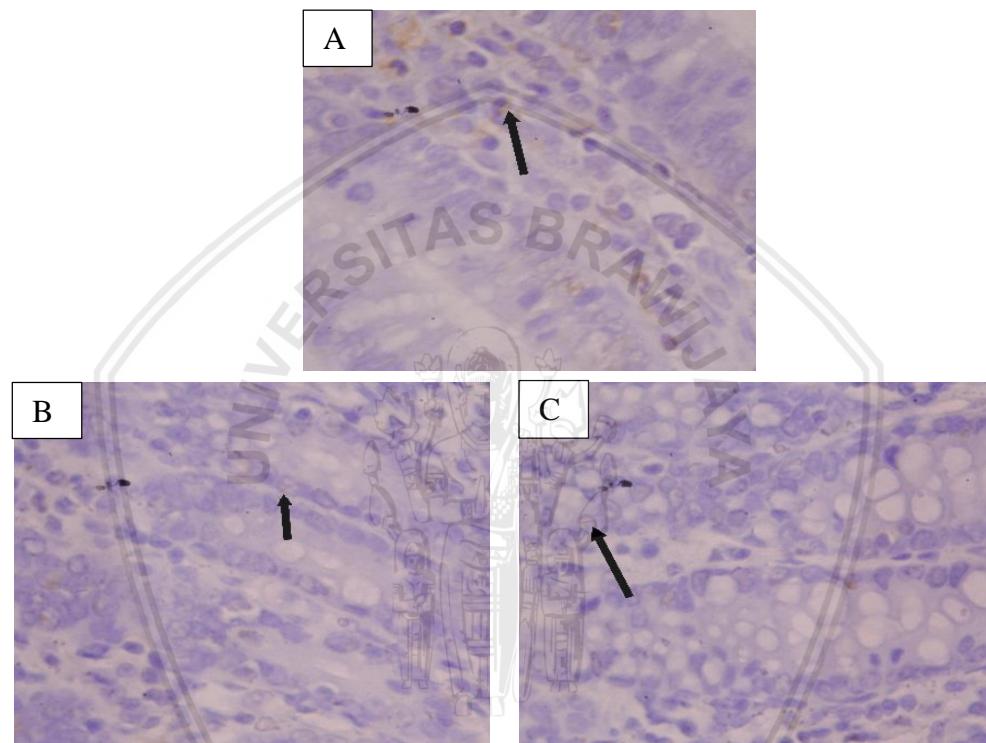
Gambaran hasil histopatologi tikus kelompok terapi ekstrak etanol *Polyalthia longifolia* dari Indonesia (**Gambar 5.6**) dan Filipina (**Gambar 5.7**) juga menunjukkan perbaikan pada jaringan kolon ditandai dengan adanya sel goblet pada lapisan mukosa epitel. Hal ini disebabkan karena *Polyalthia logifolia* memiliki

kandungan flavonoid berupa quercetin dan rutin yang mampu menghambat generasi ROS, mengurangi mediator pro-inflamasi, memperbaiki fungsi perlindungan epitel pada saluran pencernaan. Flavonoid diketahui mampu meningkatkan permeabilitas kolon (Vezza *et al.*, 2016).

Flavonoid dalam perbaikan mukosa kolon bekerja dengan cara mendonorkan atom hydrogen (H) dari gugus hidroksil (OH) kepada ROS (Aulanni'am *et al.*, 2012). Menurut Tanaka, *et al.*, (2013) flavonoid dalam memperbaiki histopatologi jaringan akibat inflamasi dengan menghambat aktivasi sel T *helper* 2 (Th2). Hambatan tersebut menyebabkan TNF- α , interleukin 4 (IL-4) dan Interleukin 13 (IL-13) tidak teraktivasi. Penurunan TNF- α menyebabkan penurunan neutrofil, penurunan IL-4 dan IL13 menyebabkan tidak teraktivasinya sel B sehingga tidak memproduksi IgE untuk mengaktifasi sel mast. Sel mast dan neutrofil tidak teraktivasi maka akan menurunkan kadar protease dan menurunkan kadar radikal bebas sehingga kerusakan sel berkurang. Selanjutnya, TGF- β menginisiasi perbaikan organ kolon (Zhang *et al.*, 2005).

5.2 Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol *Polyalthia longifolia* Terhadap Ekspresi Extracellular Signal Regulated Kinase (ERK) Tikus Inflammatory Bowel Disease (IBD) Hasil Induksi Indometasin

Ekspresi ERK pada organ kolon ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada jaringan kolon tikus yang dikonfirmasi dengan penggunaan antibodi monoklonal ERK pada metode imunohistokimia (IHK).



Gambar 5.4 Ekspresi ERK pada kolon tikus (*Rattus norvegicus*) *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dengan perbesaran 1000x

Keterangan : (A) Tikus dengan terapi Sulfasalazine, (B) Tikus dengan terapi Ekstrak Etanol *Polyalthia longifolia* dari Indonesia, (C) Tikus dengan terapi Ekstrak Etanol *Polyalthia longifolia* dari Filipina. Tanda panah hitam (→) menunjukkan ekspresi ERK.

Hasil pewarnaan imunohistokimia pada tikus kontrol negatif (**Lampiran 7**) menunjukkan adanya ekspresi ERK karena pada keadaan normal, ERK ditemukan untuk mengendalikan laju proliferasi sel (Athiyyah, 2014). ERK merupakan protein yang memberikan *signal* untuk menginisiasi proses proliferasi pada sel. Tingginya

ekspresi ERK yang muncul setelah dilakukan terapi menjadi acuan penyembuhan sel.

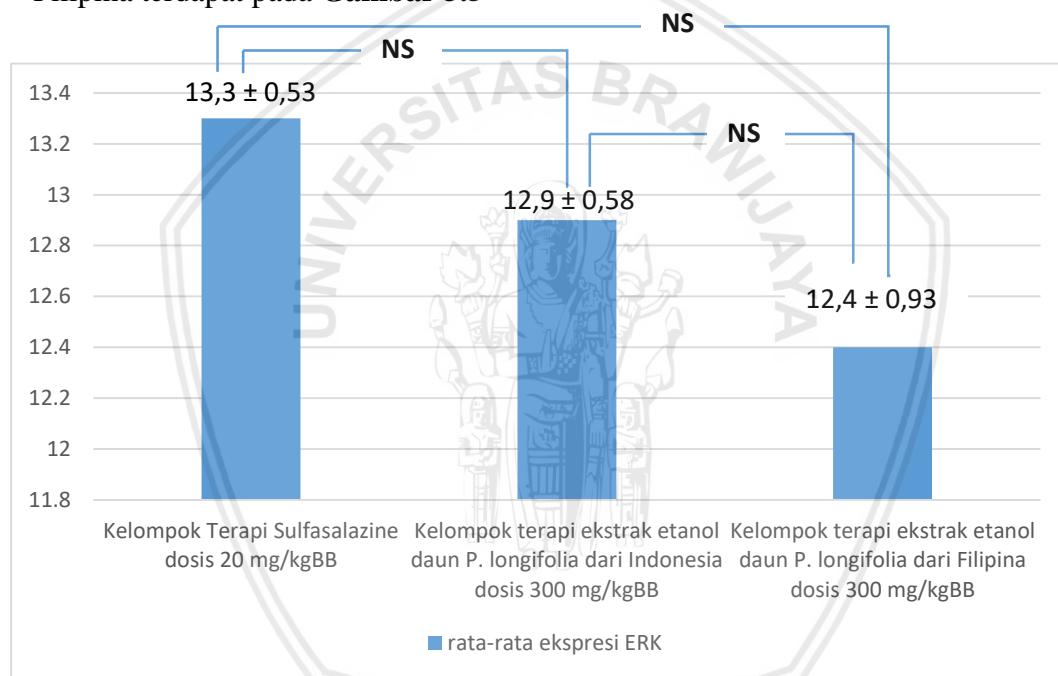
Analisa statistika dilakukan menggunakan SPSS 22.0 *for Windows* dengan Uji Normalitas (**Lampiran 7**) dan uji homogenitas (**Lampiran 7**) yang menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen, selanjutnya dilakukan uji statistik *One Way ANOVA* (**Lampiran 7**) diperoleh hasil nilai $P<0,05$ kemudian dilanjutkan Uji Tukey (**Lampiran 7**). Analisa statistika untuk membandingkan hasil antara ekspresi ERK pada terapi ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dan Filipina menggunakan uji statistik *Independent T-Test*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pada setiap perlakuan. Hasil pengujian statistik ANOVA terdapat pada **Tabel 5.2**

Tabel 5.2 Hasil uji ANOVA ekspresi ERK pada jaringan kolon tikus (*Rattus novergicus*) hasil terapi ekstrak etanol *Polyalthia longifolia* dan Sulfasalazine

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Ekspresi ERK \pm SD
Terapi Sulfasalazine 20 mg/kgBB	$13,3 \pm 0,53^a$
Terapi Ekstrak Etanol daun <i>Polyalthia longifolia</i> Indonesia 300 mg/kgBB	$12,9 \pm 0,58^a$
Terapi Ekstrak Etanol daun <i>Polyalthia longifolia</i> Filipina 300 mg/kgBB	$12,4 \pm 0,93^a$

Hasil analisis data ekspresi ERK pada **Tabel 5.2** menunjukkan rata-rata ekspresi pada kelompok terapi *gold standard* Sulfasalazine adalah 13,3 dengan notasi a. Pada kelompok terapi ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia memiliki rata-rata ekspresi ERK 12,9 dengan notasi a. Pada kelompok terapi ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Filipina memiliki rata-rata

ekspresi ERK 12,4 dengan notasi a. Terlihat pada ketiga perlakuan bahwa tidak ada perbedaan signifikan ($P<0,05$) ditandai dengan persamaan notasi antara kelompok terapi *gold standard* menggunakan sulfasalazine, kelompok terapi ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina. Namun, dapat terlihat hasil rata-rata ekspresi ERK tertinggi terdapat pada kelompok terapi dengan *gold standard* sulfasalazine. Grafik hasil perhitungan rata-rata ekspresi ERK pada kelompok terapi sulfasalazine, ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina terdapat pada **Gambar 5.5**



Gambar 5.5 Grafik rata-rata ekspresi ERK pada organ kolon kelompok terapi tikus *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) hasil induksi Indometasin

Keterangan : NS = Not Significant

Sulfasalazine mempunyai efek penyembuhan IBD dengan menurunkan ROS, inhibisi dari enzim COX dan Lipoksigenase, menghambat produksi sitokin dari IL-2, IL-1, IL-12, TNF- α , dan meningkatkan aktivasi *Nuclear Factor kB* (NF- kB) (Couto *et al.*, 2010). Sulfasalazine berperan sebagai antioksidan dengan menghambat enzim myeloperoksidase berikatan dengan H_2O_2 sehingga tidak menyebabkan terbentuknya HOCl (asam hipoklor) yang merupakan salah satu jenis

ROS yang muncul saat terjadi inflamasi. Dalam perannya sebagai antiinflamasi, sulfasalazine menghambat produksi enzim COX-2 dan meningkatkan produksi Prostaglandin G2 dan H2 sebagai perlindungan mukosa usus (Punchard *et al.*, 2003). Penggunaan sulfasalazine, sebagai NSAID dalam jangka waktu lama menimbulkan efek samping yang merugikan pada tubuh. Oleh karena itu diperlukan terapi alternatif dengan terapi herbal ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia*.

Tabel 5.3 Hasil Uji *Independent T Test* Ekspresi ERK pada jaringan kolon tikus (*Rattus norvegicus*) hasil terapi ekstrak etanol *Polyalthia longifolia* dan Sulfasalazine

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Ekspresi ERK ± SD
Terapi Ekstrak Etanol daun <i>Polyalthia longifolia</i> Indonesia 300 mg/kgBB	12,9 ± 0,58 ^a
Terapi Ekstrak Etanol daun <i>Polyalthia longifolia</i> Filipina 300 mg/kgBB	12,4 ± 0,93 ^a

Pada **Tabel 5.3** hasil uji *Independent T-Test* ekspresi ERK terlihat pada kelompok terapi ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia memiliki rata-rata ekspresi ERK lebih tinggi daripada kelompok terapi ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Filipina. Ekstrak etanol *Polyalthia longifolia* memiliki kandungan senyawa aktif berupa flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi. Zat aktif flavonoid dalam *Polyalthia longifolia* diantaranya ada quercetin (Mundhe *et al.*, 2011). Dalam perannya sebagai antioksidan, quercetin diketahui mampu menghambat ikatan H_2O_2 sehingga tidak terbentuk ROS (Mansuri, *et al.*, 2014). Flavonoid juga berfungsi untuk membatasi pelepasan mediator inflamasi. Flavonoid menghambat TNF- α untuk menginduksi IFN- γ dan

makrofag pro-inflamasi pada sel intestinal. Hal ini menyebabkan proses inflamasi berlangsung lebih singkat dan meningkatkan kemampuan proliferasi dari TGF- β . Selanjutnya, TGF- β memberikan *signal* ke STAT5 untuk memulai proses proliferasi. Aktivasi dari STAT5 memberikan mekanisme langsung untuk mentranslasi *Extracellular-Signal* (ERK 1/2) menjadi faktor transkripsi (Vezza *et al.*, 2016). Aktivasi dari ERK 1/2 selanjutnya akan menginisiasi perbaikan epitel jaringan kolon sesuai dengan hasil pengamatan histopatologi.



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan terkait dengan variabel yang diamati, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa:

1. Ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dan Filipina dengan dosis 300 mg/kgBB dapat memperbaiki histopatologi kolon tikus *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) hasil induksi indometasin
2. Ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dengan dosis 300 mg/kgBB mampu menekan ERK lebih tinggi pada kolon tikus *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) hasil induksi indometasin daripada kelompok terapi ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Filipina dengan dosis 300 mg/kgBB

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian terkait lama terapi menggunakan ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dan Filipina dalam mengobati *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) hasil induksi Indometasin.

DAFTAR PUSTAKA

- Aulanni'am, Anna Rosdiana, and N. L. Rahmah. 2012. *The Potency of Sargassum duplicatum Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy in Rattus norvegicus*. Journal of Life Sciences 6 : 144-154.
- Annan, K., R. A. Dickson, K. Sarpong. 2013. *Antipyretic Activity Polyalthia longifolia Benth. And Hook. F. var Pendula on Lipopolysaccharide-Induced Fever in Rats*. Journal of Medical and Biomedical Sciencer 2(1):8-12
- Amitage, D. 2004. *Rattus novergicus*. Animal Diversity Web. University of Michigan of Zoology
- Arkun Y, M. Yasemi. 2018. *Dynamics and control of the ERK signaling pathway: Sensitivity, bistability, and oscillations*.
- Athiyyah, A. F. 2014. *Mekanisme Perbaikan Mukosa Usus Akibat Pemberian Lipopolisakarida Escherchia coli O55:b%* oleh Lactobacil
- Borne, R., Revi M., dan Wilson, N., 2008. *Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs dalam Lemke, T.L., Williams, D.A., Roche, V.F., dan Jito, S.W., (eds.), Foye's Pronciples of Medicinal Chemistry 6th Ed.*, 2-5
- Corwin, E.J., 2008. *Handbook of Pathophysiology 3th edition*. Philadelphia: Lippincort Williams & Wilkins.
- Craven, P. A., J. Pfanziel, R. Saito, F.R. DeRubertis. 2002. *Action of Sulfasalazine and 5 Aminosalicylic Acid as Reactive Oxygen Scavengers in the Suppression of Bile Acid-Induced Increases in Colonic Epithelial Cell Loss and Proliferative activity*. University Pittsburgh. Pennsylvania.
- Defarges A. 2016. *Inflammatory bowel disease in small animals*. Merck veteterinary manual. Merck Sharp & Dohme Corp.: USA
- Egesie U.G., Chima K.E., Galam N.Z. 2011. *Anti-inflammatory and Analgesic Effects of Aqueous Extract of Aloe Vera (Aloe barbadensis) in Rats*. African Journal of Biomedical Research. 14(3):209-12
- Epstein, M.M. 2004. *Do Mouse Models of Alergic Asthma Mimic Clinical Disease?*. Int. Arch. Allergy Immunol. 133, 84-100
- Eroschenko, P., Victor. 2003. *Sistem Pencernaan: Hepar, Kandun Empedu, dan Pankreas dalam Atlas: Histologi di Fiore dengan Korelasi Fungsional*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC : 217-222
- Firmansyah, M. A. 2013. *Perkembangan Terkini Diagnosis dan Penatalaksanaan Inflammatory Bowel Disease*. Jakarta

- Gartner, L. P. and L.H James. 2012. *Atlas Berwarna Histologi Edisi Kelima Binarupa Aksara Publiser*. Tangerang. Indonesia.
- Hartono, Budiman. 2016. *Sel Punca: Karakteristik, Potensi, dan Aplikasinya*. Fakultas Kedokteran
- Hendrich, H.J. 2006. *Toxonomy stock and strains*. Journal of The Laboratory Rat 71(92).
- Himah, S.E.F. 2017. *Efek Ekstra Etanol Rimpang Kunyit (Curcuma longa) Terhadap Struktur Histologi Kolon Tikus Putih (Rattus norvegicus) yang Diinduksi Dextra Sodium Sulfat (DSS)*. Universitas Jember
- Houser, K., D.K. Johnson and F.T. Ishmael. 2012. *Anti-Inflammatory Effects of Methoxyphelonic Compounds on Human Airway Cells*. Journal of Inflammation 9 (6).
- Jayalie, Vito Filbert, Andy William, Shelly, Cosphiadi. 2016. *Peran Metformin sebagai Inhibitor Jaras Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor (IGF-1R), Epidermal Growth Factpr Receptor (EGFR), dan Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) pada Kemoterapi Kanker Paru*. CDK-241 vol. 43 no. 6
- Karin, M. 2004. *Mitogen Activated Protein Kinases as Targets for Development of Novel Anti-Inflammatory Drugs*. Ann Rheum Dis
- Katkar, K.V., Suthar, A.C. Chauhan, and Vijay. 2010. *The Chemistry, Pharmacologic, And Therapeutic Applications Of Polyalthia Longifolia*. Pharmacognosy reviews. 4. 62-8.
- Korpacka, M., K. Neubauer, and M. Matusiewicz. 2009. *Platelet-Derived Growth Factor-BB Reflects Clinical, Inflammatory and Angiogenic Disease Activity and Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease*. Clinical Biochemistry. 42 : 602 – 1609
- Mandal, S., Rajani, G., Sharma, R., and Gupta, N. 2012. *In vitro antioxidant and anti-inflammatory potential of Polyalthia longifolia in rats*. Indian Journal of Pharmacology, 44(2), 277.
- Mansuri, M., Priyanka P., Isha S., Mordhwaj S.P. 2014. *Flavonoid in Modulation of Cell Survival Signalling Pathways*. School of Studies in Zoology and Biotechnology, Vikram University. India
- Marks SL. 2013. *How I treatdogs with inflammatory bowel disease*. Southern European Veterinary Conference and Congreso Nacional AVEPA. Barcelona (Spain). Oct 17-19, 2013

- Mas'ud, M.S dan P. Aminuddin. 2009. *Performa Pertumbuhan Tikus Putih (Rattus norvegicus) yang Diberi Ransum Berbagai Taraf Limbang Udang*. Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Masbuchin, A.N, Nurdiana, dan B. P. Suryana. 2014. *Efek Gastroprotektif Bawang Prei (Allium fistulosum) terhadap Gastropati pada Lambung Tikus Wistar (Rattus novergicus) yang Diinduksi Indometasin*. Majalah Kesehatan FK UB Vol.1
- Mundhe, K.S., Asha A.K., Sucheta A.G., Nirmala R.D., Rajashree V.K. 2011. *Evaluation Of Phenol, Flavonoid Contents And Antioxidant Activity Of Polyalthia longifolia*. J.Chem. Pharm. Res., 3(1): 764-769.
- Mustaqim, A., Aswiyati A., dan Almurdi. 2017. *Pengaruh Pemberian Gel Lidah Buaya (Aloe vera) Terhadap Gambaran Histopatologi Gaster Tikus WIstar yang Diinduksi Indometasin*. Artikel Penelitian Jurnal Universitas Udayana Vol. 6 No. 3
- Neiger R. 2014. Inflammatory bowel disease, pathogenesis, diagnosis and treatment. Southern European Veterinary Conference and Congreso Nacional AVEPA. Barcelona (Spain). Oct 16-18, 2014.
- Neuman, M.G. dan R. M Nanau. 2011. *Inflammatory Bowel Disease: Role Of Diet Microbiota, Lifestyle*. Translational Research 160 (1):29-44
- Nur, M.R. 2016. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Glodokan Tiang (Polyalthia longifolia) Terhadap Bakteri Escherichia coli*. Karya Tulis Ilmiah Akademi Farmasi Samarinda
- Ohnishi, H., Takeda, Katsuyuki & Domenico, Joanne & J. Lucas, Joseph & Miyahara, Nobuaki & Swasey, Christina & Dakhama, Azzeddine & W Gelfand, Erwin. 2009. *Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2-Dependent Pathways Are Essential For CD8(+) T Cell-Mediated Airway Hyperresponsiveness And Inflammation*. The Journal Of Allergy And Clinical Immunology. 123. 249-57.
- Punchard, N.A, S.M Greenfield, R.P.H Thompson. 2003. *Mechanism of Action of 5-aminosalicylic Acid*. Journal Gastrointestinal Laboratory The Reyne Institute St. Thomas Hospital. London.
- Roberts, PJ., dan CJ. Der. 2007. *Targeting the Raf-MEK-ERK Mitogen Activated Protein Kinase Cascade for The Treatment of Cancer*. University of North California USA
- Roberts, L.J and J.D. Morrow. 2001. *Senyawa Analgetik-Antipiretik dan Antiradang Serta Obat-Obat yang Digunakan Dalam Penanganan Pirai*,

dalam Gilman, A.G., Hardman, J.G., dan Limbird, L.E., Goodman dan Gilman *Dasar Farmakologi Terapi Vol. 1.*

Roberts, PJ., dan CJ. Der. 2007. *Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen Activated Protein Kinase Cascade for The Treatment of Cancer.* University of North California USA

Segal,A.W. 2005. *How neutrophils kill microbes.* Annu. Rev. Immunol. 23, 197-223

Sholichah, N. A. 2012. Thesis: *Potensi Terapi Ekstrak Air Daun Kedondong (Lannea coromandelica) Terhadap Perbaikan Ileum Tikus Putih (Rattus norvegicus)*

Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures.* United States of America: Mosby, Inc.

Son, Y., Y.K. Cheong, N.H. Kim, H.T. Chung, D.G. Kang, H.O. Pae. 2010. *Mitogen Activated Protein Kinase dan Reactive Oxygen Species: How Can Ros Activate MAPK Pathways?.* Review Article Journal of Signal Transduction University of Medicine Republic of Korea. Korea.

Sudirman, P.L., F. R. Pertiwi dan S. Pradnyani. 2010. *Pemberian Topikal Ekstrak Etanol Buah Adas (foeniculum vulgare Mill.) Konsentrasi 50% Lebih Menurunkan Makrofag dan Neutrofil Daripada Povidine Iodine untuk Penyembuhan Radang Mukosa/Stomatitis Mukosa Mulut Tikus Putih Jantan.* Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. Bali.

Sunaryo, L., P. Tirtoprodjo, Harijadi. 2013. *Hubungan antara Ekspresi ALDH-1 dan EGFR-1 dengan Karakteristik Klinikopatologi Karsinoma Kolorektal.* Majalah Patologi Universitas Gajah Mada Vol. 22 No. 2. Yogyakarta

Talley NJ, M.T. Abreu, J.P. Achkar, et al. 2011. *An Evidence-Based Systemic Review on Medical Therapies for Inflammatory Bowel Disease.* Am J Gastroenterol; 106:S2 – S25.

Takeuchi, K., A. Tanaka, R. Ohno and A. Yokota. 2003. *Role of COX Inhibition in Patogenesis of NSAID-Induced Small Intestinal Damage.* Research article. Kyoto Pharmaceutical University. Kyoto

Vezza, T., A.R. Nogales, F. Algeiri, M. P. Utrilla, M.E.R Cabazes, J. Galvez. 2016. *Flavonoids in Inflammatory Bowel Disease: A Review.* Nutrients, 8(4), 211.

Vicki, B. A. 2017. *Pengaruh Ekstrak Akar Seledri Sebagai Terapi Inflammatory Bowel Disease (IBD) Terhadap Profil Protein Dan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus (Rattus norvegicus) Yang Diinduksi Indometasin.* Universitas Brawijaya. Malang

- Yang, S., and S. Zheng. 2017. *TGF- β : Its Role in The Differentiaion and Function of T Regulatory and Effector Cell*. Turkish Journal of Biology 41: 1-11
- Yuslanti, E. R., B. M. Bachtiar, D. F. Suniarti, A. B. Sujiatmo, dan T. Mozef. 2016. *Effect of Rambutan-honey and Its Flavonoid on TGF- β Induce Fibroplasia Oral Wound Healing*. Research Journal of Medicinal Plants Indonesian Institute of Science. Indonesia
- Zhong, Ying-Qiang, Hua Rong-Huang, Zhao- Hua Zhu, Qi-Kui Chen, Jun-Zhan, Lian-Chun Xing. 2005. *Effects of Sulfasalazine on Biopsy Mucosal Pathologies and Histological Grading of Patients with Active Ulcerative Colitis*. World Journal of Gastroenterology 11(28): 4435-4438. China



Lampiran 1. Taksonomi Daun *Polyalthia longifolia*



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA FAKULTAS MIPA
JURUSAN BIOLOGI
Jl. Veteran, Malang 65145, Jawa Timur, Indonesia, Telp-fax : +62-341-575841
<http://biologi.ub.ac.id>

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0237/UN10.F09.42/03/2018

Kepala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:

Nama : Day Shine Nahari (NIM 166090200011009)*
Tri Zulfi Anita (NIM 176090200111002)*
Tiara Novita (NIM 155130101111034)
Ikke Alma Aluka (NIM 155130100111018)
Erica Imarinda Agustine (NIM 155130101111037)
Angger Annisa Pentalokasari (NIM 155130101111038)

Instansi : Jurusan Ilmu Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya (*)
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya

Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1968), volume I, halaman 107, diidentifikasi sebagai:

Familia : Annonaceae
Genus : *Polyalthia*
Species : *Polyalthia longifolia* (Sonnerat) Thwait.
Nama lokal : Glodogan tiang

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 30 Agustus 2018

Kepala Laboratorium
FAKULTAS MIPA JURUSAN BIOLOGI
LABORATORIUM Dr. Jati Batoro, M.Si
TAKSOKOM NIP. 195704251986011001

Lampiran 2. Hasil Uji Kualitatif Kandungan *Polyalthia longifolia*

2.1 Ekstrak *P.longifolia* dari Indonesia

Golongan Senyawa	Ada/Tidak	Keterangan
Tanin	Ada	Setelah adanya penambahan $FeCl_3$ larutan berwarna hijau kehitaman
Saponin	Ada	Bisa stabil setelah ditetesi HCl 2N
Terpenoid	Ada	Terdapat cincin coklat diantara 2 pelarut
Alkaloid Mayer	Ada	Terbentuk endapan putih
Alkaloid Wagner	Ada	Terbentuk endapan coklat
Flavonoid	Ada	Larutan berwarna merah

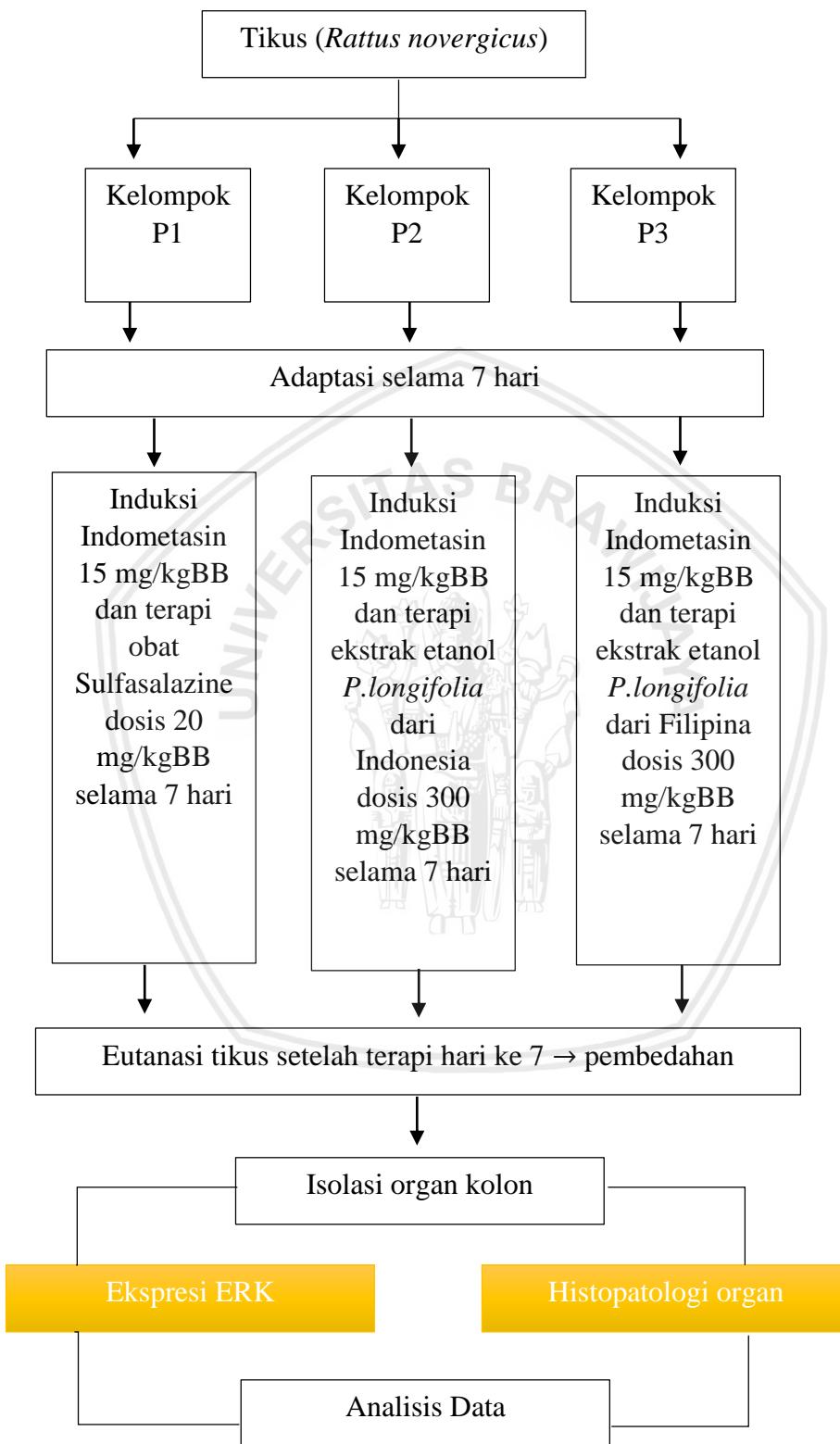
2.2 Ekstrak *P.longifolia* dari Filipina

Golongan Senyawa	Ada/Tidak	Keterangan
Tanin	Ada	Setelah adanya penambahan $FeCl_3$ larutan berwarna hijau kehitaman
Saponin	Ada	Bisa stabil setelah ditetesi HCl 2N
Terpenoid	Ada	Terdapat cincin coklat diantara 2 pelarut
Alkaloid Mayer	Ada	Terbentuk endapan putih
Alkaloid Wagner	Ada	Terbentuk endapan coklat
Flavonoid	Ada	Larutan berwarna merah

Lampiran 3. Laik Etik

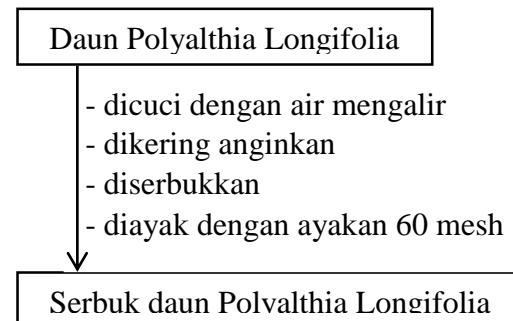
 KOMISI ETIK PENELITIAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
KETERANGAN KELAIKAN ETIK “ETHICAL CLEARENCE”
No: 1035-KEP-UB
KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE) UNIVERSITAS BRAWIJAYA TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:
PENELITIAN BERJUDUL : TERAPI EKSTRAK ETANOL DAUN <i>Polyalthia longifolia</i> INDONESIA DAN FILIPIN TERHADAP EKSPRESI CYCLOOXYGENASE-2, PROSTALGLANDIN DAN GAMBARAN HISPATOLOGI LAMBUNG TIKUS (<i>Rattus norvegicus</i>) MODEL INFLAMMATORY BOWEL DISEASE YANG DIINDUKSI INDOMETASIN
PENELITI : TRI ZULFI ANITA
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA
DINYATAKAN : LAIK ETIK
Malang, 2 November 2018  Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES. NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 4. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian

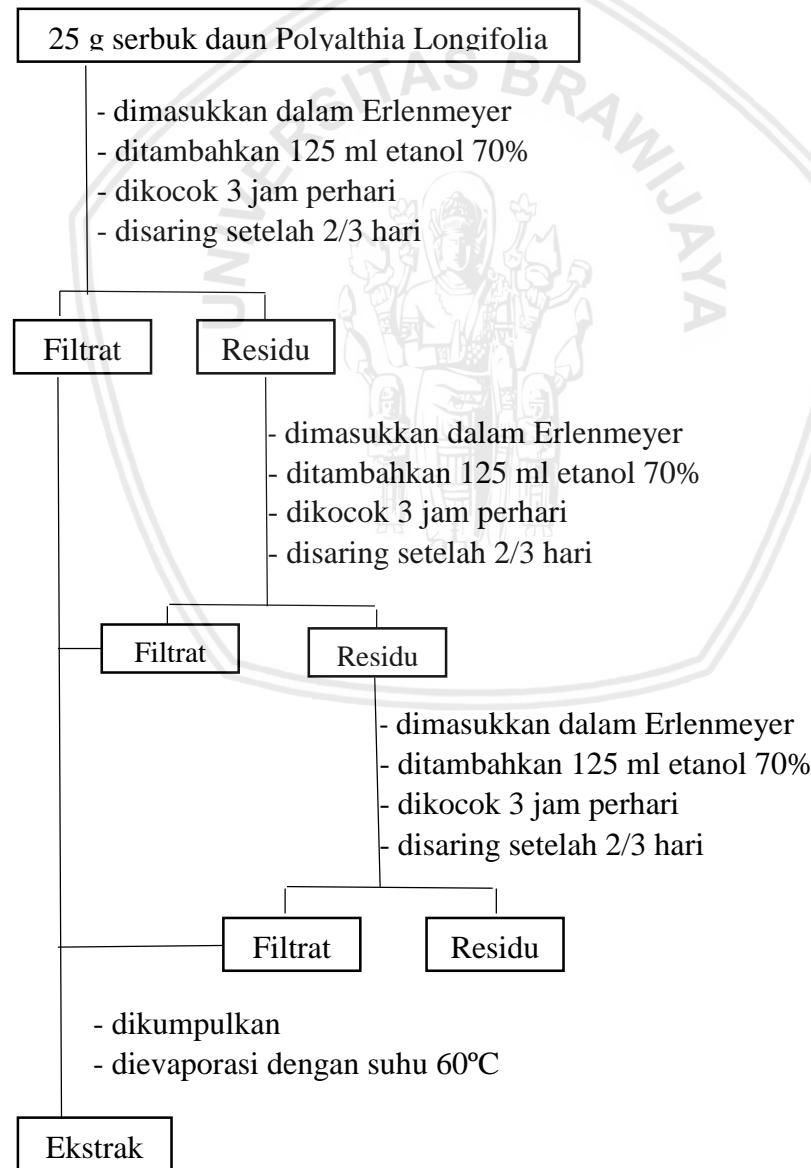


Lampiran 5. Diagram Kerja Penelitian

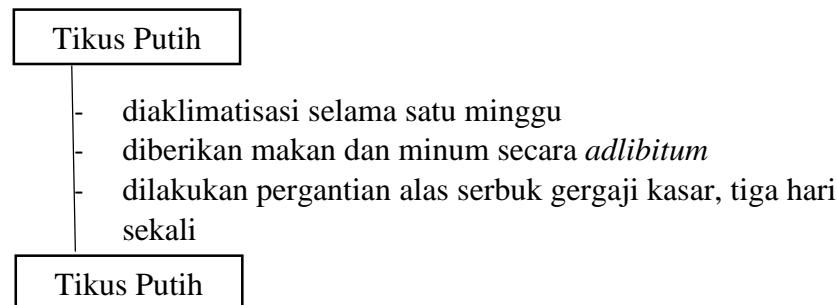
5.1 Pembuatan Simplisia Daun *Polyalthia longifolia*



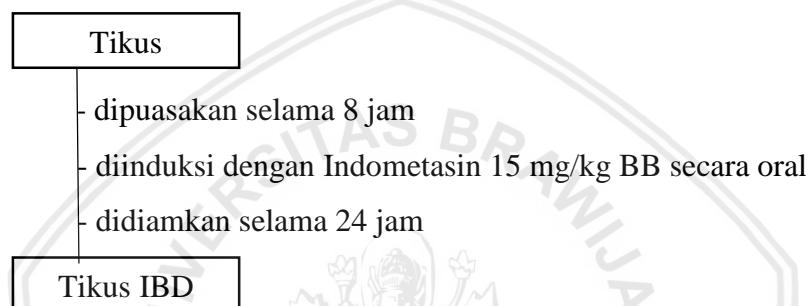
5.2 Ekstraksi Daun *Polyalthia longifolia*



5.3 Persiapan Hewan Coba

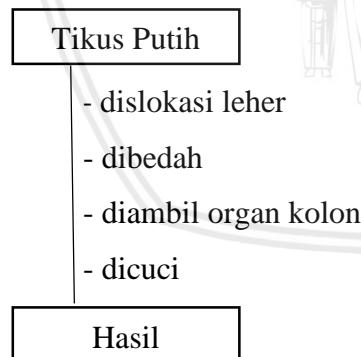


5.4 Pembuatan *Inflammatory Bowel Disease*



5.5 Pembedahan Hewan Coba dan Analisis Histopatologi, dan ERK

5.5.1 Pembedahan



5.5.2 Pembuatan Preparat Kolon

Kolon dalam larutan Formalin Buffer

- Difiksasi pada Formalin Buffer
- Dilakukan dehidrasi dengan etanol bertingkat (70%,80%,90%,95% dan absolut) selama 1 jam
- Dilakukan *cleaning* menggunakan xylol selama 1 jam sebanyak 2 kali
- Dilakukan infiltrasi menggunakan parafin cair
- Dilakukan embedding pada blok parafin dan didinginkan pada suhu 4°C
- Organ lambung dalam block parafin dipotong 5 μm menggunakan *rotary microtome*
- Dicelupkan dalam air hangat suhu 38-40°C
- Diambil menggunakan objek glass dan dikeringkan dengan hot plate

Preparat Kolon

5.5.3 Teknik Imonohistokimia ERK

Preparat Kolon

- Dilakukan deparafinasi preparat (blok parafin) dengan xylol 1 dan 2 masing-masing 3 menit
- Dilakukan rehidrasi preparat dengan menggunakan etanol absolut, 90%, 80%, 70% dan aquades
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 3x5 menit
- Dicuci dengan H₂O₂ (dalam DI water) selama 20 menit pada suhu ruang
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3x
- Bloking unspesifik protein menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3x
- Ditetesi antibodi primer (rat anti ERK) pengenceran 1:100 selama semalam pada suhu 4°C.
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3x
- Diinkubasi dengan antibodi sekunder (goat anti rabbit) berlabel biotin selama satu jam pada suhu ruang
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3x
- Diinkubasi menggunakan SA-HRP (*Strep-Avidin Horse Radish Peroxidase*) selama 40 menit
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3x
- Ditetesi kromagen DAB dan diinkubasi selama 10menit
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3x
- Counterstaining menggunakan Mayer Hematoxilen yang diinkubasi selama 10 menit
- Dicuci dengan menggunakan tap water
- Dibilas dengan dH₂O dan dikeringkan
- Mounting menggunakan entellan

Ekspresi ERK

5.5.4 Pewarnaan HE

Preparat Kolon

- Diwarnai dengan *Hematoxylin-Eosin* selama 10 menit sampai diperoleh hasil terbaik
- Dicuci dengan air mengalir selama 30 menit
- Dibilas dan direndam dengan akuades selama 5 menit
- Diwarnai dengan Eosin selama 5 menit
- Dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit
- Dicuci air dengan akuades selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 70% selama 5 detik
- Dimasukkan dalam etanol 80% selama 5 detik
- Dimasukkan dalam etanol 90% selama 5 detik
- Dimasukkan dalam etanol 95% selama 5 detik
- Dimasukkan ke dalam etanol absolut 3 x 2 menit
- Dikering anginkan
- Dimounting dengan menggunakan entellan dan ditutup dengan *cover glass*

hasil

Lampiran 6. Perhitungan Dosis

6.1 Indometasin

Tikus dengan BB 200 gram

$$\begin{aligned}\text{Dosis Indometasin} &= \text{BB tikus} \times \text{dosis Indometasin} \\ &= 200 \text{ g} \times 15 \text{ mg/kg} \\ &= 0,2 \text{ kg} \times 15 \text{ mg/kg} \\ &= 3 \text{ mg}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Jumlah Indometsin yang dibutuhkan} &= 3 \text{ mg} \times 20 \text{ ekor} \times 1 \text{ hari} \\ &= 60 \text{ mg}\end{aligned}$$

Keterangan:

Angka 20 = jumlah tikus yang diinginkan untuk mengalami *Inflammatory Bowel Disease*, sehingga dibuat larutan Indometasin 60 mg.

$$\begin{aligned}\text{Yang disondekan ke tikus} &= \frac{3 \text{ mg}}{60 \text{ mg}} \times 10 \text{ mL} \text{ (sediaan corn oil dalam sehari)} \\ &= 0,5 \text{ mL}\end{aligned}$$

6.2 Dosis Terapi

- **Ekstrak etanol daun glodokan tiang (*Polyalthia longifolia*) Indonesia**

$$\begin{aligned}\text{Ekstrak yang dibutuhkan setiap hari} &= \text{dosis} \times \text{BB tikus} \times \text{jumlah tikus} \\ &= 300 \text{ mg/kg} \times 200 \text{ g} \times 6 \\ &= 300 \text{ mg/kg} \times 0,2 \text{ kg} \times 6 \\ &= 360 \text{ mg}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Ekstrak yang dibutuhkan selama terapi} &= 360 \text{ mg} \times \text{lama terapi} \\ &= 360 \text{ mg} \times 7 \\ &= 2.520 \text{ mg} \\ &= 2,52 \text{ g}\end{aligned}$$

Disuspensi kan ke CMC Na 0,5%. Yang disondekan ke tikus dalam sehari
2 mL CMC-Na x 6 Tikus = 12 mL

360 mg ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dilarutkan ke dalam 12
mL CMC-Na 0,5%

- **Ekstrak etanol daun glodokan tiang (*Polyalthia longifolia*) Filipina**

Ekstrak yang dibutuhkan setiap hari = dosis x BB tikus x jumlah tikus

$$= 300 \text{ mg/kg} \times 200 \text{ g} \times 6$$

$$= 300 \text{ mg/kg} \times 0,2 \text{ kg} \times 6$$

$$= 360 \text{ mg}$$

Ekstrak yang dibutuhkan selama terapi = 360 mg x lama terapi

$$= 360 \text{ mg} \times 7$$

$$= 2.520 \text{ mg}$$

$$= 2,52 \text{ g}$$

Disuspensi kan ke CMC Na 0,5%. Yang disondekan ke tikus dalam sehari

2 mL CMC-Na x 6 Tikus = 12 mL

360 mg ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dilarutkan ke dalam 12 mL CMC-Na 0,5%

- **Rendemen Ekstrak Etanol *Polyalthia longifolia* Indonesia**

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Simplicia}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen} &= \frac{46,9052 \text{ gram}}{175 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 26,803\% \end{aligned}$$

- **Rendemen Ekstrak Etanol *Polyalthia longifolia* Filipina**

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Simplicia}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen} &= \frac{28,9195 \text{ gram}}{125 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 23,1356\% \end{aligned}$$

6.3 Dosis Sulfasalazin

$$\begin{aligned}\text{Dosis sulfasalazin} &= \text{dosis} \times \text{BB tikus} \times \text{jumlah tikus} \\ &= 20 \text{ mg/kg} \times 200 \text{ g} \times 6 \\ &= 20 \text{ mg/kg} \times 0,2 \text{ kg} \times 6 \\ &= 24 \text{ mg/ ekor}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Jumlah yang dibutuhkan} &= \text{dosis} \times \text{lama terapi} \\ &= 24 \text{ mg} \times 7 \\ &= 168 \text{ mg}\end{aligned}$$

Lampiran 7. Hasil Analisis One Way ANOVA

7.1 Hasil Perhitungan Ekspresi ERK Tiap Kelompok Perlakuan

NORMAL (kelompok 1)						
	tikus 1	tikus 2	tikus 3	tikus 4	tikus 5	tikus 6
	12	10	15	14	16	10
	14	15	16	12	12	13
	11	12	17	15	14	16
	12	13	14	12	15	14
	14	14	16	15	16	15
total	63	64	78	68	73	68
rata-rata	12.6	12.8	15.6	13.6	14.6	13.6

Sulfasalazine (kelompok 2)						
	tikus 1	tikus 2	tikus 3	tikus 4	tikus 5	tikus 6
	13	12	15	12	15	11
	11	12	16	13	16	15
	12	11	14	12	13	14
	16	15	13	13	12	14
	15	14	13	14	12	12
total	67	64	71	64	68	66
rata-rata	13.4	12.8	14.2	12.8	13.6	13.2

Indonesia (kelompok 3)						
	tikus 1	tikus 2	tikus 3	tikus 4	tikus 5	tikus 6
	11	11	12	13	12	12
	12	13	13	11	15	14
	13	13	12	14	11	13
	13	11	15	13	16	14
	12	14	12	15	15	13
total	61	62	64	66	69	66
rata-rata	12.2	12.4	12.8	13.2	13.8	13.2

Filipina (kelompok 4)						
	tikus 1	tikus 2	tikus 3	tikus 4	tikus 5	tikus 6
	13	12	11	14	16	12
	11	13	10	12	11	11
	12	14	12	11	13	14
	10	12	13	14	15	13
	10	13	11	12	12	16
total	56	64	57	63	67	66
rata-rata	11.2	12.8	11.4	12.6	13.4	13.2

7.2 Hasil Perhitungan ANOVA Ekspresi ERK

ERK

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.085	3	2.028	2.935	.058
Within Groups	13.820	20	.691		
Total	19.905	23			

Tests of Normality

	kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ERK	1	.237	6	.200*	.926	6	.548
	2	.175	6	.200*	.923	6	.530
	3	.175	6	.200*	.958	6	.804
	4	.238	6	.200*	.878	6	.262

Test of Homogeneity of Variances

ERK

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.669	3	20	.206

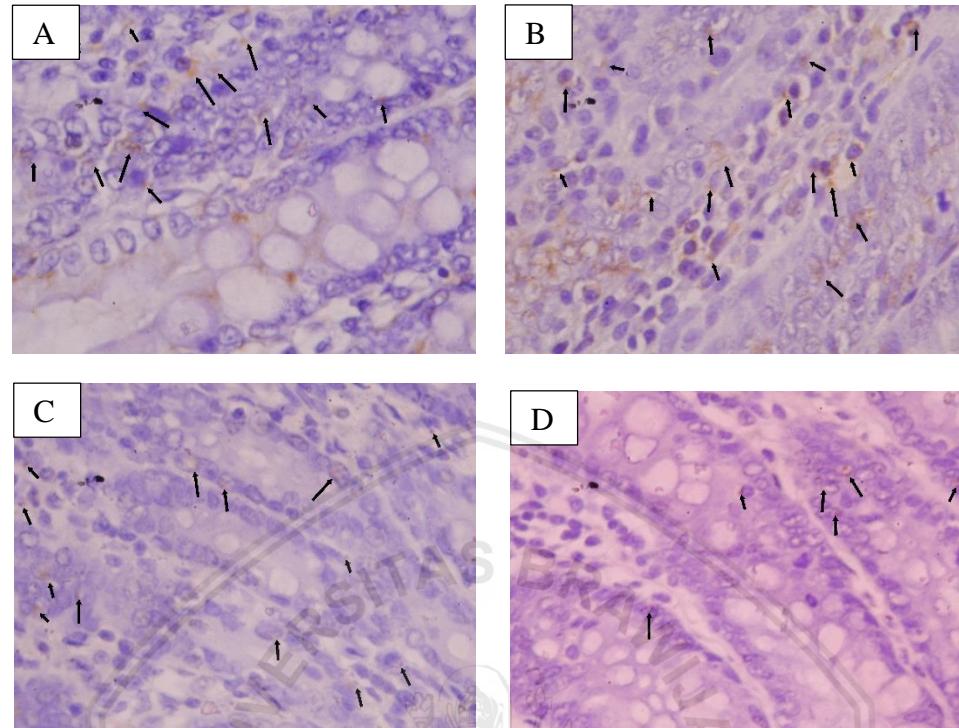
ERK			
Tukey HSD ^a		Subset for alpha = 0.05	
kelompok	N	1	2
4	6	12.4333	
3	6	12.9333	12.9333
2	6	13.3333	13.3333
1	6		13.8000
Sig.		.270	.300

7.3 Hasil Perhitungan *Independent T-Test* Ekspresi ERK

Group Statistics					
	kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
	ERK 2	6	12.9333	.58878	.24037
	3	6	12.4333	.92448	.37742

		Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means								
				F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
											Lower	Upper
ERK	Equal variances assumed	1.964	.191	1.117		10	.290	.50000	.44746			
	Equal variances not assumed			1.117	8.483	.294		.50000	.44746	.49701	1.49701	
											.52171	
											1.52171	

7.4 Gambar Ekspresi ERK



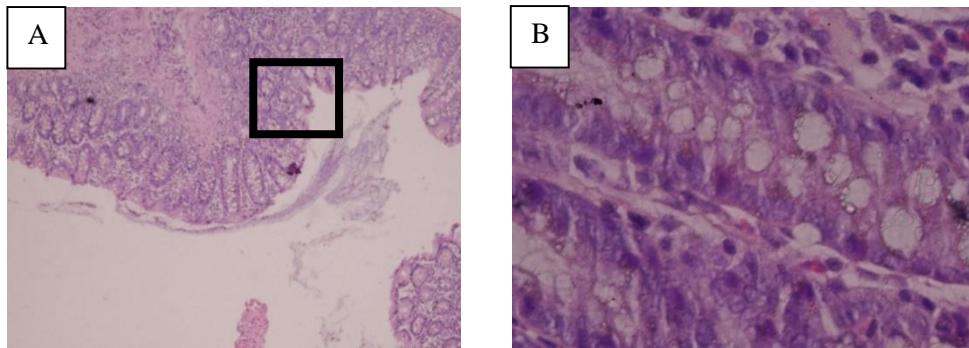
Gambar 5.1 Ekspresi ERK pada kolon tikus (*Rattus novergicus*) Inflammatory Bowel Disease (IBD) dengan perbesaran 1000x

Keterangan

: (A) Tikus Kontrol Negatif, (B) Tikus dengan terapi Sulfasalazine, (C) Tikus dengan terapi Ekstrak Etanol *Polyalthia longifolia* dari Indonesia, (D) Tikus dengan terapi Ekstrak Etanol *Polyalthia longifolia* dari Filipina. Tanda panah hitam (→) menunjukkan ekspresi ERK.

Lampiran 8. Gambaran Histopatologi Organ Kolon

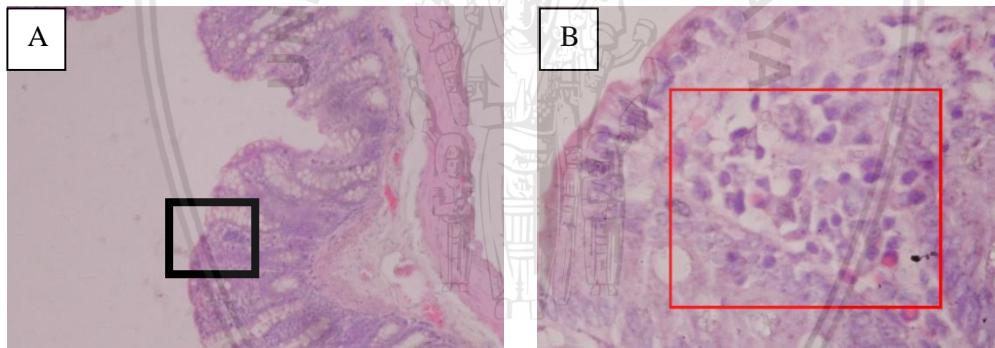
8.1 Kelompok Kontrol Negatif



Gambar 5.3 Gambar Histologi kolon tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok kontrol negatif *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dengan pewarnaan HE

Keterangan : (A) Gambar Histologi kolon tikus negatif IBD perbesaran 1000x, (B) Gambar histopatologi kolon tikus negatif IBD perbesaran 100x

8.2 Kelompok Kontrol Positif

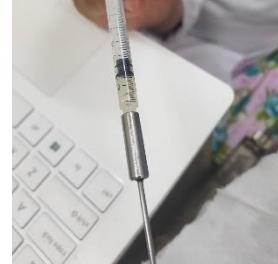


Gambar 5.4 Gambar histopatologi kolon tikus (*Rattus norvegicus*) kontrol positif *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dengan pewarnaan HE

Keterangan : (A) Gambar histopatologi kolon tikus positif IBD perbesaran 1000x terlihat adanya akumulasi sel radang, (B) Gambar histopatologi kolon tikus positif IBD 100x terlihat adanya kerusakan pada vili

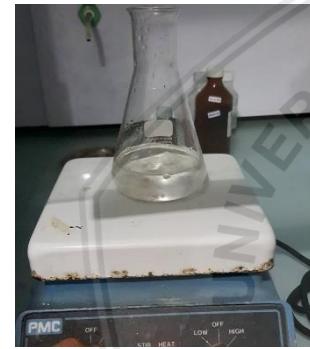
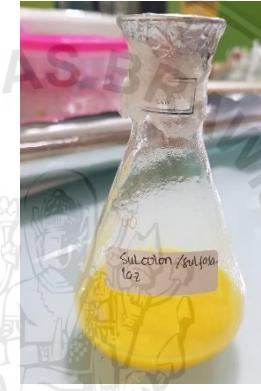
= menunjukkan adanya sel radang

Lampiran 9. Dokumentasi

Kandang tikus penelitian 	Induksi Indometasin 	Sonde terapi pada tikus 
Pengambilan organ kolon 	Pembedahan pada tikus 	

Proses pembuatan larutan

Daun <i>P. longifolia</i> dari Filipina 	Daun <i>P. longifolia</i> dari Indonesia 	serbuk sulfasalazine 
--	--	---

<p>Penimbangan serbuk Sulfasalazine</p> 	<p>penimbangan serbuk CMC-Na</p> 	<p>Pembuatan CMC-Na</p> 
<p>Pembuatan Larutan CMC-Na</p> 	<p>larutan Sulfasalazine</p> 	<p>Ekstrak <i>P. longifolia</i> Indonesia</p> 
<p>Ekstrak <i>P. longifolia</i> Filipina</p> 	<p>Penimbangan Ekstrak terapi</p> 	<p>Pembuatan larutan Etanol terapi <i>P. longifolia</i> Indonesia dan Filipina</p> 

Pembuatan IHK

Proses Deparafinisasi 	Preparat ditetesi peroksidase 	Preparat ditetesi Serum Blocking 
penyimpanan suhu 4°C 	Pemberian Antibodi Primer & Sekunder 	Pemberian pewarna DAB 
Pemberian pewarna mayer hematoxylen 	Dicuci dengan akuades dan dikeringkan 	