

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Maja (*Aegle marmelos*) Terhadap
Ulkus Lambung yang Diinduksi Indometasin pada Tikus (*Rattus
norvegicus*) Strain Wistar yang Diamati secara Histopatologis**

TUGAS AKHIR



OLEH :

REZA RACHMANTOKO

NIM : 165070100111010

PROGRAM STUDI S1 PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

2019





	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
Bab 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Tujuan Umum.....	5
1.3.2 Tujuan Khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
Bab 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Lambung.....	7

2.1.1 Fisiologi dan Sekresi Lambung	7
2.1.2 Inflamasi Lambung (Gastritis)	11
2.2 Ulkus Peptikum	12
2.2.1 Definisi dan Etiologi	12
2.2.2 Patofisiologi	13
2.2.3 Tanda dan Gejala	14
2.3 Non Steroid Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs)	15
2.3.1 Inflamasi	15
2.3.2 Definisi dan Pembagian NSAIDs	16
2.3.3 Farmakodinamik	17
2.3.4 Efek Samping	18
2.4 Ekstrak buah Maja (<i>Aegle marmelos</i>)	19
2.4.1 Definisi Ekstrak Buah Maja (<i>Aegle marmelos</i>)	19
2.4.2 Komponen Penyusun Ekstrak Buah Maja (<i>Aegle marmelos</i>)	20
2.4.3 Manfaat Ekstrak Buah Maja (<i>Aegle marmelos</i>)	21
2.4.4 Ekstrak Buah Maja (<i>Aegle marmelos</i>) sebagai anti-inflamasi	22

Bab 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep	23
3.2 Hipotesis Penelitian	25





4.6 Definisi Operasional	31
4.7 Prosedur Penelitian	33
4.7.1 Pembuatan Model Hewan Gastritis.....	33
4.7.2 Pemberian Ekstrak Buah Maja (<i>Aegle marmelos</i>) dan Pembedahan.....	33
4.7.3 Pembuatan Preparat Histopatologi	34
4.7.4 Identifikasi Lesi secara Histopatologi	35
4.7.5 Persiapan Hewan Coba	35
4.8 Alur Penelitian dan Pengumpulan Data	37
4.8.1 Alur Penelitian.....	39
4.8.2 Teknik Pengumpulan Data.....	40
4.9 Analisis Data	40
4.10 Jadwal Kegiatan.....	41
4.11 Etika Penelitian	42

Bab 5. HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Pemeriksaan Histopatologis Lambung Tikus	45
5.2 Analisis Data	47
5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas Varians.....	47
5.2.2 Uji One-Way ANOVA.....	48
5.2.3 Uji Beda Post Hoc Tuckey.....	49
5.2.4 Uji Korelasi Pearson.....	50
5.2.5 Uji Regresi Linier.....	51

Bab 6. PEMBAHASAN.....	52
Bab 7. PENUTUP.....	57
7.1 Kesimpulan.....	57
7.2 Saran.....	57
DAFTAR PUSTAKA.....	58
LAMPIRAN.....	63



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Maja (*Aegle marmelos*) Terhadap Ulkus Lambung yang Diinduksi Indometasin pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar yang Diamati secara Histopatologis

Oleh :

Reza Rachmantoko

NIM 165070100111010

Telah diuji pada

Hari : Jumat

Tanggal : 13 Desember 2019

dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji-I

dr.Kenty Wantri Anita, M.Kes, Sp.PA
NIP. 197207151999032002

Pembimbing-II/Penguji-II,

Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes
NIP. 195505121967012001

Pembimbing II/Penguji-III,

dr. Cholid Tri Tiahiono, M.Kes, Sp.JP(K)
NIP. 196207241989031002

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kedokteran,

dr. Trwahyu Astuti, M.Kes, Sp.P(K)
NIP. 196310221996012001



ABSTRAK

Rachmantoko, Reza. 2019. Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Maja (*Aegle marmelos*) Terhadap Ulkus Lambung yang Diinduksi Indometasin pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar yang Diamati secara Histopatologis. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Pembimbing : (1) Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes. (2) dr. Cholid Tri Tjahjono, M.Kes, Sp.JP

Ulkus lambung adalah rusaknya lapisan mukosa dari lambung yang disebabkan oleh sekresi asam lambung yang berlebihan. Ekstrak buah Maja (*Aegle marmelos*) memiliki kandungan anti oksidan dan antiinflamasi dari flavonoid dan saponin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek dan dosis optimal dari ekstrak buah *Aegle marmelos* dalam mereduksi kerusakan epitel mukosa lambung tikus *Rattus norvegicus* strain wistar yang diinduksi indometasin. Desain penelitian bersifat eksperimental dengan *post-test only control group*. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok sampel yang terdiri dari kontrol negatif, kontrol positif (ulkus dengan induksi indometasin), kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 (ulkus dengan induksi indometasin yang diberi ekstrak buah *Aegle marmelos* dengan dosis masing masing 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB). Setelah dibedah lambung tikus disiapkan untuk pulasan Hematoxylin-Eosin. Kerusakan epitel mukosa lambung diamati secara histopatologis dan dinilai skornya menggunakan skoring integritas epitel Barthel Manja. Analisa statistik didapatkan hasil lesi ulkus berbeda yang menunjukkan pengaruh antara diberikan ekstrak atau tidak pada kelompok perlakuan (ANOVA, $p < 0.05$). Didapatkan pemberian ekstrak buah *Aegle marmelos* dengan dosis 50 mg/kgBB tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kontrol positif, sedangkan pemberian ekstrak buah *Aegle marmelos* dengan dosis 100 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB menunjukkan hasil yang signifikan dibandingkan kontrol positif. Pemberian dosis ekstrak buah *Aegle marmelos* sebesar 200 mg/kgBB menunjukkan hasil yang mendekati kontrol negatif sehingga dapat dikatakan dosis 200mg/kgBB merupakan dosis yang optimal. Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian ekstrak buah *Aegle marmelos* dengan dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB dapat mereduksi kerusakan epitel mukosa lambung pada tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar yang diinduksi indometasin.

Kata kunci : buah *Aegle marmelos*, ulkus lambung, tikus

ABSTRACT

Rachmantoko, Reza. 2019. The effect of Maja (*Aegle marmelos*) Fruit Extracts on Indometacin-induced Gastric Ulcer in Rats (*Rattus norvegicus*) Wistar Strains Histopathologically Observed. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Pembimbing : (1) Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes. (2) dr. Cholid Tri Tjahjono, M.Kes, Sp.JP

Gastric ulcer is damage to the mucosal lining of the stomach caused by excessive secretion of gastric acid. Maja fruit extract (*Aegle marmelos*) have anti-oxidant and anti-inflammatory properties from flavonoids and sopheride. This study aims to determine the effect and optimal dose of *Aegle marmelos* fruit extract in reducing damage to gastric mucosal epithelium of *rattus norvegicus* wistar strains induced by indometacin. The study design is experimental with a post-test only control group. This study used 5 sample groups consisting of negative controls, positive controls (ulcers with indometacin induction), treatment groups 1, 2, and 3 (ulcers with indometacin induction given with *Aegle marmelos* fruit extract at 50 mg / kgBB, 100 mg each / kgBB, 200 mg / kgBB). After dissecting the stomach, the rat was prepared to stained with Hematoxylin-Eosin. Damage to the gastric mucosal epithelium was observed histopathologically and the scores were assessed using the *Barthel Manja* epithelial integrity score. Statistical analysis showed different ulcer lesion results that showed the effect of whether or not an extract was given to the treatment group (ANOVA, $p < 0.05$). From the experiment, *Aegle marmelos* fruit extract at a dose of 50 mg / kgBW did not show a significant difference compared to positive control, whereas administration of *Aegle marmelos* fruit extract at a dose of 100 mg / kgBW and 200 mg / kgBW showed significant results compared to positive control. The administration of *Aegle marmelos* fruit extract dose of 200 mg / kg body weight showed results close to negative control so it can be said that the 200 mg / kg body weight dose is the optimal dose. The conclusion of this study is the administration of *Aegle marmelos* fruit extract at a dose of 50 mg / kgBW, 100 mg / kgBW, and 200 mg / kgBW can reduce damage to the gastric mucosal epithelium in *Rattus norvegicus* strains induced by indometacin.

Keywords : *Aegle marmelos* fruit, gastric ulcer, rats

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sistem pencernaan merupakan suatu sistem dalam tubuh yang berfungsi untuk memecah dan menyerap nutrisi, menjaga homeostasis kadar glukosa tubuh, serta membersihkan organisme sel tubuh. Akan tetapi sistem pencernaan ini rawan sekali terganggu kerjanya akibat banyaknya macam penyakit serta benda asing yang bertempat di sistem ini. (Soffers *et al.*, 2016). Salah satu organ yang berperan penting dalam sistem pencernaan ialah lambung yang berfungsi dalam proses pencernaan dan penyerapan, pada lambung terdapat sistem proteksi yang terdiri atas dinding lambung. Dinding lambung terdiri atas lapisan mukosa, sub mukosa, lapisan otot, dan serosa yang mengelilingi seluruh bagian lambung dan bertugas untuk melindungi lambung dari benda asing baik yang bersifat mekanik maupun kimiawi. Namun, dinding pelindung ini tidak sepenuhnya kebal atau dalam kata lain dapat terjadi luka pada bagian dinding lambung menyebabkan inflamasi baik mulai dari lapisan mukosa hingga ke lapisan otot, hal ini dapat disebut juga *ulkus peptikum*. Gejala yang bisa muncul ialah rasa tidak nyaman pada perut, mual, muntah, dan penurunan nafsu makan (Bhagal, 2008).

Secara global penyakit *ulkus peptikum* sendiri banyak terjadi pada kelompok usia diatas 45 tahun. Prevalensi ulkus peptikum di Indonesia pada beberapa penelitian berada di kisaran 6-15% terutama pada usia 20-50



tahun (Tarigan,2001). Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (BPPK) Depkes (2008) menyatakan bahwa pada tahun 2005-2008, ulkus peptikum di Indonesia menempati urutan ke-10 dalam kategori penyebab kematian pada kelompok umur 45-54 tahun pada laki-laki (2,7%). Pada prinsipnya sendiri ulkus timbul akibat ketidakseimbangan antara faktor pertahanan mukosa gastroduodenum (faktor defensif) dan faktor perusak (faktor agresif). Faktor defensif antara lain lapisan mukosa, sekresi bikarbonat, aliran darah adekuat, dan prostaglandin. Faktor perusak (agresif) mukosa gastroduodenum meliputi, pertama adalah faktor perusak endogen antara lain HCl, pepsin dan garam empedu, dan kedua adalah faktor perusak eksogen, misalnya obat-obatan, alkohol dan bakteri (Tarigan, 2009).

Nonsteroid antiinflammatory drugs (NSAID) adalah salah satu golongan obat yang paling umum digunakan di dunia. NSAID sendiri bekerja sebagai antipiretik (pereda demam) dan juga analgesik (pereda nyeri), hal inilah yang menyebabkan obat golongan NSAID umum sekali digunakan pada masyarakat. NSAID bekerja khusus untuk menghambat kerja dari enzim COX-1 dan juga COX-2. Pada sel, enzim COX-1 dan COX-2 berperan pada sintesis kunci mediator pro-inflamasi, antara lain prostaglandin yang berperan pada proses inflamasi dan tromboxane yang berperan pada proses pembekuan darah. (Singh, 1999) Efek samping yang paling sering terjadi dari penggunaan NSAID ialah gangguan pada sistem gastrointestinal. Efek samping iritasi lambung akibat penggunaan NSAID bisa secara langsung

maupun tidak langsung. NSAID menimbulkan dua gangguan terhadap saluran gastrointestinal : molekul asam yang mengiritasi lambung secara langsung, dan inhibisi COX-1 dan COX-2 mereduksi level proteksi dari prostaglandin. Inhibisi sintesis prostaglandin pada saluran gastrointestinal menyebabkan peningkatan sekresi dari asam lambung, mengurangi sekresi bikarbonat, mengurangi sekresi mukosa, dan mengurangi efek tropik pada mukosa epitelial. Ulkus klinis NSAID berkaitan dengan penggunaan sistemik dari NSAID baik dari rute oral, rectal, maupun parenteral. Risiko ulserasi meningkat sesuai dengan durasi terapi dan besar dosis yang digunakan. Lebih dari 50% pasien yang menggunakan NSAID mengalami kerusakan mukosal pada saluran gastrointestinal. (Rafaniello, 2016).

Langkah prevensi efek samping gastorintestinal NSAID yang sampai saat ini dilakukan ada beberapa NSAID, seperti aspirin, telah dipasarkan dengan formulasi *enteric-coated* yang pembuatnya mengklaim dapat mereduksi insiden dari efek samping gastrointestinal. Bagaimanapun masih belum terbukti global secara klinis efek dari aspirin. (Rossi, 2006). Beberapa obat *gastro-protective* dikembangkan dengan tujuan untuk mencegah efek toksisitas gastrointestinal pada orang-orang yang menggunakan NSAID sehari-hari. Efek ulserasi dapat direduksi dengan penggunaan obat yang menekan produksi asam seperti proton pump inhibitor (omeprazole dan esomeprazole) atau dengan obat-obatan yang meniru prostaglandin dengan tujuan mengembalikan dinding traktus gastrointestinal (prostaglandin analog misoprostol). (Leontiadis *et al.*, 2002) Namun untuk alternatif pereduksi ulkus

lambung akibat penggunaan NSAID selain obat yaitu bahan alam yang dapat ditemukan sehari-hari pada masyarakat yang menjadi tren beberapa tahun ini belum ada bukti valid yang kuat terhadap penggunaannya.

Penggunaan ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*) cukup menarik karena pada dasarnya buah maja (*Aegle marmelos*) sangat tersebar luas di Indonesia, bahkan di Pulau Jawa. Ekstrak maja (*Aegle marmelos*) dapat dijadikan opsi alternatif untuk mengurangi ulkus akibat efek samping dari penggunaan NSAID. Dari suatu jurnal sendiri sudah dibuktikan bahwa ekstrak buah dari maja (*Aegle marmelos*) memiliki efek anti inflamasi, analgesik, dan antipiretik. Ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*) memiliki efek signifikan terhadap inhibisi edema *terinduksi-carrageenan* dan *cotton-pellet granuloma* pada tikus. (Arul et al. , 2006). Tanaman *Aegle marmelos* sendiri terbukti memiliki kandungan fenol, sopheride dan flavonoid. Molekul molekul tersebut dapat berperan pada kelancaran sirkulasi darah, mencegah penyumbatan pembuluh darah, antioksidan, antiinflamasi dan melindungi mukosa lambung. (Rasadah, 2010). Dari uraian diatas peneliti ingin membuktikan kebenaran dari ekstrak buah maja yang memiliki efek antiinflamasi dan antioksidan dapat mengurangi kerusakan mukosa lambung akibat dari penggunaan NSAID pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi indometasin diamati secara histopatologis.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah pemberian ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*) dapat mengurangi kerusakan lesi mukosa lambung tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang diinduksi Indometasin diamati secara histopatologis?

1.3. Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa pemberian ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*) dapat mengurangi kerusakan lesi mukosa lambung tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang diinduksi Indometasin diamati secara histopatologis.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui ada atau tidaknya pengurangan kerusakan lesi mukosa lambung oleh pemberian ekstrak buah Maja (*Aegle marmelos*) pada lambung tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang diinduksi dengan indometasin.
2. Menentukan dosis optimal ekstrak buah Maja (*Aegle marmelos*) strain wistar dalam mengurangi kerusakan lesi mukosa lambung tikus *Rattus norvegicus* yang diinduksi oleh indometasin.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Dengan dibuktikannya ekstrak buah Maja (*Aegle marmelos*) dalam mengurangi kerusakan lesi mukosa lambung yang diamati secara histopatologis pada tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang diinduksi

dengan indometasin diharapkan dapat menambah informasi ilmiah tentang tanaman obat di bidang kedokteran.

1.4.2 Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini dapat dijadikan dasar penggunaan buah Maja (*Aegle marmelos*) sebagai alternatif pengobatan pada penyakit lesi di mukosa lambung yang aman, murah, dan terjangkau untuk manusia.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lambung

2.1.1 Fisiologi dan Sekresi Lambung

Fungsi utama yang terdapat pada lambung ada 3 yaitu fungsi absorpsi, pencernaan serta sekresi lambung. Pada fungsi absorpsi lebih banyak berperan pada duodenum, namun beberapa molekul molekul diabsorpsi di lambung seperti air, obat (contoh : aspirin), asam amino, 10-20% ethanol yang dicerna, caffeine, dan beberapa vitamin (contoh: Vitamin B12). Sel parietal yang pada lambung berperan dalam memproduksi faktor intrinsik, yang berperan dalam absorpsi Vitamin B12. Fungsi pencernaan lambung berperan dalam mencerna bolus yang diterima dari oesophagus. Enzim enzim yang berperan dalam pencernaan ialah protease (enzim pencerna protein : pepsin), dan asam klorida, yang berperan dalam membunuh ataupun mencegah bakteri dan mengontrol pH asam agar protease dapat bekerja (Richard, 2007). Fungsi utama berperan dalam proteksi lambung ialah fungsi sekresi *gastric juice* dari lambung yang diperankan oleh gastrin, cholecystokinin, secretin, *gastric inhibitory peptide*, enteroglukagon. *Gastric juice* utamanya mengandung asam klorida dan pepsin. Walaupun, kedua molekul tersebut dapat merusak dinding lambung, lambung akan mengkompensasi dengan sekresi mukus, memberikan lapisan berlendir yang berfungsi dalam memberikan perlindungan terhadap efek perusakan oleh asam klorida dan



pepsin. Sel yang berperan penting dalam memproteksi ialah sel parietal yang dapat mengatur sekresi dari asam klorida pada lambung. Sebagai hasil dari ekspor selular dari ion hidrogen, dinding lambung dapat terjaga lingkungan asamnya. Keasaman lambung membantu dalam pencernaan makanan dalam denaturasi protein yang dicerna. Ketika protein telah denaturasi, ikatan peptida yang menghubungkan komponen asam amino akan terekspos. Bersamaan dengan itu asam klorida lambung akan memecah pepsinogen, sebuah zymogen, menjadi pepsin aktif, sebuah endopeptidase yang meneruskan proses pencernaan dalam memecah ikatan peptida yang telah terekspos, proses yang dikenal sebagai proteolysis. (Boulpaep, 2009)

Lambung melindungi dari kerusakan akibat sistem pencernaan melalui beberapa komponen. Komponen-komponen perlindungan terdapat empat komponen utama, dalam memberikan resistensi tambahan pada dinding mukosa lambung. Komponen yang pertama ialah lapisan sel epitel yang padat, sel pada epitelium lambung terikat dengan ikatan *tight junction* yang melindungi dari cairan kasar yang dapat melukai lapisan lambung. Komponen kedua ialah perlindungan dari mukus spesial, yang didapat dari sekresi mukus oleh sel epitelial permukaan dan sel foveolar. Mukus yang tidak dapat terlarut membentuk lapisan protektif berbentuk gel yang melapisi seluruh permukaan mukosa lambung. Mukus memproteksi mukosa lambung dari autodigesti dari pepsin dan erosi akibat asam.

Komponen ketiga ialah ion bikarbonat, disekresi oleh sel epitel permukaan.

Ion bikarbonat bertindak dalam menetralkan asam yang dapat merusak

lapisan lambung. Komponen terakhir ialah pembentukan prostaglandin,

produksi prostaglandin mempengaruhi regulasi dari komponen-komponen

perlindungan seperti produksi mukus dan ion bikarbonat yang

menghambat sekresi asam dari sel parietal. Selain itu, prostaglandin E dan

I bersifat vasodilator dan meningkatkan aliran darah mukosa. Beberapa

obat-obat yang bekerja dengan menghambat produksi prostaglandin,

seperti NSAIDs dan obat-obat serupa dapat menurunkan perlindungan

lambung dan menyebabkan luka pada mukosa lambung sampai ulserasi.

Apabila komponen-komponen perlindungan rusak seperti pada asam

asetilsalisilat (aspirin) pada solusi asam, akan menyebabkan asam

berdifusi kembali ke dalam mukosa sehingga dapat menyebabkan luka

pada lambung itu sendiri. (Orskov, 2009; Dorland, 2012). Sistem saraf

dan sistem endokrin berkolaborasi dalam meningkatkan sekresi lambung

dan motilitas ketika makanan dicerna sampai pengosongan lambung.

Aktivitas lambung terkait mencerna dibagi menjadi tiga tahap yang disebut

fase cephalic, fase gastric, dan fase intestinal.

Fase cephalic adalah fase dimana lambung merespon akan

rangsangan baik dari penglihatan, bau, rasa maupun pikiran akan

makanan. Sekitar 30% dari sekresi total asam terjadi sebelum makanan

masuk ke dalam lambung. Rangsangan sensorik akan menuju ke

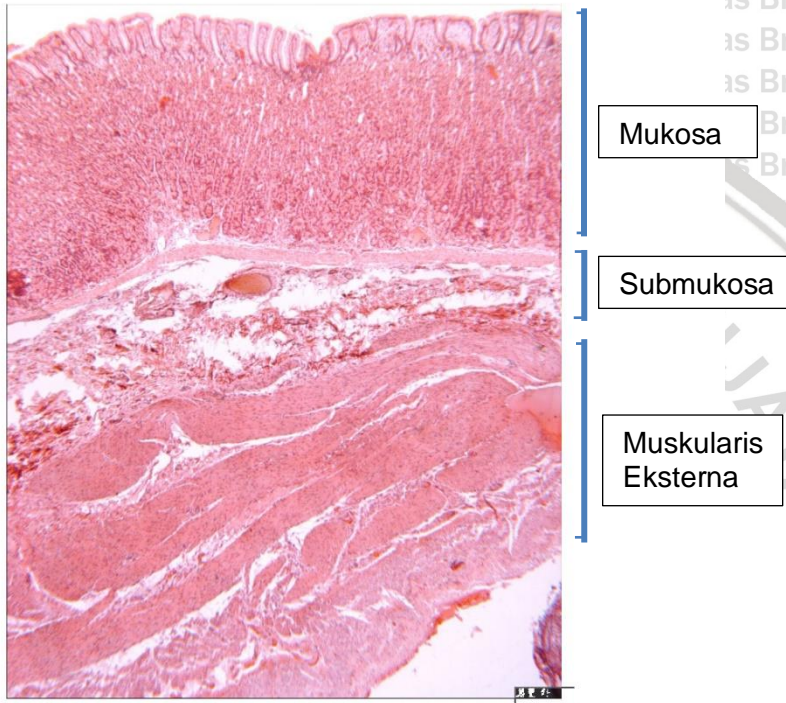


hipotalamus, dan tersalur ke medulla oblongata. Jaringan saraf vagus dari medulla akan menstimulus sistem saraf parasimpatik lambung yang akan menstimulus sekresi lambung lewat sel parietal dan sel G. Fase gastric adalah fase dimana 50-60% dari sekresi total asam lambung disekresi. Fase gastric ialah periode dimana makanan telah ditelan dan protein semidigested (peptida dan asam amino) mengaktifasi aktivitas lambung. Makanan yang dicerna menstimulasi aktivitas lambung dengan dua cara yaitu dengan meregangkan lambung dan dengan isi lambung menstimulus reseptor pada lambung. Peregangan mengaktifasi dua reflek : reflek pendek yang dimediasi lewat plexus saraf mienterikus, dan reflek panjang oleh nervus vagus dan batang otak. Fase intestinal adalah fase dimana 5-10% sekresi lambung terjadi. Fase intestinal adalah fase dimana duodenum merespon chyme dan merubah aktivitas lambung lewat hormon dan reflek saraf. Duodenum awalnya meningkatkan sekresi lambung namun nantinya akan menghambat sekresi lambung. (Saladin, 2007).

Gambaran normal yang dapat diamati dari pulasan HE pada lambung secara histopatologi ada tiga lapisan yaitu lapisan mukosa, submukosa dan muskularis eksterna. Mukosa penuh akan *gastric glands* dan *gastric pits*, dan terdapat lapisan yang menonjol dari oto polos yaitu muskularis mukosa. Kontraksi dari otot ini mampu membantu mengeluarkan isi dari *gastric glands*. Lapisan muskularis eksterna terdiri dari 3 lapis otot, lapisan dalam oblique, lapisan tengah sirkular, lapisan luar longitudinal. Kontraksi

ketiga otot ini berfungsi untuk memecah makanan secara mekanik.

(Paxton, 2019)



Gambar 2.1 Gambar Histopatologis Lambung Normal yang Diamati Pada Perbesaran 250x dengan Pulasan HE (Paxton, 2019)

2.1.2 Inflamasi Lambung (Gastritis)

Gastritis ialah suatu kondisi inflamasi yang terjadi pada lapisan dari lambung. Lapisan lambung yang memiliki berbagai komponen perlindungan, akan terganggu fungsi proteksinya dalam sistem pencernaan pada lambung. Sehingga asam klorida, ion bikarbonat, maupun mukus yang dikeluarkan untuk proteksi akan lebih sedikit diproduksi. Kondisi inflamasi bisa terjadi secara akut apabila cepat dan



muncul tiba tiba dan apabila berlangsung dalam jangka waktu yang lama merupakan kondisi kronis. Bisa terjadi kondisi tanpa gejala tetapi bila muncul gejala, yang paling sering muncul adalah nyeri pada abdomen bagian atas. Gejala lain yang bisa muncul meliputi muntah dan mual, hilangnya nafsu makan. Komplikasi yang dapat muncul apabila tidak cepat ditangani ialah pendarahan, *ulcus pepticum*, dan tumor lambung. Ketika terjadi pada kondisi autoimun, dapat terjadi anemia karena kurangnya vitamin B12 atau disebut anemia pernisiiosa. (NIDDK, 2013).

2.2 Ulkus Peptikum

2.2.1. Definisi dan Etiologi

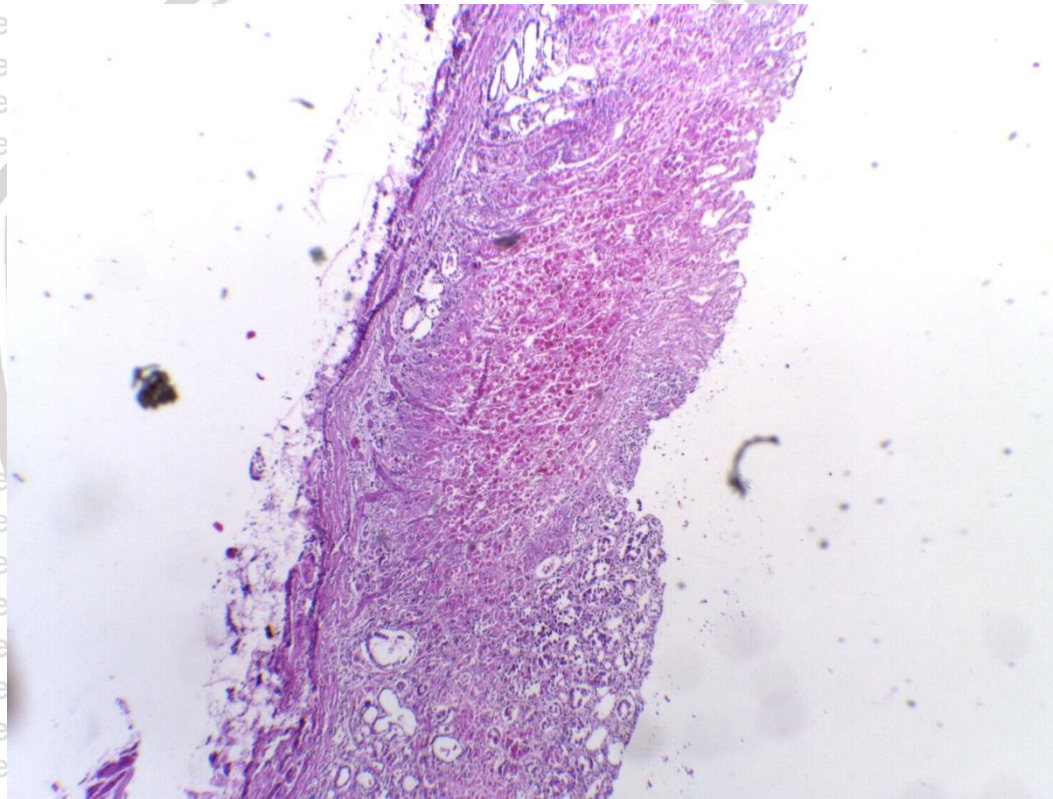
Ulkus peptikum (UP) ialah robeknya lapisan mukosa dari lambung, bagian pertama duodenum, atau jarang jarang oesophagus bawah. Ulserasi pada lambung dikenal dengan nama *gastric ulcer* sedangkan bila pada bagian pertama dari duodenum adalah *duodenal ulcer*. Gejala tersering dari ulserasi ialah bangun pada malam hari dengan nyeri pada abdomen bagian atas yang meningkat saat makan. (Najm, 2011).

Penyebab tersering meliputi bakteri *Helicobacter pylori* dan NSAID.

Penyebab tersering yang lain ada merokok, stres akibat penyakit serius, *Behcet disease*, *Zollinger-Ellison syndrome*, *Crohn disease*, dan sirosis

hati. Orang yang lebih tua lebih sensitif mengalami efek ulserasi akibat penggunaan NSAID. *H. Pylori* dapat didiagnosa dengan melakukan tes pada darah dengan antibodi, tes napas urea, tes feses adakah tanda

bakteri, atau biopsi pada lambung. (Steinberg, 2002). Gambaran mikroskopis ulkus peptikum lambung adalah perforasi mukosa yang menembus muskularis mukosa dan lamina propria, biasanya diakibatkan oleh agresi asam-pepsin. Selama fase aktif, dasar dari ulkus menunjukkan 4 zona: nekrosis fibrinoid, eksudat inflamasi, jaringan granulasi dan jaringan fibrosa. (Pathologyatlas.ro, 2019).



Gambar 2.2 Gambaran Histopatologis pada Ulkus Lambung Akut dengan Erosi Mukosa pada Pulasan HE (Calicut Medical College, 2014)

2.2.2 Patofisiologi

Patogenesis utama dari Ulkus Peptikum seringnya adalah akibat sekresi asam yang berlebihan, gangguan komponen komponen

perlindungan mukosa lambung, atau difusi balik dari asam masuk ke dalam mukosa. (Baldissera, 2009). *H. pylori* merupakan satu dari berbagai faktor penyebab mayor dari Ulkus Peptikum. *H. pylori* mensekresi urease untuk membuat lingkungan alkalin yang cocok untuk bertahan hidup lalu mengekspresikan faktor faktor virulensi seperti CagA dan PicB yang menyebabkan inflamasi pada mucosa lambung. *H. pylori* juga mensekresi berbagai produk yang menghambat hidrogen potassium ATPase, mengaktifasi peptide calcitonin terkait gen neuron sensorik yang meningkatkan sekresi somatostatin untuk menghambat produksi oleh sel parietal, dan sekresi gastrin. Pengurangan produksi asam menyebabkan Ulkus Peptikum. Selain bakteri *H. pylori* penyebab tersering lain ialah penggunaan NSAID dan aspirin yang dapat meningkatkan risiko terkena Ulkus Peptikum sampai 4 kali lipat dibanding yang tidak menggunakannya. Risiko perdarahan meningkat bila penggunaan NSAID dikombinasi dengan SSRI, kortikosteroid, antimineralkortikoid, dan antikoagulan. Mukosa lambung melindungi dirinya dari asam lambung dengan lapisan mukus, yang sekresinya diregulasi oleh prostaglandin. NSAID memblok fungsi cyclooxygenase 1 (COX-1), yang berperan dalam produksi prostaglandin.

Selain itu, NSAID juga menghambat proliferasi sel mukosa lambung dan aliran darah mukosa, mereduksi ion bikarbonat dan sekresi mukus. (Lanas, 2017)

2.2.3 Tanda dan Gejala

Gejala yang bisa muncul pada Ulkus Peptikum bisa terjadi satu atau lebih dari gejala-gejala seperti nyeri abdomen, seringkali pada regio epigastrik dan pada waktu makan. Pada duodenal ulcer nyeri muncul setelah 3 jam setelah makan, kembung dan abdomen terasa penuh, perasaan mual dan rasa ingin muntah, hilangnya nafsu makan, penurunan berat badan, hematemesis (muntah darah), dapat terjadi bila terjadi perdarahan langsung dari gastric ulcer atau luka pada esophagus, melena (feses bau tidak enak karena adanya oksidasi besi dari hemoglobin.). Riwayat *heartburn*, *gastroesophageal reflux disease* (GERD), dan penggunaan obat NSAID atau aspirin dapat meningkatkan risiko terjadinya Ulkus Peptikum. Pada orang berumur 45 tahun atau lebih dari dua minggu dengan gejala-gejala di atas, perlu dilakukan investigasi cepat esophagogastroduodenoskopi. Timing dari munculnya nyeri abdomen ketika makan dapat membedakan antara gastric ulcer dengan duodenal ulcer: Gastric ulcer akan muncul nyeri ketika makan, diikuti mual dan muntah, akibat peningkatan asam lambung oleh makanan yang masuk ke lambung. Nyeri pada duodenal ulcer lebih mengarah disebabkan karena lapar, atau lega setelah makan dan nyeri saat malam. Selain itu, umumnya Ulkus Peptikum sembuh sendiri dan recur sehingga nyeri bisa muncul selama beberapa hari dan minggu kemudian hilang. Pada anak-anak dan orang tua gejala tidak muncul kecuali komplikasi mulai muncul. (Lanas, 2017; Bhat, 2013).

2.3 Non Steroid Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs)

2.3.1 Inflamasi

Inflamasi merupakan bagian dari respon biologis kompleks dari jaringan tubuh atas stimulus yang membahayakan, seperti patogen, sel terluca, atau iritan, dan respon protektif melibatkan sel imun, pembuluh darah, dan mediator molekular. Fungsi inflamasi sendiri untuk mengeliminasi penyebab awal kerusakan sel, membersihkan sel nekrotik, dan jaringan yang terluca akibat proses inflamasi, dan menginisiasi perbaikan jaringan. Lima tanda klasik dari inflamasi ialah Rubor (memerah), Kalor (Panas), Dolor (Nyeri), Tumor (Pembengkakan), Functio laesa (gangguan fungsi). Inflamasi merupakan respon yang umum dan termasuk dalam mekanisme *innate immunity*. Ketika jaringan mengalami kerusakan maka akan muncul stimulus mediator kimiawi yang akan melakukan proses inflamasi mulai dari vasodilatasi, migrasi neutrofil, kemotaksis, dan meningkatkan permeabilitas vaskuler. Contoh dari mediator inflamasi ialah prostaglandin, leukotrien, bradikinin serta komplemen. (Abbas, 2009)

2.3.2 Definisi dan Pembagian NSAIDs

Nonsteroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs) adalah obat yang paling sering digunakan di masyarakat. NSAID merupakan kelas obat yang berfungsi untuk mengurangi nyeri, menurunkan demam, mencegah pembekuan darah, dan pada dosis yang tinggi, menurunkan inflamasi.

Efek samping berbeda beda tergantung obat, tetapi sebagian besar



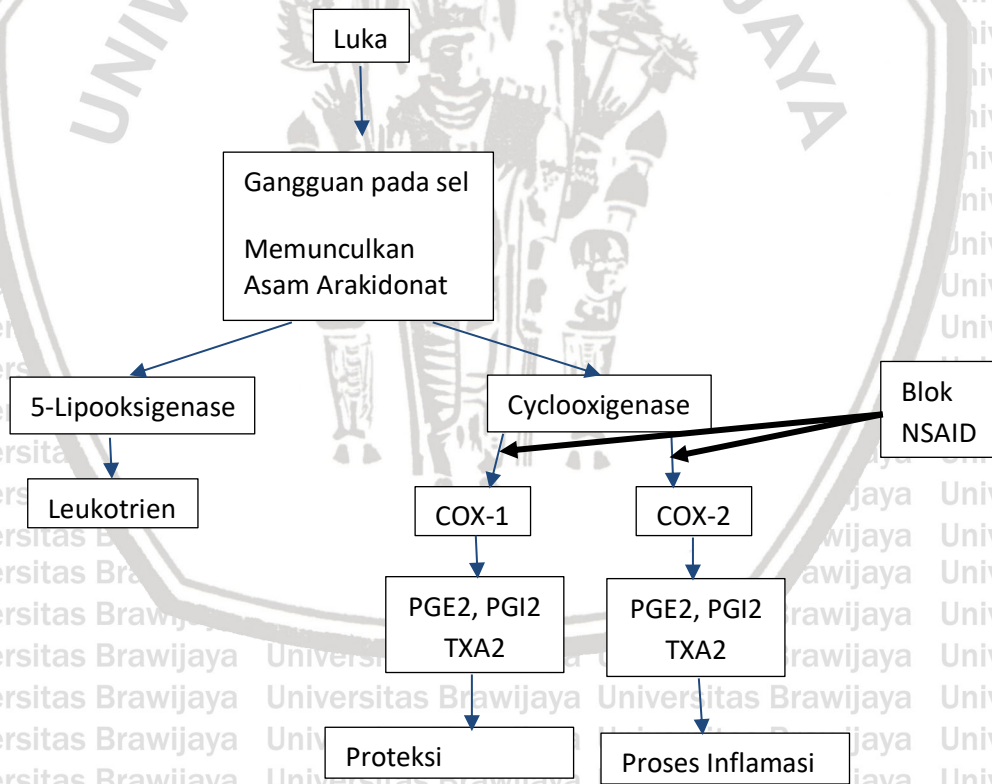
meningkatkan risiko terjadinya ulserasi dan perdarahan gastrointestinal, serangan jantung, dan gangguan ginjal. NSAID bekerja dengan melakukan inhibisi terhadap aktivitas dari enzim cyclooxygenase (COX-1 dan atau COX-2). Pada sel, enzim tersebut terlibat dalam sintesis kunci mediator biologis, yaitu prostaglandin yang terlibat dalam inflamasi, dan thromboxan yang terlibat dalam pembekuan darah. Pembagian NSAID dapat dibagi menurut struktur kimianya atau mekanisme aksinya. Pembagian berdasarkan struktur kimianya yaitu: salicylat (aspirin, asam salicylat), derivat asam propionik (ibuprofen, dexibuprofen), derivat asam asetat (indomethacin, tolmetin), derivat asam enolat (piroxicam, meloxicam), derivat asam anthranilat (asam mefenamat), COX-2 selective inhibitor (celecoxib), sulfonalida (nimesulida). NSAID walaupun terdapat berbagai macam golongan namun memiliki karakteristik serta tolerabilitas yang sama. Sangat sedikit perbedaan pada efikasi klinis antar obat NSAID pada dosis yang sama. Yang berbeda dari antar golongan obat ialah lama half-life dari obat. (Buer, 2014)

2.3.3 Farmakodinamik

Obat NSAID merupakan obat yang paling sering digunakan untuk meredakan nyeri baik nyeri yang bersifat ringan, sedang hingga berat.

Obat NSAID bekerja dengan cara memberikan hambatan pada kerja enzim cyclooxygenase (COX), baik COX-1 maupun COX-2. COX mengkatalis formasi dari prostaglandin dan thromboxan dari asam arakidonat (derivat dari fosfolipid bilayer sel oleh fosfolipase A2).

Prostaglandin bertindak sebagai mediator proses inflamasi. Karena kerja COX-1 bersifat memproteksi mukosa lambung maka apabila kerja dari COX-1 dihambat akan meningkatkan risiko terjadinya kerusakan mukosa lambung yang dapat mengarah ke ulkus peptikum. Mekanisme kerja dari NSAID sendiri bekerja menghambat progresi mediator inflamasi agar tidak terjadi nyeri pada lokasi yang mengalami trauma, obat NSAID ada yang bekerja menghambat semua jalur cyclooxygenase, atau hanya menghambat jalur cyclooxygenase 2 saja. (Knights, 2013)



Gambar 2.3 Mekanisme kerja NSAID pada jalur Cyclooxygenase (COX) (Megayanti, 2014)



2.3.4. Efek Samping

Penggunaan NSAID yang tersebar luas menyebabkan peningkatan akan efek samping dari NSAID. Penggunaan NSAID meningkatkan risiko

berbagai macam masalah pada pencernaan, ginjal dan kardiovaskular.

Yang pada umumnya digunakan pada nyeri post operasi, didapatkan peningkatan risiko komplikasi pada ginjal. Sekitar 10-20% dari pasien

NSAID mengalami dyspepsia. Organ yang paling sering terlibat dengan

efek samping penggunaan NSAID ialah organ ginjal dan juga lambung. Hal

ini disebabkan oleh kerusakan mukosa dan penghambatan

prostaglandin. Gejala meliputi dispepsia, ulserasi, dan perdarahan.

Faktor risiko di antaranya usia lanjut, riwayat peptic ulcer disease,

konsumsi alkohol, penggunaan NSAIDs dosis tinggi atau

penggunaan berulang, penggunaan bersama dengan kortikosteroid, dan

terapi NSAID kurang dari 3 bulan (Shargel et. al., 1999).

Prostaglandin dapat melindungi mukosa pada lambung dan saluran

gastrointestinal bagian atas. Penggunaan NSAID menyebabkan

penghambatan terhadap enzim Cyclooxygenase (COX) secara tidak

selektif dan terhadap sintesis prostaglandin yang merupakan

penyebab terjadinya nyeri dan inflamasi. Hal ini berujung pada

kerusakan mukosa sehingga dinding mukosa menjadi rentan

mengalami perdarahan (*bleeding*), ulserasi, dan perforasi. (Al-Saeed,

2011).

2.4 Ekstrak Buah Maja (*Aegle marmelos*)

2.4.1 Definisi Ekstrak Buah Maja (*Aegle marmelos*)

Aegle marmelos merupakan spesies tanaman yang dapat dikenal di Indonesia dengan sebutan “Maja” dan termasuk dalam famili Rutaceae.

Aegle marmelos merupakan tanaman yang bersifat tanaman tropis dan banyak tersebar di daerah India dan Asia Tenggara. Beberapa bagian dari tanaman *Aegle marmelos* telah digunakan oleh penduduk lokal di Thailand, India, dan Indonesia dalam penggunaan obat tradisional. Sebagai contoh, dari ekstrak buah yang telah dikeringkan telah digunakan sebagai agen antidiare dan antidisentri, jus dari daun yang telah dihancurkan telah digunakan sebagai obat untuk bronkitis, dan bagian dari akarnya digunakan sebagai obat anti malaria. Sebagai tambahan daun mudanya dapat digunakan sebagai sayur. Dari peneelitan kandungan *Aegle marmelos* memiliki kandungan kaya akan alkaloid dan coumarin. Terdapat pula kandungan produk derivat dari oxazolin. (Laphookhieo, 2011).

Taksonomi *Aegle marmelos* :

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Sub Kelas : Rosidae
Ordo : Sapindales
Famili : Rutaceae
Genus : *Aegle*
Spesies : *A. marmelos*



Gambar 2.4 Buah Maja (*Aegle marmelos*)

2.4.2 Komponen Penyusun Ekstrak Buah Maja (*Aegle marmelos*)

Aegle marmelos merupakan buah yang semua bagian tubuhnya dapat digunakan dan memiliki kandungan yang dapat berguna secara signifikan dalam dunia kedokteran. Adapun kandungan bioaktif komponen yang dimiliki oleh buah *Aegle marmelos* adalah sophoride, marmelosin, psoralen, tannin, luvangentin dan marmin. Dimana marmelosin dapat berperan dalam farmakologi sebagai antihelminth dan antibakteri, psoralen memiliki kandungan antispasmosid, sitotoksik, dan anticimide, tannin berperan dalam antidiare, dan luvangentin yang berperan dalam antiulserasi sehingga mampu melindungi lambung dari perlukaan baik akibat iritan, asam, maupun yang mampu melukai dinding mukosa lambung. Kandungan lainnya seperti sophoride memiliki efek antioksidan dan flavonoid yang bersifat antiinflamasi. Kandungan kandungan yang dimiliki buah *Aegle marmelos* ini dapat memberikan signifikansi yang baik dalam mengatasi efek samping dari berbagai macam medikasi serta dapat meyakinkan pasien yang memiliki waham akan kepercayaan terhadap obat tradisional. (Kesari, 2006).

2.4.3 Manfaat Ekstrak Buah Maja (*Aegle marmelos*)

Buah *Aegle marmelos* atau lebih dikenal dengan nama buah "maja" merupakan buah yang memiliki kandungan kadar air yang cukup banyak namun dikarenakan memiliki kulit buah yang keras dan cukup tebal

sehingga sangat minim terjadi penguapan dan menjadikan buah ini awet dan dapat bertahan hingga 3 bulan tanpa pengawet maupun pendingin.

Pengolahan ekstrak yang baik mampu menjadikan rasa buah yang awalnya pahit bisa menjadi terasa seperti cola dan tidak menimbulkan rasa enek sehingga dapat digunakan dalam jangka waktu lama. Pembuatan ekstrak buah "maja" sendiri tidak memerlukan biaya yang mahal dan pengolahan yang rumit hanya dengan menggunakan teknik pengeringan, pembubukan, lalu diencerkan. (Nithya, 2014). Penggunaan teknik manual yang tidak menggunakan mesin menjadi kelebihan agar kandungan kimia dan nutrisi dalam buah tetap terjaga dan tidak terkena paparan dari faktor faktor ekstrinsik yang mampu mengurangi manfaat dari ekstrak *Aegle marmelos*. Jika dibandingkan dengan buah lain, buah *Aegle marmelos* memiliki kelebihan di bidang pemasaran, karena buah ini cukup jarang digunakan sebagai sandang pangan sehingga pemanfaatan buah ini mampu untuk diproduksi dalam jumlah besar dan sebagai ciri khas dari buah yang benar benar hanya spesial berada di negara tertentu saja.

Kandungan buah *Aegle marmelos* sendiri sangat banyak mulai dari antioksidan maupun antiviral dan bakteri. Kandungan levangestin yang tinggi pada buah *Aegle marmelos* juga bisa memberikan perlindungan pada mukosa lambung karena levangestin merupakan senyawa coumarin dan flavonoid, yang dimana flavonoid mampu untuk memberikan efek anti inflamasi dikarenakan kemampuannya untuk menghambat reaksi senyawa oksigen maupun nitrogen. Dan juga flavonoid memiliki kemampuan

menghambat aktivitas pro inflamasi pada enzim akibat produksi radikal bebas, seperti *cyclooxygenase*, *lipoxxygenase* atau sintesis *nitric oxide*. (Izzi, 2012)

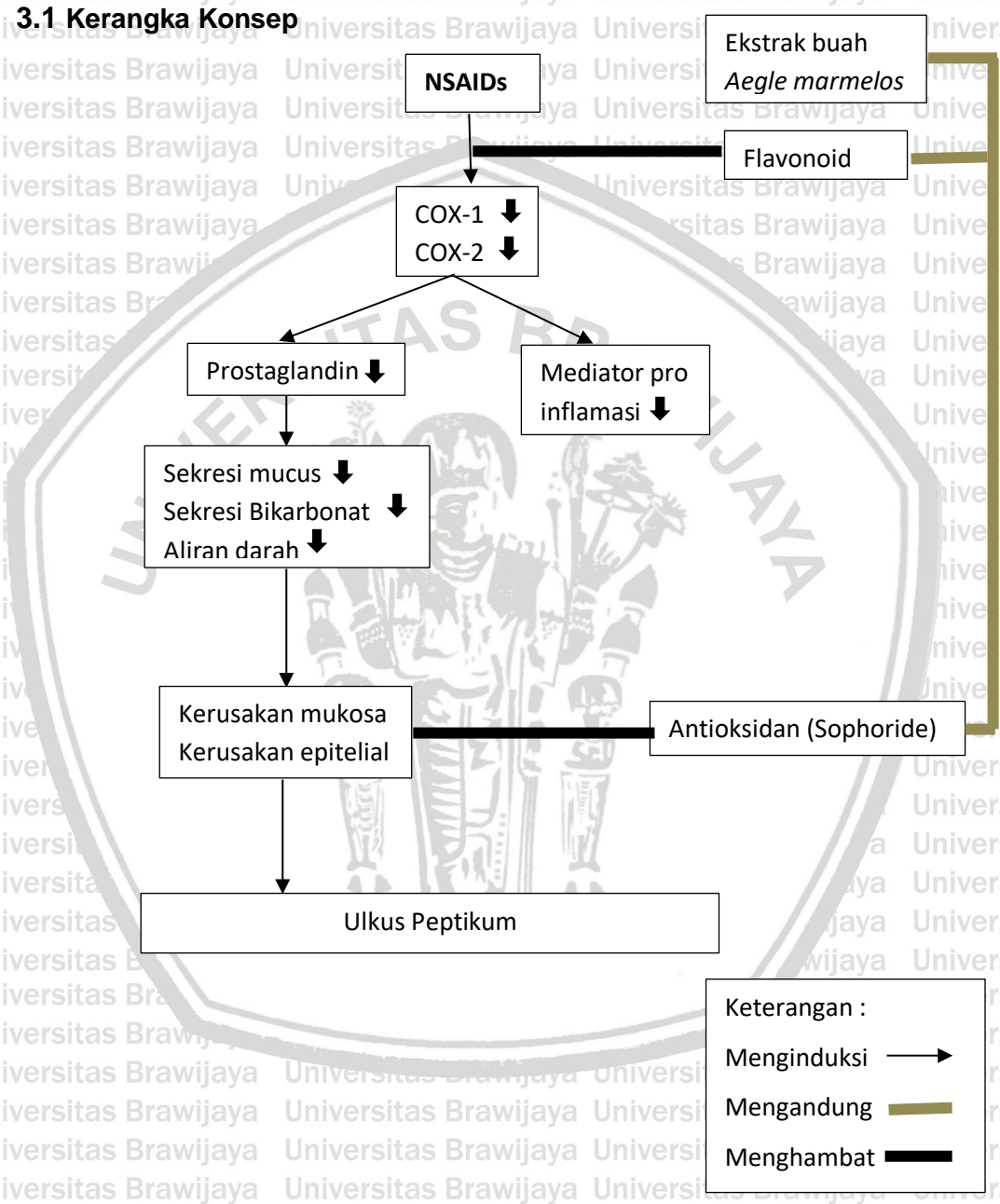
2.4.4 Ekstrak Buah Maja (*Aegle marmelos*) sebagai anti inflamasi

Seperti diketahui ekstrak buah *Aegle marmelos* memiliki kandungan levangestin yang bertugas sebagai anti inflamasi pada proses inflamasi. Selain anti ulserasi ekstrak buah *Aegle marmelos* juga berperan dalam membantu mencegah penyakit seperti diabetes, kanker, jantung, dan penyakit degeneratif yang lain. (Panda, 2014). Dalam penelitian yang dilakukan oleh Kamalakkannan terhadap tikus yang telah diinduksi streptozocin agar memiliki kondisi diabetes mampu membantu menetralkan kondisi hypoglikemia yang terdapat pada tikus. (Kamalakkannan, 2005)

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Skema cara kerja ekstrak *Aegle marmelos* dalam menghambat inflamasi ulkus



Non Steroid Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) non selektif inhibitor, yang memiliki mekanisme menghambat pembentukan prostaglandin oleh enzim cyclooxygenase (COX), seperti contohnya obat ibuprofen. Penghambatan pada jalur cyclooxygenase ini tidak selektif sehingga kedua jalur cyclooxygenase terhambat dan terjadi penurunan produksi prostaglandin. Namun, efek proteksi mukosa lambung yang dimiliki oleh COX-1 menjadi menurun, sehingga dapat menyebabkan mukosa lambung dapat terluka oleh iritan maupun asam lambung. Sedangkan pada COX-2 dimana merupakan pro inflamasi akan terjadi penurunan inflamasi yang tentunya menguntungkan bagi tubuh. Kerusakan akibat menurunnya proteksi mukosa lambung bila terjadi terus menerus dapat menjadi komplikasi yaitu ulkus peptikum. Kerusakan pada mukosa lambung ini nantinya akan diamati secara histopatologis.

Ekstrak buah *Aegle marmelos* memiliki kandungan antioksidan sehingga mampu mengurangi radikal bebas yang ada di dalam tubuh. Kandungan antioksidan tersebut memberikan efek stimulus pada sel sel tubuh, sehingga mampu untuk meningkatkan metabolisme dan lebih memiliki daya tahan dibanding sel sel normal biasanya. Kemampuan antidiabetes juga dimiliki ekstrak *Aegle marmelos* karena mampu membantu kerja pankreas, meningkatkan kerja insulin, serta menurunkan level glukosa dalam darah.

Ekstrak buah mampu meningkatkan status fungsional sel beta pankreas dan mengembalikan kerusakan akibat streptozocin. Selain berbagai hal tersebut ada efek antidiare yang mampu menghentikan aktivitas protozoa infeksius dalam tubuh. Fungsi yang utama dari buah *Aegle marmelos* ialah fungsinya dalam mengobati ulserasi yang bisa diinduksi oleh penggunaan NSAID sehingga kita

dapat meminimalisir terjadinya kerusakan pada mukosa lambung sampai kearah

komplikasi dapat dihindari. (Gupta, 2011).

3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian ekstrak buah *Aegle marmelos* mampu mengurangi kerusakan lesi mukosa lambung yang diamati secara histopatologis berdasarkan modifikasi skor integritas sel epitel mukosa lambung pada tikus *Rattus norvegicus* strain wistar yang diinduksi oleh indometasin.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan ialah penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian yang digunakan adalah “*The Post Control Group Design*” dengan membandingkan secara histopatologis pemberian ekstrak buah *Aegle marmelos* pada lambung tikus (*Rattus norvegicus* strain wistar) yang diinduksi indometasin dengan cara melibatkan kelompok kontrol disamping perlakuan yang akan dipilih dengan menggunakan metode simple random sampling.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah 25 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) dengan kriteria inklusi :

- a. Jenis Kelamin : jantan
- b. Usia : 2-3 bulan
- c. Berat badan : 150-250 gram
- d. Kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif, dan tanpa kelainan anatomik

Kriteria eksklusi :

- a. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
- b. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berjalan
- c. Tikus sakit selama masa adaptasi

Cara pengambilan sampel dengan metode *simple random sampling* (sampel diambil secara random) dari populasi yang nantinya akan dikelompokkan kedalam masing masing kelompok control dan perlakuan. Banyaknya sampel pada penelitian ini ditetapkan berdasarkan standar prosedur baku. Untuk menentukan jumlah sampel digunakan rumus :

$$n = (15+p) : p \text{ (Indra, 1999)}$$

$$n = (15+5) : 5$$

$$n = 4$$

keterangan: p = perlakuan (5 perlakuan)

n = jumlah sampel

15 = nilai konstanta

Untuk perlakuan sebanyak 5 macam diperlukan jumlah sampel atau ulangan paling sedikit 4 kali untuk masing-masing perlakuan sehingga jumlah total skor = 20 ekor. Akan tetapi diperlukan penambahan pengulangan pada setiap perlakuan sebagai cadangan dan ditetapkan sejumlah 1 kali pengulangan untuk menghindari bias dan kemungkinan tikus mati sebelum pembedahan. Sehingga total sampel yang dibutuhkan 25 ekor tikus dengan rincian 5 ekor tikus untuk masing masing perlakuan. Teknik pengambilan sampel dilakukan dengan *simple random sampling* yaitu pengundian.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel independen (variabel bebas) :
pemberian ekstrak buah *Aegle marmelos*.

Variabel dependen (variabel terikat) :
Skor kedalaman ulkus pada mukosa lambung tikus *Rattus norvegicus*.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Penelitian dilakukan selama 2 bulan, dimulai dari bulan Agustus 2019 – September 2019.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

4.5.1.1 Bahan Untuk Pemeliharaan Hewan Coba

Bahan yang digunakan selama pemeliharaan *Rattus norvegicus* strain wistar adalah :

- a. Sekam
- b. Makanan tikus, makanan standar berupa campuran dari makanan ayam jenis BK dan tepung terigu dengan rasio 2:1 kemudian dibuat pelet

4.5.1.2 Bahan Untuk Perlakuan Hewan Coba

Bahan yang digunakan selama perlakuan pada *Rattus norvegicus* strain wistar adalah :

- a. Indometasin 30mg/KgBB

b. Aquades sebagai pelarut Indometacin

c. Ekstrak buah *Aegle marmelos*

d. Aquades

4.5.1.3 Bahan untuk Pengambilan Organ

a. Kloroform

b. Air untuk mencuci kotoran

4.5.1.4 Bahan untuk Pembuatan Preparat

a. Lambung Tikus

b. Formalin 10%

c. Alkohol 80%, 95%, 96%, dan 100%

d. Alkohol asam

e. Parafin

f. Xylol

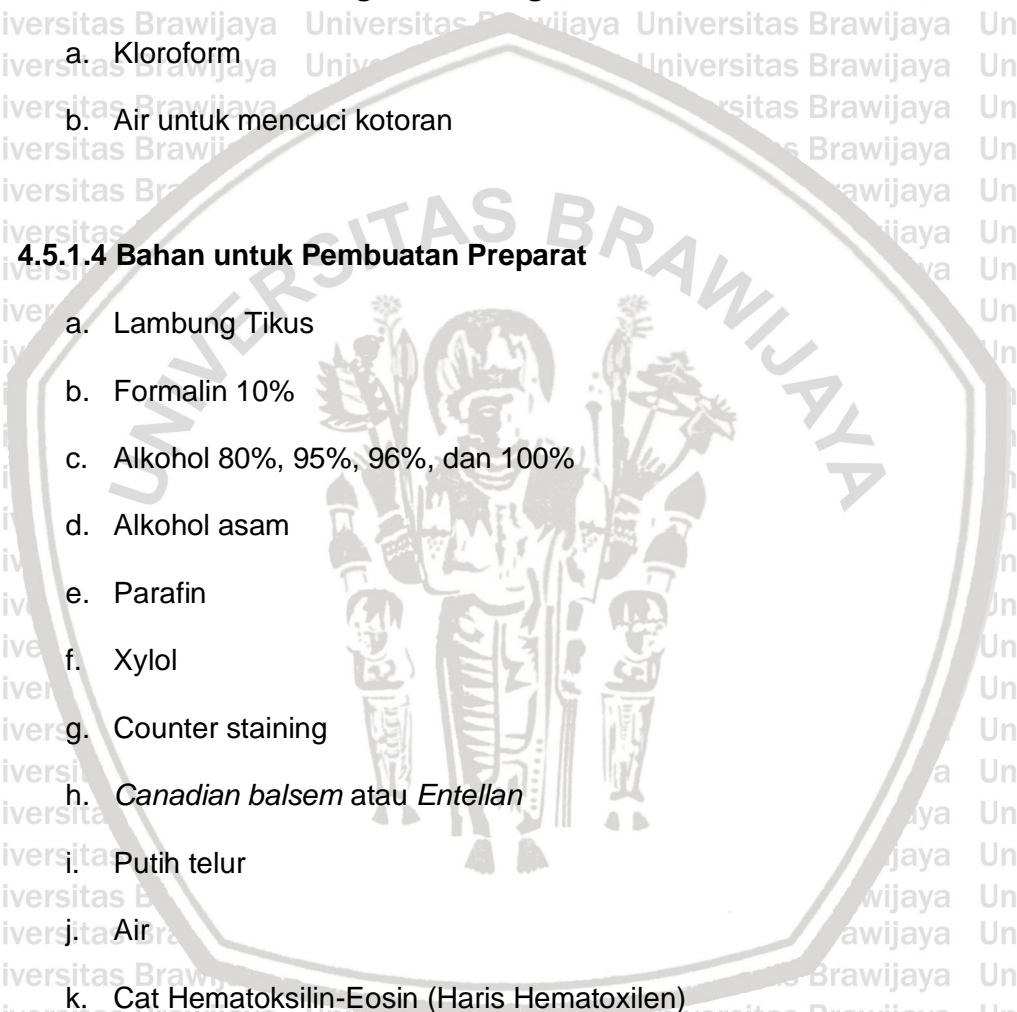
g. Counter staining

h. *Canadian balsem* atau *Entellan*

i. Putih telur

j. Air

k. Cat Hematoksilin-Eosin (Haris Hematoxilen)



4.5.2 Alat Penelitian

4.5.2.1 Alat untuk Pemeliharaan Hewan Coba

- a. Kandang tikus berupa kotak plastik yang diisi sekam dan ditutup dengan kawat. Ukuran kandang 15cm x 30 cm x 42cm, masing masing kandang berisi 1 ekor tikus.
- b. Wadah air minum tikus
- c. Spidol untuk memberi identitas pada tikus

4.5.2.2 Alat untuk Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

- a. Timbangan

4.5.2.3 Alat untuk Pemberian Indometasin dan ekstrak buah *Aegle marmelos*

- a. Sonde
- b. Spuit 1 cc
- c. Spuit 3 cc

4.5.2.4 Alat Untuk Pengambilan Organ

- a. Handscoon
- b. Papan dan nampan bedah
- c. Alat bedah minor berupa: pinset, pisau bedah (scalpel), gunting
- d. Tempat organ berupa tabung plastik untuk pemeriksaan histopatologi

4.5.2.5 Alat untuk Pembuatan Preparat

- a. *Rotatory microtome*
- b. *Object glass*
- c. *Cover glass*

4.5.2.6 Alat Penilaian Histopatologis Lesi Mukosa Lambung Tikus

- a. Mikroskop cahaya
- b. Minyak imersi
- c. Kamera digital
- d. Alat tulis

4.6 Definisi Operasional

1. Indometasin

Indometasin adalah obat golongan *Non Steroid Antiinflammator Drugs* (NSAIDs) yang digunakan sebagai inducer perdarahan pada lambung tikus dengan dosis 30mg/kgBB (Purnamawati, 2009). Indometasin dengan merek SIOMA disediakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

2. Ekstrak Buah Maja (*Aegle marmelos*)

Ekstrak Buah Maja (*Aegle marmelos*) diberikan pada tikus perlakuan 1, 2, dan 3 per oral dengan dosis untuk penelitian eksplorasi 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB. Buah Maja didapatkan dari Materia Medika, Kota Batu dengan bentuk simplisia. Dari simplisia dilakukan ekstrak etanol di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

3. Tikus model ulkus

Tikus yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar dengan berat 150-250 gram yang dibuat model ulkus dengan diinduksi indometasin per oral dengan dosis 30 mg/kgBB.

4. Gambaran histopatologis (kedalaman ulkus)

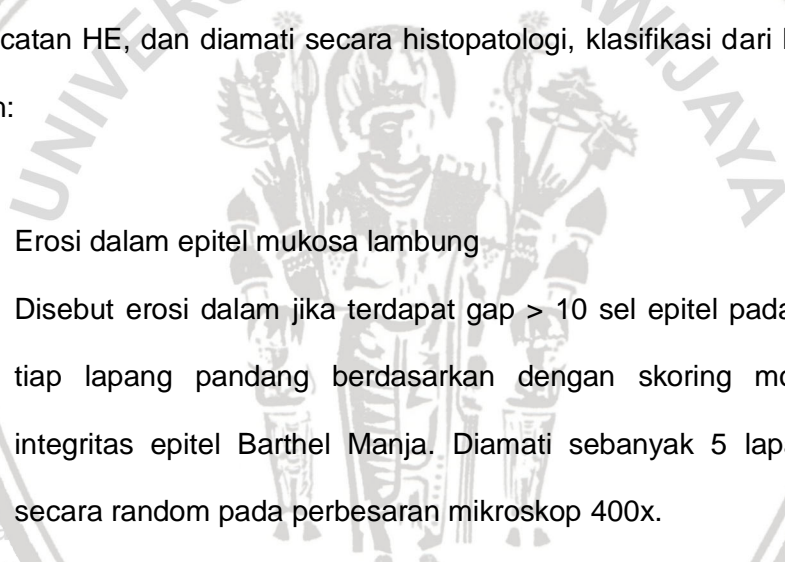
Pengukuran hasil gambaran histopatologis berupa kedalaman ulkus adalah kerusakan yang terjadi mulai dari diinduksinya indometasin sampai diberikannya ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*), kemudian dilakukan pembedahan, pengecatan HE, dan diamati secara histopatologi, klasifikasi dari kerusakan sel adalah:

a. Erosi dalam epitel mukosa lambung

Disebut erosi dalam jika terdapat gap > 10 sel epitel pada lesi mukosa tiap lapang pandang berdasarkan dengan skoring modifikasi skor integritas epitel Barthel Manja. Diamati sebanyak 5 lapang pandang secara random pada perbesaran mikroskop 400x.

b. Erosi permukaan epitel mukosa lambung

Disebut sebagai erosi permukaan jika terdapat gap 1-10 sel epitel pada lesi mukosa tiap lapang pandang berdasarkan dengan skoring modifikasi skor integritas epitel Barthel Manja. Diamati sebanyak 5 lapang pandang secara random pada perbesaran mikroskop 400x.



c. Deskuamasi epitel

Jika terdapat kerusakan atau pengangkatan sedikit pada sel epitel mukosa lambung berdasarkan dengan skoring modifikasi skor integritas epitel Barthel Manja. Diamati sebanyak 5 lapang pandang secara random pada perbesaran mikroskop 400x.

5. Dosis optimal ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*)

Dosis dapat dikatakan optimal apabila hasil dari pemberian dosis menunjukkan hasil yang tidak signifikan bila dikomparasi dengan kelompok kontrol negatif.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Model Hewan Gastritis

- 1) Tikus diadaptasikan selama 7 hari,
- 2) Tikus dipuasakan 8 jam, kemudian diinduksi indometasin 30mg/kgBB per oral dengan sonde (Purnamawati, 2009),

4.7.2 Pemberian Ekstrak buah Maja "*Aegle marmelos*" dan Pembedahan Kelompok Perlakuan

1. Ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*) diberikan sebanyak 3 dosis (50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB) setiap 8 jam dimulai 8 jam setelah induksi indometasin, kemudian dilakukan pembedahan serta diamati secara histopatologis dan diawetkan dalam formalin 10% untuk persiapan pembuatan preparat histopatologi. Untuk tikus kontrol positif dan negatif dilakukan pembedahan pasca 8 jam induksi indometasin.

4.7.3 Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi

Metode teknik pembuatan preparat histopatologi (Muhartono, 2013)

1. Organ lambung yang telah diambil dan sudah difiksasi formalin 10% 3 jam kemudian dipotong secara representatif (perwakilan jaringan lambung tikus dari masing-masing kelompok)
2. Bilas organ tersebut dengan air mengalir sebanyak 3-5 kali
3. Dehidrasi organ lambung dengan: alkohol 70% selama 0,5 jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol xylol 1:1 selama 0,5 jam
4. Clearing: xylol selama 1 jam, xylol selama 1 jam
5. Impregnasi dengan parafin selama 1 jam dalam oven suhu 65°C
6. Blok parafin didinginkan dalam lemari es sebelum dipotong, pemotongan menggunakan rotary microtome dengan menggunakan disposable knife.
Pita parafin dimekarkan pada waterbath dengan suhu 60°C
7. Setelah preparat jadi, kemudian dilakukan pengecatan jaringan lambung tikus menggunakan pewarna Hematoxylin Eosin (HE)
8. Prosedur pulasan HE:
 - a. Dilakukan deparafinisasi dalam larutan *xylol* selama 5 menit, larutan *xylol* selama 5 menit, etanol absolut selama 1 jam
 - b. *Hydrasi* dalam alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 70% selama 2 menit, air selama 10 menit
 - c. Pulasan inti dengan haris hematoksilin selama 15 menit, air mengalir, eosin selama maksimal 1 menit
 - d. Dehidrasi: alkohol 70% selama 2 menit, *xylol* selama 2 menit, *Mounting* dengan entelan dan tutup dengan deck glass.

4.7.4 Identifikasi Lesi Mukosa Lambung secara Histopatologis

Pengamatan dan pengumpulan data dilakukan dengan mengamati dibawah mikroskop terhadap 25 preparat histopatologi mukosa lambung tikus dengan pembesaran 400x. Setiap preparat histopatologi dipilih 5 lapang pandang untuk dilihat integritas epitelnya berdasarkan modifikasi skor integritas sel epitel Barthel Manja (Manja, 2003). Lapangan pandang dipilih secara random.

Tabel 4.1 Tabel Skoring Integritas Epitel Mukosa Berdasarkan Modifikasi Skoring Barthel Manja (Manja, 2003)

Skor	Integritas Epitel Mukosa
0	Tidak ada perubahan patologis
1	Deskuamasi epitel
2	Erosi permukaan epitel mukosa (gap 1-10 sel epitel/lesi)
3	Erosi dalam epitel mukosa (gap >10 sel epitel/lesi)

Keterangan : gap merupakan jarak antara titik awal dan titik akhir dari disintegrasi epitel

4.7.5 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba diseleksi sesuai dengan kriteria inklusi yang telah ditentukan.

1. Persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang yang sudah dibersihkan, rak tempat kandang yang sudah dibersihkan, anyaman kawat, sekam, botol minum yang tidak bocor, timbangan dalam gram, wadah makanan minum dan pakan.
2. Hewan coba diadaptasikan di Laboratorium Faramakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya selama 7 hari
3. Masing-masing kandang berisi 1 ekor hewan coba dalam keadaan kandang bersih dan penggantian sekam dilakukan 3 hari sekali.

4. Hewan coba tikus putih diberi makan dan minum sesuai dengan standart laboratorium, kemudian dilakukan juga penimbangan berat badan diawal dan diakhir adaptasi untuk mengetahui adanya kenaikan atau penurunan berat badan sebagai standar pemberian ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*) dan indometasin.

Setelah diadaptasikan selama 7 hari, tikus pada kontrol negatif tetap diberi makan dan minum sesuai dengan standar laboratorium, pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan I, II, dan III akan diinduksi indometasin per oral pada hari pertama. Untuk tikus pada perlakuan I, II, dan III 8 jam setelah diinduksi indometasin, masing masing akan diberikan ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*) per oral dengan dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB selama 3 kali dengan selang waktu 8 jam setiap kali pemberian ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*) tersebut.

Pembedahan dilakukan 8 jam setelah pemberian terakhir ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*). Prosedur ini dilakukan dengan dislokasi servikal hingga tidak adanya pergerakan nafas dada, hilangnya denyut jantung melalui palpasi dada, dan hilangnya refleks korneal (kelopak mata tidak bergerak). Setelah itu, pengambilan organ lambung yang telah dicuci dengan PBS untuk menghilangkan kotoran atau darah yang tersisa.

5. Pembedahan dilakukan pada hari ke-8 atau setelah 32 jam induksi indometasin. Prosedur ini dilakukan dengan dislokasi servikal. Tanda hewan coba sudah mati adalah tidak adanya pergerakan nafas dada,

hilangnya denyut jantung melalui palpasi dada atau dengan stetoskop,

dan hilangnya refleks korneal (kelopak mata tidak bergerak).

6. Pengambilan organ lambung yang telah dicuci dengan PBS untuk menghilangkan kotoran atau darah yang tersisa.

7. Tubuh tikus yang tersisa dibersihkan dan dikubur dengan baik.

8. Alat-alat yang digunakan dicuci dengan sabun, dan dikeringkan.

4.8. Alur Penelitian dan Pengumpulan Data

1. Alur Penelitian :

Setelah menilik penelitian terdahulu, telah ditentukan bahwa dosis Indometasin adalah 30 mg/kgBB dan dosis ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*) yang digunakan adalah 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB. Sampel penelitian dibagi dalam 5 perlakuan yaitu:

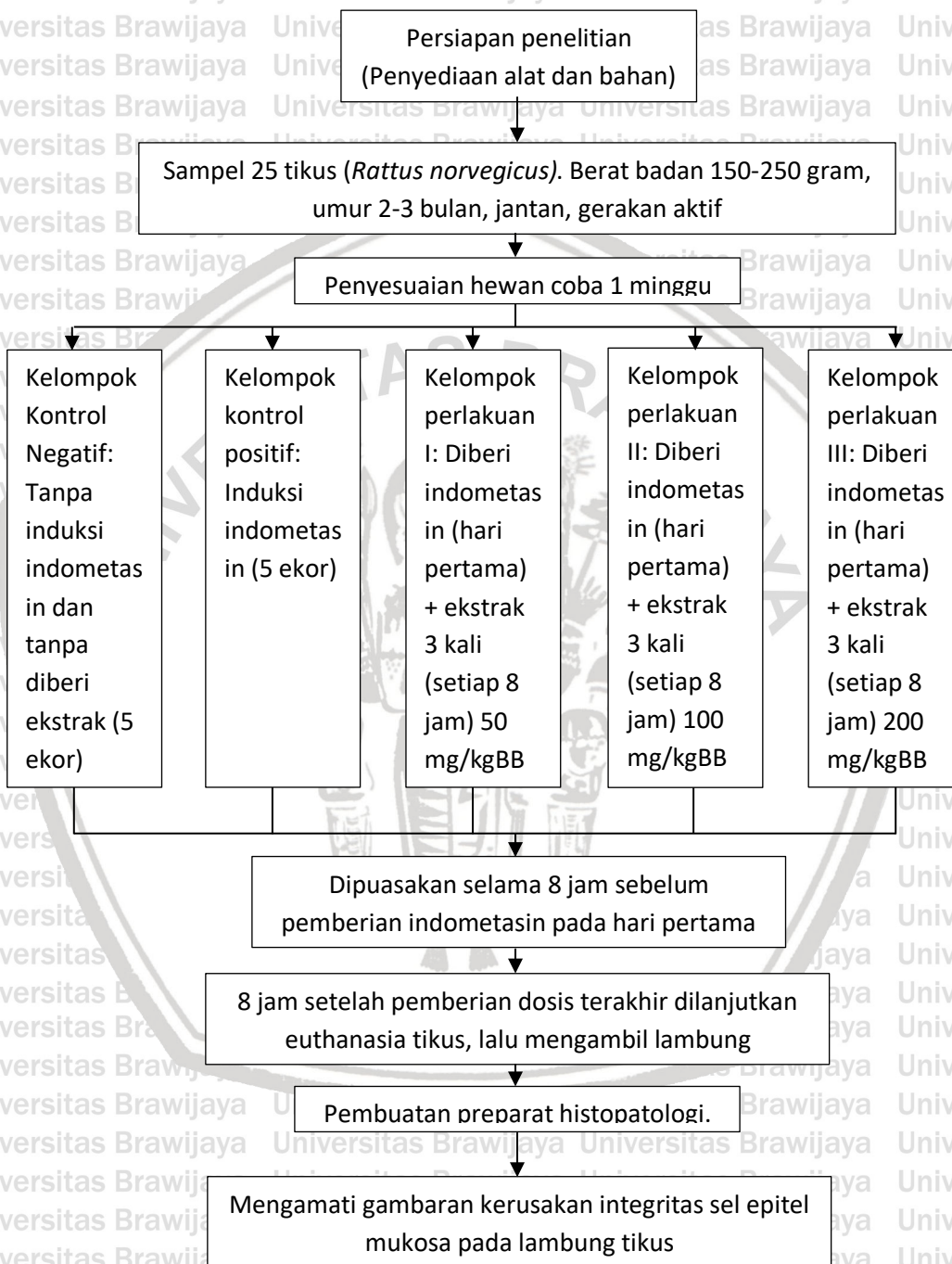
- A. Kelompok 1, yaitu kelompok kontrol negatif : tidak diberi indometasin ataupun ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*).
- B. Kelompok 2, yaitu kelompok kontrol positif : diberi indometasin 30 mg/kgBB tanpa induksi ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*).
- C. Kelompok 3, yaitu kelompok dosis 1 : diberi indometasin 30 mg/kgBB pada jam pertama, kemudian diberi ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*) dosis 1 yaitu 50 mg/kgBB setiap 8 jam selama 24 jam.
- D. Kelompok 4, yaitu kelompok dosis 2 : diberi indometasin 30 mg/kgBB pada jam pertama, kemudian diberi ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*) dosis 2 yaitu 100 mg/kgBB setiap 8 jam selama 24 jam.

E. Kelompok 5, yaitu kelompok dosis 3 : diberi indometasin 30 mg/kgBB pada jam pertama, kemudian diberi ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*) dosis 3 yaitu 200 mg/kgBB setiap 8 jam selama 24 jam.

Pembedahan semua tikus dilakukan 8 jam setelah pemberian terakhir ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*) kecuali kelompok kontrol positif dan negatif yang dibedah 8 jam setelah adaptasi.



4.8.1 Alur Penelitian



4.8.2 Teknik Pengumpulan Data

Data dikumpulkan dalam bentuk rerata skor epitel kedalaman lesi yang didapatkan dari sampel yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol negatif (tikus sehat dan tidak diberi perlakuan), 1 kelompok kontrol positif (tikus hanya diinduksi indometasin 30 mg/kgBB), dan 3 kelompok perlakuan (tikus diberikan ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*) dengan dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB dan diinduksi indometasin 30 mg/kgBB).

Pengamatan skor epitel dilakukan sesudah pemberian perlakuan, dilanjutkan dengan analisis data.

4.9 Analisis Data

Rancangan pada penelitian ini menggunakan "*The Post Test Control Group Design*" dimana pengukuran hanya dilakukan setelah pemberian perlakuan selesai karena penilaian histopatologis lesi mukosa lambung pada tikus hanya mungkin dilakukan pada hewan coba yang sudah dibedah (dimatikan dulu). Pengukuran kedalaman lesi mukosa didasarkan pada keberadaan kelompok kontrol negatif sebagai kelompok yang menggambarkan kondisi lambung normal (tanpa kerusakan pada mukosa).

Data yang diperoleh pada penelitian ini adalah data skor kedalaman lesi mukosa lambung tikus secara histopatologis pada masing-masing kelompok perlakuan. Data hasil penelitian tersebut akan diuji normalitas data dengan Kolmogorov Smirnov (nilai $P > 0.05$ merepresentasikan data normal) dan homogenitas data dengan Levene statistik (nilai $P < 0.05$ merepresentasikan data homogen.) Jika data normal dan homogen maka data tersebut akan diuji dengan ANOVA untuk mengetahui apakah ada perbedaan skor ulkus yang signifikan diantara kelompok perlakuan. Jika One-way ANOVA menyatakan

$P < 0.05$ maka analisis selanjutnya menggunakan analisis Post Hoc Tuckey

untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan, uji korelasi Pearson, dan uji linear regresi (Muhartono, 2013). Semua uji analisis statistik menggunakan software *SPSS for windows versi 26*

4.10 Jadwal Kegiatan

Berikut adalah jadwal kegiatan penelitian ini:

1. Persiapan (17 Juli – 4 Agustus 2019)

- 17 Juli 2019 : Pengajuan Etik
- 21 Juli 2019 : Kelayakan Etik
- 26 Juli 2019 : Pendaftaran penelitian di laboratorium farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan pemesanan tikus serta penyiapan ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*)
- 4 Agustus 2019 : Tikus siap digunakan penelitian

2. Pelaksanaan (5 Agustus-2 September 2019)

- 5 Agustus - 12 Agustus 2019 : Penyesuaian tikus
- 5 Agustus 2019 : Penimbangan tikus, membagi kelompok penelitian
- 13-15 Agustus 2019 : Penelitian efek ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*) pada kedalaman lesi mukosa lambung tikus.
- 16 Agustus 2019 : Pembuatan preparat histopatologi.
- 2 September 2019 : Pembacaan hasil preparat dengan menggunakan mikroskop.

3. Pengolahan dan Pelaporan (5 September 2019 – 27 Oktober 2019)

- Mengerjakan statistika terhadap hasil skor integritas epitel mukosa lambung tikus *Ratus norvegicus* strain wistar
- Pembuatan bab 5 sampai dengan 7

4.11 Etika Penelitian

Hewan coba pada penelitian ini diadaptasikan selama 7 hari dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Kandang yang terbuat dari plastik dan ditutup dengan kawat serta diberi sekam pada bagian bawahnya dan diganti 3 hari sekali agar tetap kering dan bersih. Ventilasi ruangan cukup dengan suhu ruangan sekitar 26-28°C. Masing-masing kandang diisi dengan 1 ekor tikus. Berdasarkan prinsip etika pemanfaatan hewan percobaan dalam penelitian kesehatan dapat dijelaskan sebagai berikut

(Ridwan, 2013):

1. *Replacement* diartikan sebagai keperluan memanfaatkan hewan coba sudah diperhitungkan dengan seksama. Dalam penelitian ini digunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar dengan berat badan 150-250 gram, jenis kelamin jantan, berusia 2-3 bulan. Tikus merupakan hewan coba yang mempunyai kondisi biologis mirip dengan manusia dan sudah banyak digunakan dalam penelitian hewan coba dengan ulkus lambung.
2. *Reduction* diartikan sebagai pengurangan/meminimalisasikan penggunaan hewan coba dalam penelitian, tetapi dengan tidak mempengaruhi kualitas dan hasil penelitian menurun. dalam penelitian ini menggunakan hewan coba sebanyak 20 ekor tikus yang dibagi menjadi

5 kelompok (1 kontrol negatif, 1 kontrol positif, dan 3 kelompok dengan perlakuan) masing-masing berjumlah 4 ekor tikus. Kemudian ditambahkan 1 ekor di tiap kelompoknya untuk mengantisipasi kemungkinan *dropout*. Jumlah hewan coba dihitung menggunakan rumus Indra tahun 1999 yaitu $n = (15+p):p$, dengan p adalah jumlah kelompok dan n adalah jumlah hewan coba yang diperlukan.

3. *Refinement* diartikan sebagai perlakuan hewan coba secara manusiawi (humane), memelihara dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian. Dalam penelitian ini hewan coba diadaptasikan selama 7 hari dan diberikan makan dan minum *ad libitum*. Masing-masing kandang diisi dengan 1 ekor tikus. Ventilasi ruangan cukup dengan suhu ruangan sekitar 26-28°C. Euthansia dilakukan dengan dislokasi servikal.

Prinsip 5F :

1. *Freedom from hunger and thirst*. Dalam penelitian ini hewan coba diberikan makanan dan minuman *ad libitum*.
2. *Freedom from discomfort*. Dalam penelitian ini hewan coba diletakkan pada kandang dan hanya diisi 1 ekor tikus pada setiap kandang untuk menyediakan kebebasan dalam bergerak. Kandang terbuat dari plastik dan diberi pentutup jaring kawat untuk akses keluar masuknya udara. Kandang dialasi dengan sekam yang diganti setiap 3 hari sekali agar tetap kering dan bersih.
3. *Freedom from pain, injury, and disease*. Dalam penelitian ini hewan coba diberikan perlakuan per oral untuk meminimalisasi nyeri dari

prosedur invasif. Berikutnya, hewan coba harus bebas dari penyakit

dengan dilakukan pemantauan secara rutin. Proses euthanasia

dengan dislokasi servikal.

4. *Freedom to express normal behaviour*. Dalam penelitian ini hewan

coba diperbolehkan mengekspresikan tingkah laku alami dengan

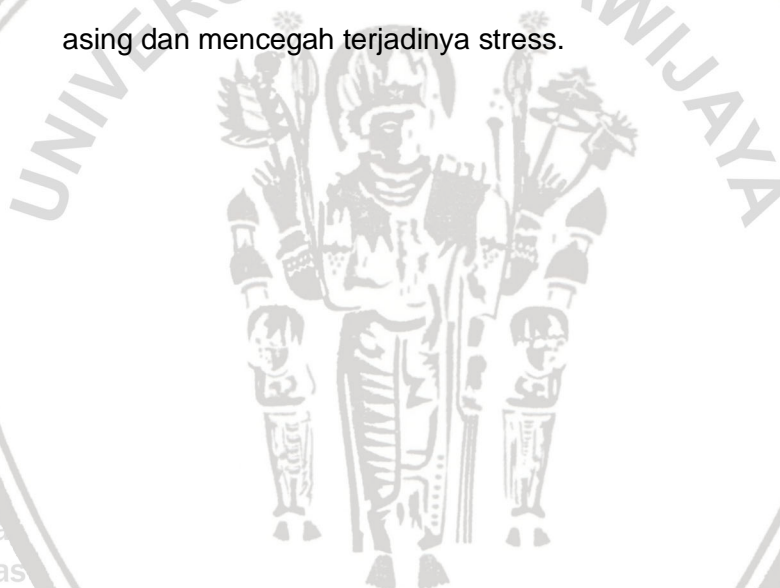
memberikan kualitas kandang yang baik dan cukup luas agar bebas

bergerak.

5. *Freedom for fear and distress*. Dalam penelitian ini hewan coba

beradaptasi selama 7 hari untuk menciptakan lingkungan yang tidak

asing dan mencegah terjadinya stress.

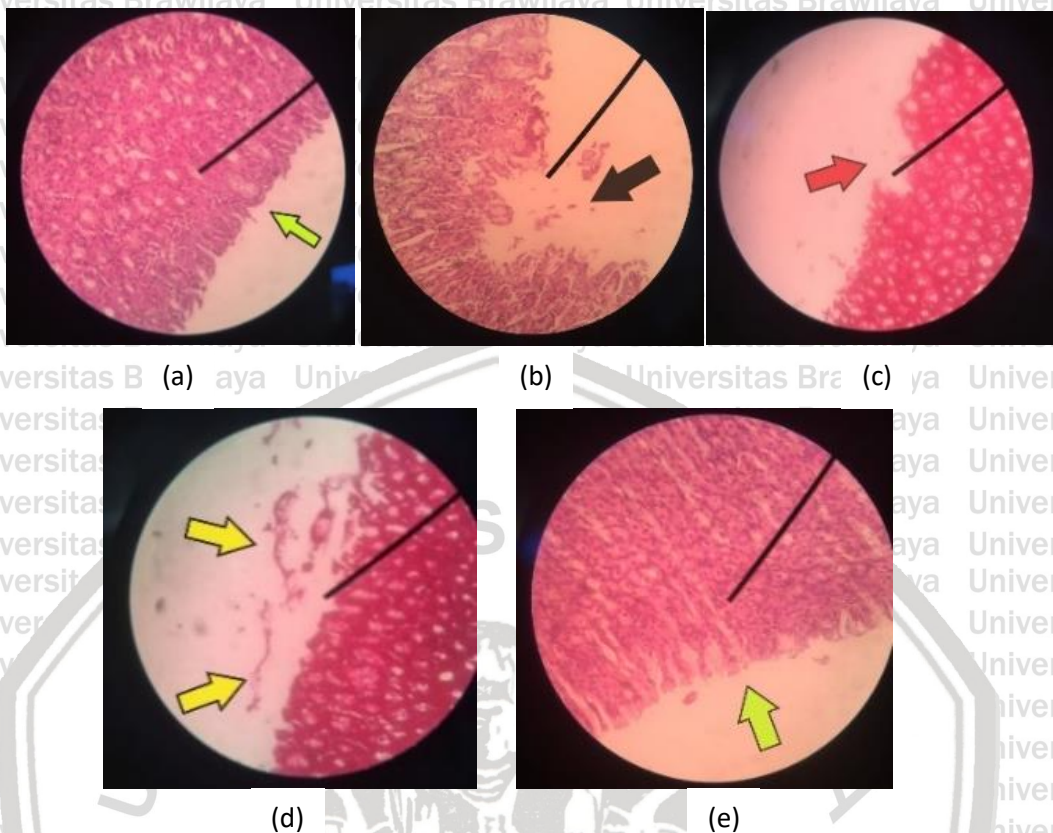


BAB 5**HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA**

Dari pelaksanaan penelitian eksperimental kami dalam menilai pengaruh pemberian ekstrak buah maja (*Aegle marmelos*) pada tikus *Rattus norvegicus* strain wistar yang diinduksi dengan indometasin, kami dapatkan data berupa hasil pengamatan secara histopatologis sesuai dengan modifikasi skoring integritas epitel Barthel-Manja dan analisis data, berikut merupakan hasil yang kami dapatkan :

5.1 Hasil Pemeriksaan Histopatologis (Integritas Sel Epitel) Lambung Tikus

Tikus yang sudah dibedah dan diambil lambungnya kemudian diamati secara histopatologis untuk diamati integritas sel epitel pada dinding lambung tikus. Pengamatan dilakukan pada preparat dari 5 kelompok penelitian, terdiri dari kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif, dan 3 kelompok perlakuan dosis dengan setiap kelompok terdiri atas 5 ekor tikus. Penilaian skor histopatologis pada preparat dilakukan berdasarkan modifikasi skor integritas epitel Barthel Manja yang memiliki parameter tingkat kerusakan sel epitel (Manja, 2003) dengan masing masing kelompok penelitian diamati secara random pada 5 lapang pandang dengan perbesaran 400x dan didapatkan hasil sebagai berikut.



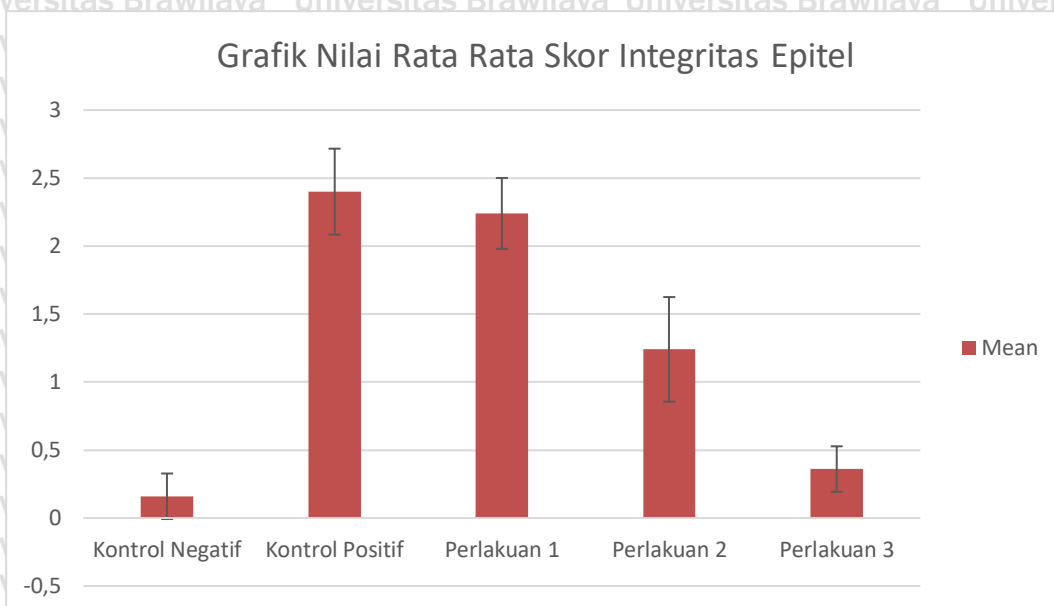
Gambar 5.1 Histopatologi Mukosa Lambung Tikus *Rattus norvegicus* Strain Wistar, HE, 400x.

Keterangan : (a) kontrol negatif didapatkan epitel mukosa normal; (b) kontrol positif didapatkan gambaran erosi dalam; (c) kelompok perlakuan 1 didapatkan gambaran erosi permukaan dan beberapa deskuamasi; (d) kelompok perlakuan 2 didapatkan gambaran deskuamasi; (e) kelompok perlakuan 3 didapatkan epitel mukosa normal.

Keterangan Warna panah :
 Erosi Dalam epitel █ , Erosi permukaan epitel █ , Deskuamasi epitel █
 , Epitel normal █

Tabel 5.1 Hasil Rata Rata Skor Integritas Epitel Mukosa Lambung

No	Kelompok Penelitian	Nilai rata-rata skor integritas Epitel Mukosa Lambung ± Standar Deviasi / 5 lapang pandang
1	Kontrol Negatif (K-)	0,16 ± 0,167332005
2	Kontrol Positif (K+)	2,4 ± 0,316227766
3	Perlakuan 1 (P1)	2,24 ± 0,260768096
4	Perlakuan 2 (P2)	1,24 ± 0,384707681
5	Perlakuan 3 (P3)	0,36 ± 0,167332005



Gambar 5.2 Grafik Nilai Rata-Rata Skor Integritas Epitel Barthel Manja Mukosa Lambung (Data ditampilkan sebagai rerata \pm Standar Deviasi)

Dari grafik dapat diartikan bila nilai yang ditunjukkan semakin tinggi, maka kerusakan epitel semakin besar. Pada grafik terlihat nilai Kontrol Positif memiliki nilai tertinggi yang menunjukkan adanya kerusakan epitel terbesar, dan dari hasil penelitian menunjukkan adanya penurunan skor seiring dengan pemberian ekstrak buah maja, dengan pemberian dosis terbesar memberikan perbaikan epitel paling baik pada hewan coba.

5.2 Analisis Data

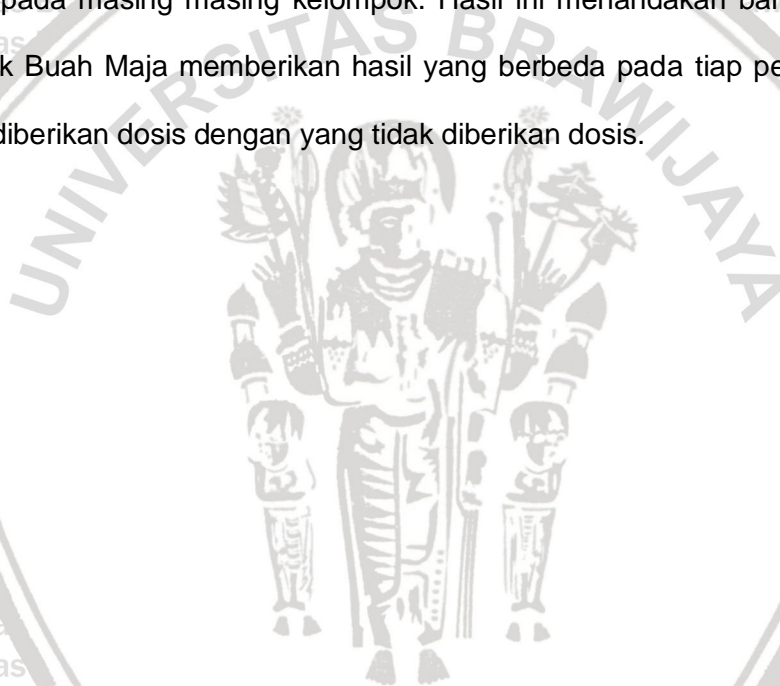
5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas Varians

Sebelum melakukan analisis statistik One Way ANOVA, harus dilakukan Uji Normalitas dan Uji Varian terlebih dahulu untuk mengetahui data yang digunakan memiliki distribusi normal dan dengan varians sama atau homogen sesuai syarat uji ANOVA. Pada uji normalitas menggunakan Kolmogorov-Smirnov Test menunjukkan hasil p-value kurang dari 0,2 dari nilai tersebut dapat disimpulkan bahwa skor integritas epitel terdistribusi normal. Sedangkan pada uji homogenitas varians digunakan untuk menentukan varian pada masing masing kelompok sama (homogen) atau tidak. Dari uji homogenitas data didapatkan nilai signifikan homogenitas varians sebesar 0,284 ($p > 0,05$). Nilai tersebut

menunjukkan bahwa skor integritas epitel dari data penelitian memiliki varian data yang homogen.

5.2.2 Uji One-Way ANOVA

Uji One-Way ANOVA dilakukan untuk menilai apakah ada perbedaan signifikan dari kerusakan epitel antar kelompok data. Hasil analisis menggunakan ANOVA mendapatkan hasil nilai 0,000 ($p < 0,05$). Sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan dari perlakuan terhadap kerusakan epitel pada masing masing kelompok. Hasil ini menandakan bahwa pemberian ekstrak Buah Maja memberikan hasil yang berbeda pada tiap perlakuan antara yang diberikan dosis dengan yang tidak diberikan dosis.



5.2.3 Uji Beda Multi Komparasi Post Hoc Tuckey Kelompok Kontrol dan Perlakuan Terhadap Skor Integritas Epitel Tiap Lapang Pandang

Uji Beda Post Hoc Tuckey dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan integritas epitel antar masing masing kelompok. Hasil berdasarkan nilai P adalah sebagai berikut :

Tabel 5.2 Hasil Uji Beda Multi Komparasi Post Hoc Tuckey

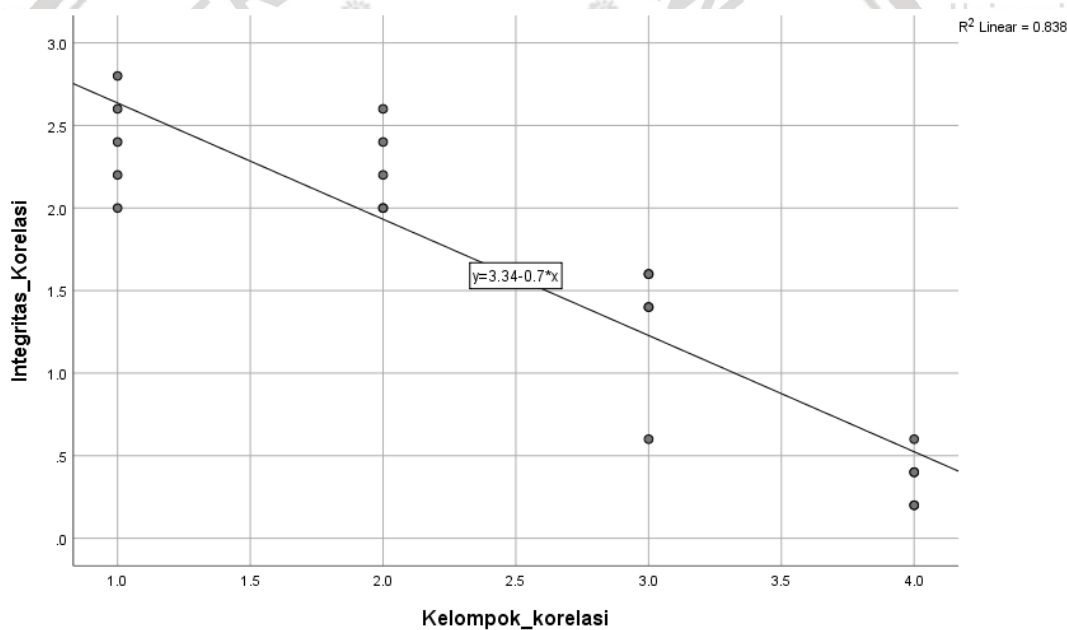
Kelompok	Kontrol Negatif	Kontrol Positif	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
Kontrol Negatif	-	0,000	0,000	0,000	0,879
Kontrol Positif	0,000	-	0,879	0,000	0,000
Perlakuan 1	0,000	0,879	-	0,000	0,000
Perlakuan 2	0,000	0,000	0,000	-	0,000
Perlakuan 3	0,879	0,000	0,000	0,000	-

Dari hasil uji beda Post Hoc Tuckey, didapatkan hasil antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan 1 memiliki hasil yang tidak signifikan yang menunjukkan tidak adanya pengaruh pemberian ekstrak Buah Maja pada dosis perlakuan 1 terhadap skor integritas epitel. Sedangkan nilai komparasi antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan 2 dan 3 menunjukkan nilai yang signifikan menunjukkan adanya pengaruh pemberian ekstrak Buah Maja terhadap skor integritas epitel. Nilai signifikansi dari kontrol negatif terhadap perlakuan 3 juga menunjukkan hasil yang tidak signifikan, dalam hal ini dapat diartikan bahwa pemberian ekstrak Buah Maja dengan dosis perlakuan 3 memberikan hasil skor integritas epitel yang mendekati kontrol negatif.

5.2.4 Uji Korelasi Pearson Kelompok Kontrol dan Perlakuan Terhadap

Integritas Epitel

Hasil uji korelasi Pearson didapatkan nilai signifikansi (P-value) = 0.000 ($p < 0.05$) dan koefisien korelasi (r-value) = -0.921. Nilai ini dapat diartikan adanya korelasi yang signifikan ($P = 0.000$) antara variabel independen (dosis ekstrak Buah Maja) dan variabel dependen (integritas epitel). Koefisien korelasi Pearson (r) bernilai negatif (-) yang berarti korelasi berbanding terbalik yaitu semakin tinggi dosis ekstrak Buah Maja yang diberikan maka semakin rendah skor integritas epitel.



Gambar 5.3 Grafik Scatter Hubungan antara Skor Ulkus Lambung Tikus dengan Dosis Ekstrak Buah Maja



5.2.5 Uji Regresi Linier

Uji regresi linier dilakukan untuk menganalisis besarnya pengaruh antara variabel independen (dosis ekstrak Buah Maja) dengan variabel dependen (skor integritas epitel), jika dibandingkan dengan faktor eksternal (Contoh : lingkungan, suhu, hormon, dan lain-lain). Nilai R^2 (R Square) pada penelitian ini menunjukkan bahwa 84.5% ($R^2 \times 100\%$) dari variabel integritas epitel dipengaruhi oleh variabel independen yaitu pemberian ekstrak Buah Maja, sedangkan 15.5% variabel integritas epitel dipengaruhi oleh faktor eksternal.



BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk menganalisa apakah dampak yang ditimbulkan oleh ekstrak *Aegle marmelos* terhadap kerusakan epitel mukosa lambung pada tikus *Rattus norvegicus* yang diinduksi dengan indometasin secara histopatologis. Ekstrak *Aegle marmelos* memiliki kandungan zat-zat yang dapat bekerja sebagai antioksidan dan antiinflamasi salah satu contohnya ialah flavonoid. Kandungan flavonoid sudah dibuktikan secara ilmiah, namun untuk kandungan yang dibutuhkan untuk bekerja secara optimal masih belum banyak diteliti. Dikarenakan hal itu, maka penelitian ini menggunakan hewan coba sebagai dasar untuk mengetahui dosis optimal pemberian ekstrak *Aegle marmelos* dan untuk selanjutnya digunakan penelitian penggunaan pada manusia.

Gastritis yang merupakan adanya inflamasi pada lambung merupakan penyakit yang sering ditemukan pada masyarakat. Pada gastritis, sekresi asam lambung dan pepsin berlebihan dan tidak mampu dinetralisir oleh mukosa lambung sehingga timbul inflamasi. Selain dari oversekresi pepsin dan asam lambung ada penyebab lain seperti penggunaan obat golongan *Non Steroid Antiinflammatory Drugs* (NSAIDs), infeksi bakteri *Helicobacter pylori*, konsumsi makanan pedas, kopi, atau alkohol, merokok. Keluhan yang timbul akibat adanya gastritis seperti nyeri perut, mual, muntah, penurunan nafsu makan (Kandulski *et al*, 2008; Katzung, 2011; Rubin, 2012)

Golongan obat *Non Steroid Antiinflammatory Drugs* (NSAIDs) memiliki mekanisme kerja dengan cara menghambat enzim siklooksigenase (COX),

menyebabkan konversi asam arakidonat menjadi Prostaglandin (PG) menjadi terganggu. Enzim siklooksigenase sendiri memiliki 2 isoform yaitu COX 1 dan COX 2, COX 1 sendiri memiliki sifat sitoprotektif dari prostasiklin yang dihasilkannya. Akibat penggunaan NSAIDs menghambat kerja dari COX 1 sehingga terjadi penurunan proteksi pada mukosa lambung, diikuti dengan peningkatan difusi asam lambung dan pepsin. Akibat dari penurunan proteksi mukosa lambung menyebabkan timbulnya inflamasi pada lambung dan bisa menjadi lebih parah hingga terjadi ulkus lambung. (Katzung, 2011; Knights, 2013; Fowler, 2017)

Ekstrak buah *Aegle marmelos* memiliki kandungan flavonoid yang dapat digunakan sebagai antiinflamasi, antioksidan, anti-bakteri, selain flavonoid buah *Aegle marmelos* memiliki kandungan sopheride yang berfungsi sebagai antioksidan (Morling, 2018; Mat Ali, 2010). Dikarenakan kandungan tersebut, penelitian ini bertujuan membuktikan adanya reduksi dari kedalaman lesi pada mukosa lambung tikus *Rattus norvegicus* strain wistar yang diinduksi dengan indometasin dan diamati secara histopatologis pada integritas sel epitel mukosa lambung dan dinilai menggunakan modifikasi skoring epitel Barthel Manja (Manja, 2003).

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimental dengan menggunakan subjek penelitian hewan coba tikus *Rattus norvegicus* strain wistar sebanyak 25 ekor yang dibagi kedalam 5 kelompok. Kelompok penelitian terbagi menjadi 5 kelompok penelitian yang terdiri atas kontrol negatif, kontrol positif, dan 3 kelompok perlakuan dengan dosis ekstrak *Aegle marmelos* tiap perlakuan yang berbeda, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Pemberian indometasin diberlakukan pada kelompok kontrol positif dan perlakuan 1, 2, dan 3

dengan dosis induksi indometasin sebesar 30 mg/kgBB, dan pada kelompok perlakuan 1,2, dan 3 diberikan secara per oral ekstrak *Aegle marmelos* dengan dosis masing masing secara berurutan 50 mg/kgBB untuk kelompok perlakuan 1, selanjutnya 100 mg/kgBB untuk kelompok perlakuan 2, dan 200 mg/kgBB untuk kelompok perlakuan 3.

Variabel independen pada penelitian ini adalah dosis ekstrak buah *Aegle marmelos* dengan skor integritas epitel mukosa lambung tikus menjadi variabel dependen. Pemberian indometasin dan ekstrak buah *Aegle marmelos* dilakukan per oral karena target organ adalah lambung yang merupakan bagian sistem pencernaan dan dikarenakan tingginya absorpsi pada saluran pencernaan tikus khususnya pada lambung di kisaran 90%. Pemuaan tikus dilakukan agar tercipta lingkungan yang optimal pada lambung tikus dalam menilai efek indometasin, dimana ekskresi asam klorida (HCL) muncul secara maksimal dan adanya pengosongan pada lambung tikus.

Dari data hasil penelitian, didapatkan nilai skor rata-rata dari masing masing kelompok penelitian. Menilik data skor rata-rata didapatkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antara kontrol positif dengan kelompok perlakuan 1, sedangkan perbandingan antara kontrol positif dengan kelompok perlakuan 2 didapatkan perbedaan yang cukup signifikan dan perbandingan antara kontrol positif dengan kelompok perlakuan 3 didapatkan hasil yang signifikan. Dari perbandingan dapat kita simpulkan pemberian ekstrak buah *Aegle marmelos* dengan dosis 50 mg/kgBB (perlakuan 1) tidak terlalu menimbulkan efek terhadap penurunan kerusakan epitel mukosa lambung tikus, sedangkan pemberian ekstrak buah *Aegle marmelos* dengan dosis 100 mg/kgBB (perlakuan 2) menimbulkan efek yang cukup besar terhadap penurunan kerusakan epitel

mukosa lambung tikus, dan pada pemberian ekstrak buah *Aegle marmelos* dengan dosis 200 mg/kgBB (perlakuan 3) menimbulkan efek yang besar terhadap penurunan kerusakan epitel mukosa lambung tikus. Kembali menilik ke data skor rata-rata didapatkan perbedaan yang tidak signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan 3, dari perbandingan ini dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak *Aegle marmelos* dengan dosis 200 mg/kgBB menimbulkan efek yang signifikan dalam menurunkan kerusakan epitel mukosa lambung tikus hingga mendekati nilai normal (kontrol negatif).

Beberapa uji analisis data dilakukan menggunakan data hasil penelitian, salah satunya yaitu Uji *Korelasi Pearson* yang menunjukkan hasil koefisien korelasi data negatif yang sangat kuat ($r = - 0.921$). Arti dari nilai koefisien korelasi tersebut adalah semakin meningkatnya dosis ekstrak buah *Aegle marmelos* yang diberikan, maka semakin minimal kerusakan epitel yang didapati pada mukosa lambung tikus. Dan pada uji regresi linear didapatkan peranan pemberian dosis ekstrak buah *Aegle marmelos* (variabel independen) berperan sebesar 84.5 % terhadap skor integritas epitel lambung (variabel dependen) dibandingkan dengan pengaruh faktor faktor eksternal yang hanya berperan 15.5 % yang didapat dari faktor faktor lain dalam memengaruhi pengurangan kerusakan epitel yang bisa disebabkan oleh imunitas tubuh tikus yang berbeda beda dan kandungan zat zat aktif lain yang terkandung dalam ekstrak buah *Aegle marmelos*. Flavonoid dan sopheride yang terkandung dalam ekstrak buah *Aegle marmelos* bekerja sebagai antiinflamasi dan antioksidan, adanya antioksidan menyebabkan penyembuhan alami dari dalam tubuh semakin cepat karena berkurangnya kadar stres oksidatif yang muncul saat timbulnya lesi. Dari sini dapat disimpulkan bahwa ekstrak buah *Aegle marmelos* terbukti mampu

mengurangi kerusakan epitel mukosa lambung pada tikus *Rattus norvegicus*

strain Wistar yang diinduksi indometasin dan diamati secara histopatologis.

Menilik hasil penelitian, bisa disimpulkan pemberian dosis ekstrak buah

Aegle marmelos dengan dosis 100 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB dapat

menimbulkan penurunan skor integritas epitel mukosa lambung tikus secara

optimal bila dibandingkan dengan bila hanya diberi dosis ekstrak buah *Aegle*

marmelos sebesar 50 mg/kgBB. Namun penelitian ini masih memiliki

keterbatasan dalam menginterpretasikan keadaan ulserasi sebenarnya secara

histopatologi dikarenakan peneliti tidak berkonsultasi dengan dokter Patologi

Anatomi. Saran yang dapat digunakan pada penelitian selanjutnya adalah

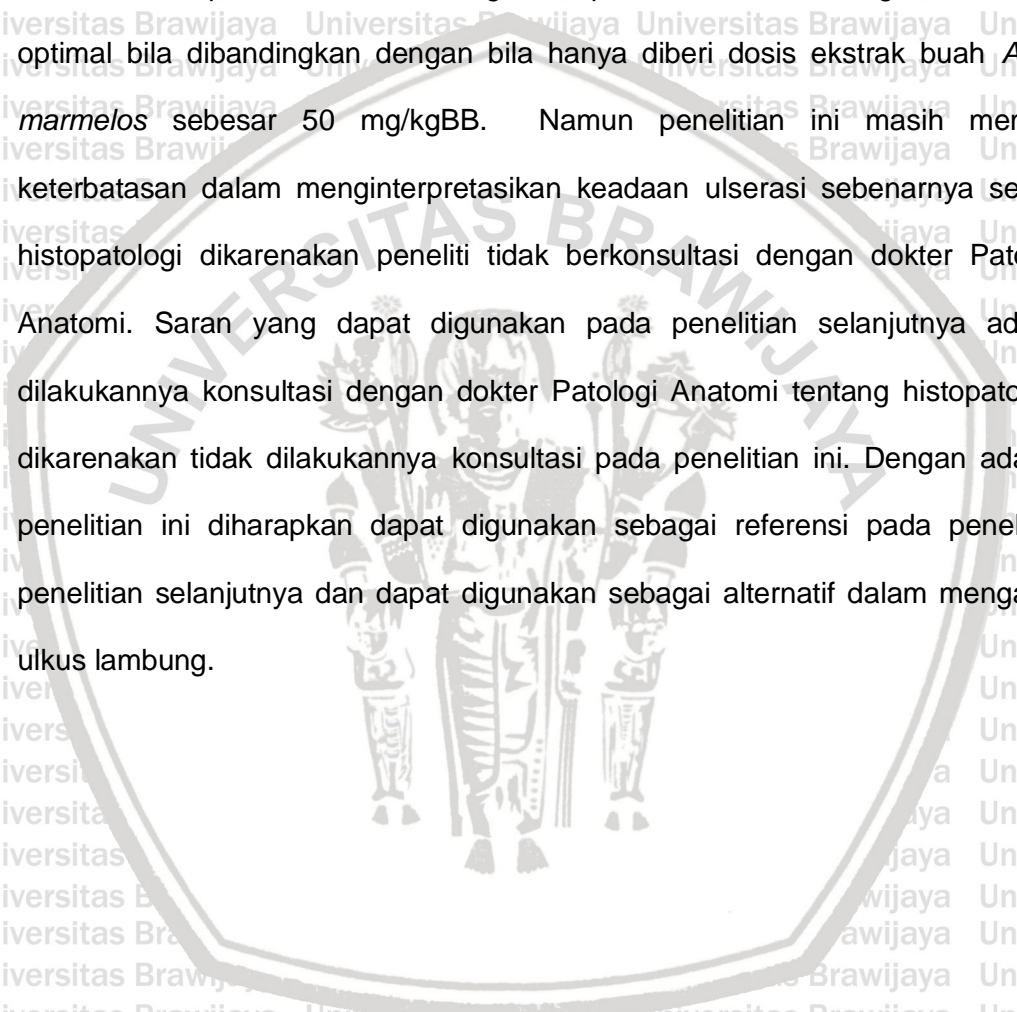
dilakukannya konsultasi dengan dokter Patologi Anatomi tentang histopatologi,

dikarenakan tidak dilakukannya konsultasi pada penelitian ini. Dengan adanya

penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai referensi pada penelitian

penelitian selanjutnya dan dapat digunakan sebagai alternatif dalam mengatasi

ulkus lambung.



BAB 7**PENUTUP****7.1 KESIMPULAN**

1. Pemberian ekstrak buah *Aegle marmelos* dengan dosis 50 mg/kgBB, dan 100 mg/kgBB dapat mengurangi kerusakan epitel mukosa lambung tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar yang diinduksi indometasin.
2. Pemberian ekstrak buah *Aegle marmelos* dengan dosis 200 mg/kgBB dapat mengurangi kerusakan epitel mukosa lambung secara optimal pada tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar yang diinduksi indometasin.

7.2 SARAN

Berdasar penelitian ini, didapatkan beberapa saran yang dianjurkan untuk penelitian selanjutnya :

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang manfaat ekstrak buah *Aegle marmelos* selain untuk mengurangi kerusakan epitel mukosa lambung,
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk menilai efek samping dan dosis yang aman pada penggunaan ekstrak buah *Aegle marmelos* secara per-oral pada manusia,
3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang dosis optimal ekstrak buah *Aegle marmelos* terhadap penurunan kerusakan epitel mukosa lambung.

DAFTAR PUSTAKA

Abbas A.B.; Lichtman A.H. (2009). "Ch.2 Innate Immunity". In Saunders (Elsevier). *Basic Immunology. Functions and disorders of the immune system (3rd ed.)*. ISBN 978-1-4160-4688-2.

Al-Saeed, A., (2011). "Gastrointestinal and cardiovascular risk of nonsteroidal anti-inflammatory drugs." *Oman medical journal*, 26(6), p.385.

Arul, V., Miyazaki, S. and Dhananjayan, R., (2005). "Studies on the anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of the leaves of *Aegle marmelos* Corr." *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1-2), pp.159-163.

Bainbridge, D., Cheng, D.C., Martin, J.E., Novick, R. and Evidence-Based Perioperative Clinical Outcomes Research (EPiCOR) Group, (2006). "NSAID-analgesia, pain control and morbidity in cardiothoracic surgery." *Canadian Journal of Anesthesia*, 53(1), pp.46-59.

Bhat S (2013). "SRB's Manual of Surgery". p. 364. ISBN 9789350259443.

Bhogal, R.H., Athwal, R., Durkin, D., Deakin, M. and Cheruvu, C.N., (2008). "Comparison between open and laparoscopic repair of perforated peptic ulcer disease." *World journal of surgery*, 32(11), pp.2371-2374.

Boulpaep, Walter (2009). "Medical Physiology. Philadelphia: Saunders." pp. 898–899. ISBN 978-1-4160-3115-4.

Buer JK (Oct 2014). "Origins and impact of the term 'NSAID': flammopharmacology." *22 (5): 263–7*. doi:10.1007/s10787-014-0211-2. hdl:10852/45403. PMID 25064056.

Calicut Medical College (2014). "Department of Pathology, Calicut Medical College"

Dorland's (2012). "Dorland's Illustrated Medical Dictionary (32nd ed.)". Elsevier. p. 777. ISBN 978-1-4160-6257-8.

Izzi, V., Masuelli, L., Tresoldi, I., Sacchetti, P., Modesti, A., Galvano, F. and Bei, R., (2012). "The effects of dietary flavonoids on the regulation of redox inflammatory networks. *Front Biosci (Landmark Ed)*", 17(7), pp.2396-2418.

Kamalakkannan, N. and Prince, P.S.M., (2005). "The effect of *Aegle marmelos* fruit extract in streptozotocin diabetes: a histopathological study. *Journal of herbal pharmacotherapy*", 5(3), pp.87-96.

Kesari, A.N., Gupta, R.K., Singh, S.K., Diwakar, S. and Watal, G., (2006). "Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of *Aegle marmelos* seed extract in normal and diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 107(3), pp.374-379."

Knights, Kathleen.(2013) "Defining the COX Inhibitor Selectivity of NSAIDs: Implications for Understanding Toxicity". Web MD LLC. Retrieved 17 February 2013.

Lanas A, Chan FK (August 2017). "Peptic ulcer disease". *Lancet*. 390 (10094): 613–624. doi:10.1016/S0140-6736(16)32404-7. PMID 28242110.

Laphookhieo, S., Phungpanya, C., Tantapakul, C., Techa, S., Tha-in, S. and Narmdorkmai, W., (2011). "Chemical constituents from *Aegle marmelos*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(1), pp.176-178."

Leontiadis, G.I., Sreedharan, A., Dorward, S., Barton, P., Delaney, B., Howden, C.W., Orhewere, M., Gisbert, J., Sharma, V.K., Rostom, A. and Moayyedi, P., (2007). "Systematic reviews of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of proton pump inhibitors in acute upper gastrointestinal bleeding."

Manja B., et al, (2003). "Pretreatment of Mice with Streptomycin Provides a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Colitis Model That Allows Analysis of Both Pathogen and Host", (Online), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC153285/>), diakses 24 Februari 2017).

Megayanti, DewaAyu (2014) "Efek Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) Terhadap Kedalaman Lesi Mukosa Lambung yang Diamati Secara Mikroskopis pada Tikus *Rattus norvegicus* Strain Wistar yang Diinduksi Indometasin". Sarjana thesis, Universitas Brawijaya.

Muhartono, Fiana DN, Kurrahman GN. (2013). "Efek perlindungan Madu Terhadap Kerusakan Lambung Tikus yang Diberi Etanol." Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

Najm WI (September 2011). "Peptic ulcer disease". Primary Care. 38 (3): 383–94, vii. doi:10.1016/j.pop.2011.05.001. PMID 21872087.

Nithya Deva Krupa, A. and Raghavan, V., (2014). "Biosynthesis of silver nanoparticles using *Aegle marmelos* (Bael) fruit extract and its application to prevent adhesion of bacteria: a strategy to control microfouling." Bioinorganic chemistry and applications, 2014.

Orskov C, Holst JJ, Knuhtsen S, Baldissera FG, Poulsen SS, Nielsen OV. (2009). "Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas". Endocrinology. 1986;119:1467–1475.

Panda, S. K., Sahu, U. C., Behera, S. K., & Ray, R. C. (2014). "Bio-processing of bael [*Aegle marmelos* L.] fruits into wine with antioxidants". Food Bioscience, 5, 34-41.

Pathologyatlas.ro. (2019). "Chronic peptic ulcer". [online] Available at: <http://www.pathologyatlas.ro/chronic-peptic-ulcer.php> [Accessed 25 Dec. 2019].

Paxton, S., Knibbs, A. and Peckham, M. (2019). "The Leeds Histology Guide." [online] Histology.leeds.ac.uk. Available at: <https://www.histology.leeds.ac.uk/digestive/stomach.php>

Rafaniello, C., Ferrajolo, C., Sullo, M.G., Sessa, M., Sportiello, L., Balzano, A., Manguso, F., Aiezza, M.L., Rossi, F., Scarpignato, C. and Capuano, A., (2016). "Risk of gastrointestinal complications associated to NSAIDs, low-dose aspirin and their combinations: Results of a pharmacovigilance reporting system." Pharmacological research, 104, pp.108-114.

Rasadah Mat Ali; Zainon Abu Samah; Nik Musaadah Mustapha; Norhara Hussein (2010). "Aegle marmelos (L.): In ASEAN Herbal and Medicinal Plants (page 107)" (PDF). Jakarta, Indonesia: Association of Southeast Asian Nations. p. 43. ISBN 978-979-3496-92-4. Archived (PDF) from the original on 12 June 2017

Richard M. Gore; Marc S. Levine. (2007). "Textbook of Gastrointestinal Radiology. Philadelphia, PA.: Saunders. ISBN 978-1-4160-2332-6.

Rossi, S. ed. (2006). "Australian medicines handbook 2006." Adelaide: Australian Medicines Handbook Pty Ltd. ISBN 978-0-9757919-2-9.

Saladin Kenneth S. (2007) "Anatomy & physiology the unity of form and function." Dubuque, IA: McGraw-Hill

Shargel, L. dan Yu, A.B.C., (1999). "*Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, 4th ed.*" Appleton & Lange, New York.

Singh, G. and Triadafilopoulos, G., (1999). "*Epidemiology of NSAID induced gastrointestinal complications.*" *The Journal of rheumatology.*

Supplement, 56, pp.18-24.

Soffers, J.H., Hansen, D., Sinagoga, K.L., Li, B., Martin, M.G., Wells, J., Grompe, M. and Li, L., (2016). "*Stem Cells and Regeneration in the Digestive System: Keystone Meeting. Gastroenterology, 151(3), pp.e6-e9.*"

Steinberg KP (June 2002). "*Stress-related mucosal disease in the critically ill patient: risk factors and strategies to prevent stress-related bleeding in the intensive care unit*". *Critical Care Medicine.* 30 (6 Suppl): S362-4. doi:10.1097/00003246-200206001-00005. PMID 12072662.

Tarigan, P. (2001). "*Tukak Gaster dalam Ilmu Penyakit Dalam Jilid II.*" Slamet Suyono (Editor). Jakarta: Balai Penerbit FKUI. Hal 132-138.

Tarigan, P., (2009). "*Tukak Gaster*". Dalam: Sudoyo, A. W., Setiyohadi, B., Alwi, I., Simadibrata, M., Setiati, S., (eds). *Buku Ajar Ilmu Penyakit Ilmu Dalam Edisi V Jilid I.* Jakarta: Pusat Penerbitan Ilmu Penyakit Dalam.

The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK). (November 27, 2013). "*Gastritis*". Archived from the original on 6 March 2015. Retrieved 1 March 2015.