

**EKSTRAK PEGAGAN MENINGKATKAN EKSPRESI BASIC-FIBROBLAST
GROWTH FACTOR DAN TIDAK MEMPENGARUHI SRY-RELATED HMG BOX 2
PADA TIKUS MODEL ULKUS PEPTIKUM**

TESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister



Oleh:

dr. Iffa Aulia Hakim
NIM: 136070100011029

PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK

**PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

HALAMAN PERSETUJUAN

TESIS

EKSTRAK PEGAGAN MENINGKATKAN EKSPRESI BASIC-FIBROBLAST
GROWTH FACTOR DAN TIDAK MEMPENGARUHI SRY-RELATED HMG BOX 2
PADA TIKUS MODEL ULKUS PEPTIKUM

Oleh:

dr. Iffa Aulia Hakim

NIM : 136070100011029

Menyetujui:

Pembimbing I,

Pembimbing II,

Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes

dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, Sp.M

NIP. 195505121987012001

NIP. 196701231996011001

Penguji I,

Penguji II,

Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA.

Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes

NIP. 195011161980021001

NIP. 197511252005012001



KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT atas segala rahmat dan curahan nikmat yang telah diberikan-Nya, Sholawat serta salam bagi junjungan kita nabi besar Muhammad SAW., sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis yang berjudul **“EKSTRAK PEGAGAN MENINGKATKAN EKSPRESI BASIC-FIBROBLAST GROWTH FACTOR DAN TIDAK MEMPENGARUHI SRY-RELATED HMG BOX 2 PADA TIKUS MODEL ULKUS PEPTIKUM”**.

Begitu banyak dukungan dan perhatian yang penulis dapatkan selama penyusunan tesis ini berlangsung, sehingga hambatan yang ada dapat dilalui dan dihadapi dengan lancar. Oleh karena itu, dengan penuh kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

1. Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes, pembimbing pertama yang telah memberikan bimbingan dan ilmu yang berharga sejak proses awal pembuatan hingga tesis ini selesai.
2. dr. Hidayat Sujuti, Sp.M, Ph.D, selaku pembimbing kedua yang telah memberikan bimbingan, saran, dan masukan, serta ilmu yang sangat berharga dan bermanfaat bagi penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.
3. Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA sebagai penguji pertama yang saran dan masukannya sangat saya perlukan guna perbaikan tesis ini.
4. Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes, selaku penguji kedua yang memberikan begitu banyak masukan untuk tesis ini kedepannya.
5. Segenap anggota tim pengelola Tesis Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, seluruh tenaga pengajar Program Studi Ilmu Biomedik serta tenaga kerja laboratorium ilmu biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

6. Secara khusus penghargaan, rasa hormat, dan terima kasih yang tak terhingga penulis persembahkan kepada kedua orang tua tercinta ayahanda Lukman Hakim dan ibunda Zaida Mustafa yang telah membesarkan, mendidik dan mendoakan dengan segala kasih sayangnya. Adik Shabrina, Shaqilla Aulia Hakim dan keluarga besar yang selalu mendukung dan memberikan segenap perhatiannya.
7. Penyemangat dari Allah yang telah dikirimkan untuk menemani saya dalam suka dan duka, pengarah dan pemberi motivasi yang tak pernah ada hentinya menyemangati dan memberikan dukungan dengan penuh kasih sayang, suami tercinta Muhammad Iqbal dan putri tercinta Azzura Iqbal Basagili.
8. Teman-teman terbaik dr. Fahimma, dr. Dinda Zahra, dr. Firda Aushi, dr. Yosephine Adisti, dr. Yurike Mandrasari, dr. Hemas Abidatul, dan Provisia Marthalita, S.KG yang telah menemani, membantu dan menyemangati sehingga tesis ini dapat terselesaikan.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tesis ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu

Penulis mengetahui bahwa penulisan tesis ini masih memiliki banyak kekurangan, oleh sebab itu kritik dan saran yang bersifat membangun dari pembaca sangat diperlukan demi kesempurnaan karya tulis ini. Penulis berharap tesis ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Malang, 11 Desember 2018

Penulis

RINGKASAN

Iffa Aulia Hakim, 136070100011029, Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Ekstrak Pegagan Meningkatkan Ekspresi *Basic-Fibroblast Growth Factor* dan Tidak Mempengaruhi *Sry-Related HMG Box 2* pada Tikus Model Ulkus Peptikum. Komisi Pembimbing Ketua: Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes, Anggota: dr. Hidayat Sujuti, Sp.M, Ph.D.

Ulkus peptikum adalah lesi luka yang dalamnya mencapai seluruh lapisan mukosa dan muskularis mukosa lambung. Penyakit ini sering terjadi di seluruh dunia dan salah satu penyebabnya adalah akibat penggunaan *non-steroidal anti-inflammatory drug* (NSAID) jangka panjang. NSAID juga mampu menghambat proses penyembuhan ulkus. Saat terjadi ulkus, tubuh memiliki mekanisme penyembuhan ulkus yang diinisiasi oleh peningkatan *growth factor* salah satunya yaitu *basic fibroblast growth factor* (bFGF) dan dilanjutkan dengan regenerasi dan perbaikan epitel yang melibatkan *stem cell* lambung dengan salah satu markernya adalah Sox2 (*sex-determining region Y/SRY-related HMG box*). *Madecassoside* dan *asiaticoside* adalah bahan aktif di dalam ekstrak *Centella asiatica*, memiliki aktivitas penyembuhan luka dengan meningkatkan angiogenesis dan menghambat proses inflamasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi bFGF dan Sox-2 pada lambung *Rattus novergicus* model ulkus peptikum yang diinduksi dengan indomethasin. Penelitian ini dilakukan pada bahan biologis lambung yang telah tersimpan dari hewan coba tikus (*Rattus novergicus*) model ulkus peptikum, dengan cara diinduksi indometasin dosis 30 mg/kgBB dan diberikan perlakuan ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*). Sampel terbagi dalam enam kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif hari pertama, kelompok kontrol positif hari kedelapan, kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 yaitu tikus yang mendapatkan ekstrak pegagan dengan dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB selama 7 hari dengan frekuensi 1x/hari. Sampel biologis tersebut kemudian dilakukan imunohistokimia untuk menilai ekspresi bFGF dan Sox-2, data dianalisa dengan Kruskal Wallis ($p < 0,05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak pegagan mampu meningkatkan ekspresi bFGF pada sel epitel lambung tikus ($p = 0,007$). Pemberian ekstrak pegagan dengan dosis 200 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB meningkatkan ekspresi bFGF pada sel epitel lambung secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif hari ke-8 ($p = 0,048$ dan $p = 0,002$). Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak *Centella asiatica* mampu membantu penyembuhan ulkus peptikum dengan meningkatkan ekspresi bFGF pada sel epitel lambung yang penting untuk angiogenesis, proliferasi, dan migrasi sel epitel. Sedangkan ekspresi Sox-2 menunjukkan tidak adanya peningkatan secara signifikan pada kelompok perlakuan. Hal ini diduga akibat waktu pengamatan dan perlakuan yang terlalu singkat sehingga belum cukup waktu untuk mempengaruhi ekspresi Sox-2 sebagai salah satu marker *stem cell* atau proses penyembuhan ulkus terjadi melalui proliferasi sel epitel mukosa dan tidak melibatkan sel punca/*stem cell*.

Kata kunci: Ekstrak Ethanol Pegagan (*Centella asiatica*), Ulkus Peptikum, Indomethasin, bFGF, Sox-2, Penyembuhan Ulkus

SUMMARY

Iffa Aulia Hakim, 136070100011029, Magister of Biomedical Sciences Medical Faculty Brawijaya University Malang. *Centella asiatica* Extract Increased Expression of bFGF but not Sox-2 in Peptic Ulcer Model in Rats Induced by Indomethacin. Advisory Chairman Supervisor: Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes, Member: dr. Hidayat Sujuti, Sp.M, Ph.D.

Peptic ulcer is a lesion that reaches the entire mucous and muscularis layers of the gastric mucosa. This disease often occurs throughout the world and one of the etiology is the use of long-term non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). NSAIDs are also able to inhibit the ulcer healing process. When an ulcer occurs, ulcer healing mechanism is initiated by increasing growth factors, one of which is basic fibroblast growth factor (bFGF) and followed by regeneration and repair of epithelium involving gastric stem cells with one of the markers Sox2 (sex-determining region Y / SRY-related HMG box). Madecassoside and asiaticoside are active ingredients in *Centella asiatica* extract, which have wound healing activity by increasing angiogenesis and inhibiting the inflammatory process. The purpose of this study was to determine the effect of pegagan extract (*Centella asiatica*) on bFGF and Sox-2 expression in the stomach *Rattus novergicus* model of peptic ulcer induced by indomethacin. This research was carried out with gastric biological material that had been stored from experimental rats (*Rattus novergicus*) model of peptic ulcer, by indomethacin induced by 30 mg/kg and given ethanol extract of *Centella asiatica*. The sample were divided into six groups consisting of negative control group, positive control group on the first day, positive control group on the eighth day, treatment group 1, 2 and 3 who got pegagan extract at dose of 100 mg/kg, 200 m/kg and 300 mg/kg for 7 days with a frequency of 1x/day. The biological samples were then immunohistochemically assessed for bFGF and Sox-2 expression, the data were analyzed by Kruskal Wallis ($p < 0.05$). The results showed that pegagan extract was able to increase bFGF expression in rat gastric epithelial cells ($p = 0.007$). Administration of pegagan extract with dose of 200 mg/kg and 400 mg/kg significantly increased the expression of bFGF in gastric epithelial cells compared to the positive control group on the 8th day ($p = 0.048$ and $p = 0.002$). These results indicated that *Centella asiatica* extract could help ulcer healing by increasing bFGF expression in gastric epithelial cells through the angiogenesis, proliferation, and migration epithelial cell. On the other hand the Sox-2 expression in indomethacin-induced peptic ulcer rats after *Centella asiatica* extract were not increased compared to positive control group rats. This is presumably due to the observation and treatment that is too short so that there is not enough time to influence the expression of Sox-2 as a stem cell marker or the role of stem cells in this study is not needed so that the ulcer healing process occurs only through the proliferation of mucous epithelial cells not involving stem cell activity

Keywords: Ethanol Extract of Pegagan (*Centella asiatica*), Peptic Ulcer, Indomethasin, bFGF, Sox-2, Ulcer Healing.

DAFTAR ISI

Halaman Judul i

Halaman Pengesahan ii

Kata Pengantar iii

Ringkasan v

Summary vi

Daftar Isi vii

Daftar Tabel x

Daftar Gambar xi

Daftar Singkatan xii

Daftar Lampiran xiv

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang 1

1.2 Rumusan Masalah 3

1.3 Tujuan Penelitian 3

 1.3.1 Tujuan Umum 3

 1.3.2 Tujuan Khusus 4

1.4 Manfaat Penelitian 4

 1.4.1 Manfaat Akademik 4

 1.4.2 Manfaat Praktis 4

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lambung 5

 2.1.1 Anatomi dan Histologi Lambung 5

 2.1.2 Mekanisme Pertahanan Mukosa Lambung 8

 2.1.2.1 Mekanisme Pertahanan Mukosa Lambung Lokal 8

 2.1.2.2 Mekanisme Pertahanan Mukosa Lambung Melalui Regulasi Neurohormonal 12

2.2 Ulkus Peptikum 12

 2.2.1 Definisi dan Etiologi Ulkus Peptikum 12

 2.2.2 Patofisiologi Ulkus Peptikum yang Diinduksi NSAID 14

 2.2.3 Manifestasi Klinis dan Diagnosis Ulkus Peptikum 17

 2.2.4 Tatalaksana Ulkus Peptikum 18

2.3 NSAID dan Penyembuhan Ulkus Gaster 20

2.4 *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) 23

2.5 *Sox2 (sex-determining region Y/SRY-related HMG box)* 25

2.6 Pegagan (*Centella asiatica*) 26

 2.6.1 Deskripsi dan Morfologi Tanaman Pegagan 26

 2.6.2 Kandungan dan Manfaat 27



BAB III KERANGKA KONSEP dan HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep 30

3.2 Hipotesis Penelitian 32

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian 33

4.2 Sampel Penelitian 33

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian 33

 4.3.1 Tempat Penelitian 33

 4.3.2 Waktu Penelitian 34

4.4 Variabel Penelitian 34

 4.4.1 Variabel Independen 34

 4.4.2 Variabel Dependen 34

4.5 Alat dan Bahan Penelitian 34

 4.5.1 Bahan Penelitian 34

 4.5.2 Alat Penelitian 34

4.6 Definisi Operasional 35

4.7 Prosedur Penelitian 36

 4.7.1 Imunohistokimia 36

4.8 Skema Prosedur Penelitian 38

4.9 Pengumpulan Data 38

4.10 Analisis Data 39

BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1 Perbedaan Ekspresi bFGF pada Lambung Tikus Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan Pemberian Ekstrak Ethanol Pegagan (*Centella asiatica*) 40

5.2 Perbedaan Ekspresi Sox-2 pada Lambung Tikus Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan Pemberian Ekstrak Ethanol Pegagan (*Centella asiatica*) 44

BAB VI PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Ethanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi bFGF pada Lambung Tikus Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan Model Ulkus Peptikum yang Diinduksi Indomethasin 46

6.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Ethanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi Sox-2 pada Lambung Tikus Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan Model Ulkus Peptikum yang Diinduksi Indomethasin 48

6.3 Implikasi di Bidang Kedokteran 50

BAB VII PENUTUP

7.1 Kesimpulan 51

7.2 Saran 52



DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN



DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Rerata Ekspresi bFGF pada Lambung Tikus 42



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Bagian Bagian dari Lambung 5

Gambar 2.2 Anatomi dan Histologi Tipikal dari Lambung Mamalia 6

Gambar 2.3 Mikroanatomi Unit Gaster pada Korpus 8

Gambar 2.4 Gambaran Skematis Pertahanan Mukosa Gaster 10

Gambar 2.5 Patofisiologi Ulkus Gaster yang Diinduksi oleh NSAID Non Selektif 17

Gambar 2.6 Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) 27

Gambar 4.1 Skema Prosedur Penelitian 38

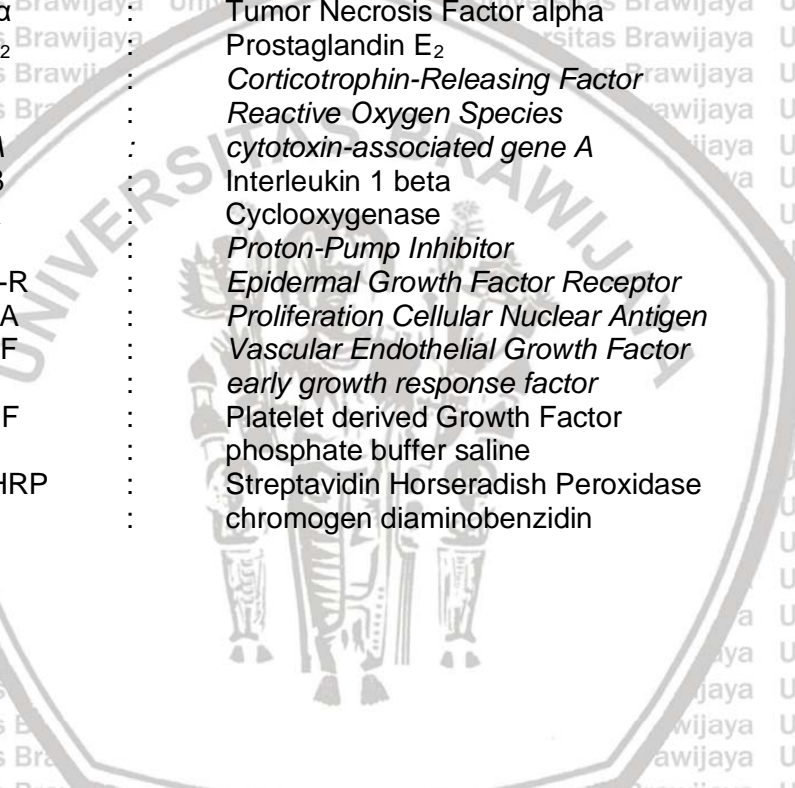
Gambar 5.1 Hasil Pengecatan Immunohistokimia yang Menunjukkan Ekspresi bFGF pada Lambung Tikus Berbagai Kelompok Perlakuan (Perbesaran 400x) 40

Gambar 5.2 Grafik Rerata Ekspresi bFGF pada Lambung Tikus Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan Pemberian Ekstrak Ethanol Pegagan (*Centella asiatica*) 42

Gambar 5.3 Hasil Pengecatan Immunohistokimia yang Menunjukkan Ekspresi Sox-2 pada Lambung Tikus Berbagai Kelompok Perlakuan (Perbesaran 400x) 44

DAFTAR SINGKATAN

bFGF	:	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
Sox2	:	<i>sex-determining region Y/SRY- related HMG box</i>
NSAID	:	<i>non-steroidal anti-inflammatory drug</i>
H&E	:	<i>Haemotoxylin and Eosin</i>
TFF	:	<i>Trefoil Factor Family</i>
TGFβ	:	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
IGF	:	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
EGF	:	<i>Epidermal Growth Factor</i>
NO	:	<i>Nitric Oxide</i>
PGI ₂	:	<i>Prostaglandin I₂/ Prostasiklin</i>
TNFα	:	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
PGE ₂	:	<i>Prostaglandin E₂</i>
CRF	:	<i>Corticotrophin-Releasing Factor</i>
ROS	:	<i>Reactive Oxygen Species</i>
cagA	:	<i>cytotoxin-associated gene A</i>
IL-1β	:	<i>Interleukin 1 beta</i>
COX	:	<i>Cyclooxygenase</i>
PPI	:	<i>Proton-Pump Inhibitor</i>
EGF-R	:	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
PCNA	:	<i>Proliferation Cellular Nuclear Antigen</i>
VEGF	:	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Egr1	:	<i>early growth response factor</i>
PDGF	:	<i>Platelet derived Growth Factor</i>
PBS	:	<i>phosphate buffer saline</i>
SA-HRP	:	<i>Streptavidin Horseradish Peroxidase</i>
DAB	:	<i>chromogen diaminobenzidin</i>



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Statistik 61

Lampiran 2. Persetujuan Etik Penelitian 64

Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian 65

Lampiran 4. Bukti Submit dan Accepted Jurnal 68



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ulkus peptikum adalah lesi luka yang dalamnya mencapai seluruh lapisan mukosa dan muskularis mukosa lambung dan duodenum (Amandeep *et al.*, 2012). Terdapat dua tipe ulkus peptikum, yang pertama adalah ulkus gaster, yaitu adanya luka pada permukaan lambung dan ulkus duodenal yang terkait dengan sekresi asam lambung yang berlebih. Saat terjadi ulkus, tubuh memiliki mekanisme penyembuhan ulkus yang merupakan proses kompleks dan berkelanjutan (Sung *et al.*, 2009).

Ulkus peptikum merupakan penyakit yang sering terjadi di seluruh dunia dan komplikasinya mampu menyebabkan masalah klinis yang serius (Sverden, 2017). Sebenarnya lambung memiliki kemampuan untuk bertahan dari paparan faktor yang berbahaya melalui mekanisme protektif (Laine *et al.*, 2008). Saat mekanisme protektif mulai tidak lagi mampu mengimbangi paparan faktor yang berbahaya, terbentuklah ulkus peptikum. Beberapa etiologi telah diidentifikasi terlibat dalam terjadinya ulkus peptikum, salah satu yang tersering adalah akibat penggunaan *non-steroidal anti-inflammatory drug* (NSAID) jangka panjang (Musumba *et al.*, 2009; Amandeep *et al.*, 2012). Obat ini tidak hanya mampu menyebabkan efek perlukaan pada mukosa gaster, namun juga menghambat proses penyembuhan ulkus (Musumba *et al.*, 2009).

NSAID seperti aspirin dan indometasin seringkali digunakan untuk pengobatan artritis, inflamasi dan proteksi kardiovaskular. Penggunaan NSAID dalam jangka waktu lama dapat menyebabkan komplikasi pada traktus gastrointestinal seperti ulkus dan erosi mukosa dengan merusak barrier sel epitel lambung (Tomisato *et al.*, 2004; Laine *et al.*, 2008). NSAID juga menghambat

baik fase awal yang penting untuk memperbaiki lesi superfisial maupun fase lanjutan dari proliferasi sel dan angiogenesis yang menyebabkan terlambatnya penyembuhan ulkus (Musumba *et al.*, 2009).

Proses penyembuhan ulkus merupakan proses perbaikan jaringan oleh dirinya sendiri setelah terbentuk lesi. Tahapannya berkelanjutan dan dapat dibagi dalam beberapa fase yaitu hemostasis, inflamasi, proliferasi dan remodelling (Syam *et al.*, 2009). Proses penyembuhan ulkus diinisiasi dengan peningkatan ekspresi *growth factor* salah satunya adalah bFGF yang mampu menstimulasi proliferasi sel epitel dan angiogenesis dengan meningkatkan reinervasi pembuluh darah mikro yang baru terbentuk sehingga penting untuk proses penyembuhan ulkus gaster (Ernst *et al.*, 2001). bFGF telah terdeteksi pada beberapa kompartemen mukosa gastrointestinal, utamanya pada sel epitel superfisial di sepanjang traktus gastrointestinal, di lamina basalis dan maktriks ekstraseluler (Ernst *et al.*, 1994).

Proses penyembuhan ulkus lambung diikuti dengan regenerasi oleh *stem cell*. Pada lambung *stem cell* ini dapat ditemukan di istmus dengan salah satu markernya adalah Sox2 (*sex-determining region Y/SRY-related HMG box*) (Kim & Shivdasani, 2016). Sox2 diekspresikan dalam epitel kelenjar lambung dan dari penelitian dengan menelusuri secara genetic didapatkan bahwa sel yang mengekspresikan Sox2 mampu membentuk seluruh tipe sel yang membangun unit gaster (Que *et al.*, 2007). Sox2 memiliki fungsi sebagai pengatur yang penting dari pemeliharaan *stem cell*, diferensiasi akhir sel dan mengontrol homeostasis dan regenerasi jaringan (Arnold *et al.*, 2011).

Centella asiatica atau yang sering dikenal sebagai pegagan adalah tanaman berbatang pendek dan menjalar yang diketahui memiliki berbagai efek fisiologis dan dapat digunakan untuk penyembuhan luka (Shetty *et al.*, 2006).

Madecassoside dan asiaticoside adalah bahan aktif di dalam ekstrak *Centella*

asiatica, memiliki aktivitas penyembuhan luka dengan meningkatkan pembentukan kolagen dan angiogenesis, juga mampu menghambat proses inflamasi dan memperbaiki permeabilitas kapiler (Incandela *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2004). Penelitian sebelumnya telah meneliti kemampuan *Centella asiatica* dalam membantu penyembuhan luka insisi, luka bakar, luka terkait diabetes, dan dermatitis akut (Somboonwong *et al.*, 2012). Oleh karena manfaatnya terhadap penyembuhan luka dari ekstrak tumbuhan pegagan, maka peneliti ingin mengamati efek penyembuhan ulkus dari ekstrak tumbuhan pegagan (*C. asiatica*) terhadap mukosa lambung tikus *Rattus norvegicus* strain wistar yang diinduksi Indometasin dengan melihat ekspresi bFGF dan Sox2 pada mukosa lambung tikus.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Apakah pemberian ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) pada tikus *Rattus norvegicus* model ulkus gaster dapat membantu penyembuhan ulkus pada mukosa gaster dengan meningkatkan ekspresi bFGF dan Sox2?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) terhadap penyembuhan ulkus gaster pada tikus *Rattus norvegicus*

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Mengetahui ekspresi bFGF pada tikus *Rattus norvegicus* model ulkus gaster setelah pemberian ekstrak pegagan (*Centella asiatica*)

1.3.2.2 Mengetahui ekspresi Sox2 pada tikus *Rattus norvegicus* model ulkus gaster setelah pemberian ekstrak pegagan (*Centella asiatica*)

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Akademis

Menambah informasi dasar mengenai manfaat terapeutik *Centella asiatica* pada kondisi ulkus gaster

1.4.2 Manfaat Praktis

Memberikan informasi dasar untuk alternatif terapi ulkus gaster dengan menggunakan tanaman herbal *Centella asiatica*

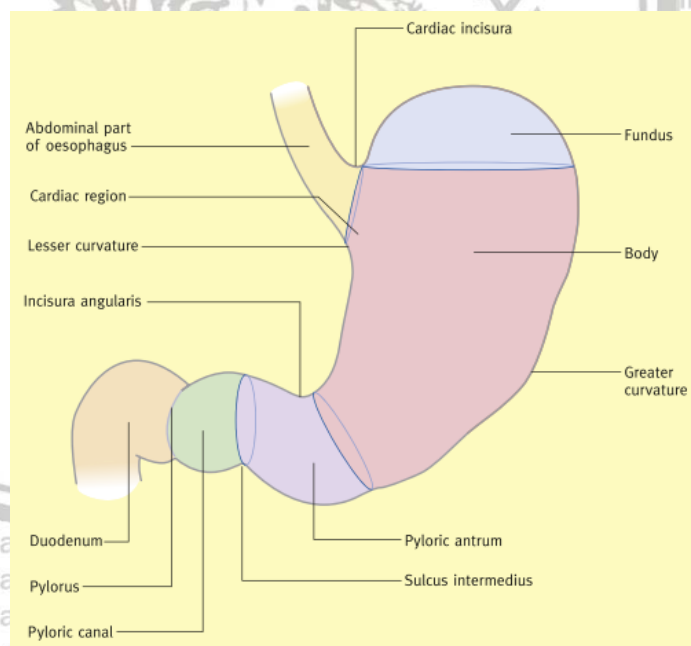


BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lambung

2.1.1 Anatomi dan Histologi Lambung

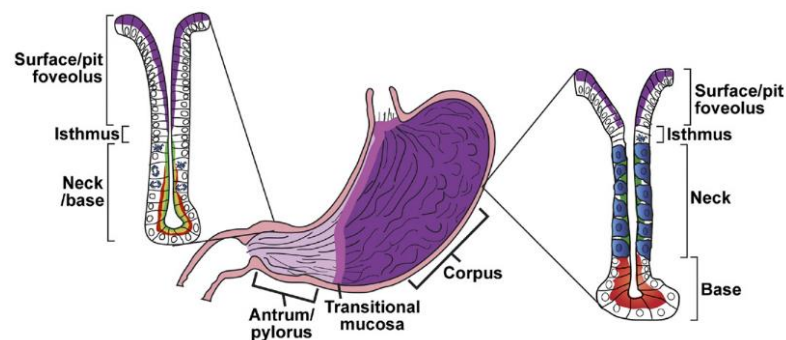
Lambung merupakan bagian yang paling lebar dari saluran pencernaan (traktus gastrointestinal) mulai dari esofagus sampai duodenum dan berfungsi sebagai tempat penampungan makanan untuk dicerna menjadi *chyme* dan mengatur pengaliran hasil cerna menuju usus kecil. Kapasitas lambung kurang lebih 1,5 liter, tetapi dapat dilebarkan hingga 2-3 liter. Pada bayi yang baru lahir kapasitasnya sekitar 30 cc. Lambung terletak di regio hipokondria kiri, epigastrika dan umbilikalisis. Bentuk umum lambung adalah bentuk-J dengan pars pylorica sedikit naik ke atas ke pylorus (Widjaja, 2007).



Gambar 2.1 Bagian-Bagian dari Lambung. Bagian utama dari lambung meliputi fundus, korpus dan pylorus (Mahadevan, 2017)

Lambung mempunyai dua lubang (ostium cardiacum dan pylorus), dua lengkungan (kurvatura mayor dan minor) dan dua permukaan (facies anterior dan posterior). Lambung terdiri dari lima bagian, yaitu kardia, fundus, korpus, pars

pylorica, dan pylorus. Kardia merupakan daerah tempat masuknya esofagus ke dalam lambung. Fundus yang berbentuk kubah merupakan bagian lambung yang berada di atas kiri dan ostium cardiacum. Corpus gastricum yang merupakan bagian utama, terletak kurang lebih vertical (sedikit ke arah depan kanan) antara fundus dan incisura angularis beralih menjadi pars pylorica. Curvatura minor yang merupakan batas kanan lambung terbentang dari cardia sampai pylorus. Curvatura mayor yang lebih besar terbentang dari incisura cardiaca terus ke fundus dan pinggir kiri lambung sampai pylorus (Soybel, 2005). Pada curvature minor di batas antara corpus dengan pars pylorica terbentuk sudut yang disebut incisura angularis. Sudut ini tampak lebih jelas pada lambung bentuk-J. Pars pylorica terdiri dari antrum pyloricum yang lebar di sebelah proksimal dan canalis pyloricus yang lebih sempit di sebelah distalis yang berakhir pada pylorus. Pada batas antara kedua bagian ini kadang-kadang terdapat suatu sulkus dangkal. Pylorus merupakan daerah terdapatnya penyempitan berupa sphincter yang umumnya berada dalam keadaan kontraksi tonik. Sphincter pylori mempunyai otot sirkularis tebal (muskulus sphincter pylori) yang mengatur/mengontrol aliran isi lambung ke duodenum (Mahadevan, 2017).

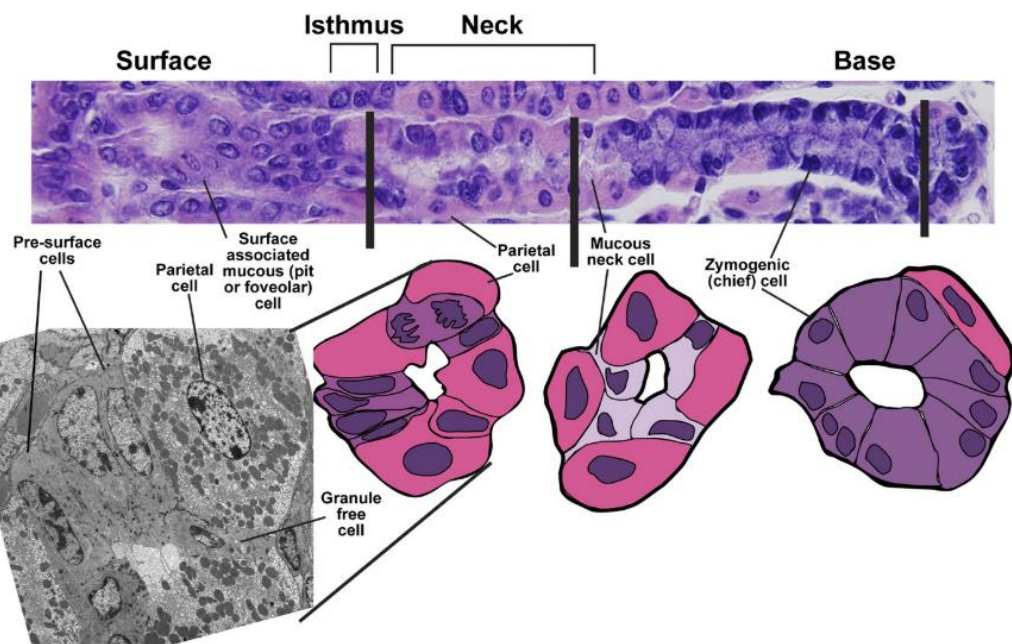


Gambar 2.2 Anatomi dan Histologi Tipikal dari Lambung Mamalia. Epitel korpus terbentuk dari unit gaster yang memiliki beberapa tipe sel, yang mana sel yang mensekresi asam berwarna biru, sel zimogenik/chief cell berwarna merah, sel mucus leher berwarna hijau dan sel pit-yang mensekresikan mukus paling dekat dengan permukaan berwarna ungu (Mills & Shivdasani, 2011).

Inspeksi umum memperlihatkan 4 daerah lambung yaitu kardia, fundus, korpus dan pylorus. Karena struktur fundus dan korpus identic secara mikroskopis, hanya 3 daerah yang dikenali secara mikroskopis. Mukosa lambung terdiri atas epitel permukaan yang berlekuk lekuk ke dalam lamina propria membentuk sumur lambung/foveola gastrica. Lamina propria lambung terdiri dari jaringan ikat longgar yang disusupi sel otot polos dan sel limfoid. Yang memisahkan mukosa dari submukosa dibawahnya ada selapis otot polos, yaitu muskularis mukosa (Junqueira & Carneiro, 2007).

Kardia adalah suatu pita melingkar yang sempit dengan lebar 1,5-3 cm pada batas antara lambung dan esofagus. Mukosanya mengandung kelenjar kardia tubular simpleks atau bercabang. Bagian terminal kelenjar ini sering bergelung dengan lumen yang besar. Kebanyakan sel sekresinya menghasilkan mucus dan lisozim (Junqueira & Carneiro, 2007).

Lamina propria fundus dan korpus dipenuhi dengan kelenjar gaster (fundus) tubular bercabang. Bagian leher kelenjar mengandung sel induk/*stem cell*, sel mucus leher, dan sel parietal (oksintik), dasar kelenjar mengandung sel parietal, sel zymogen (*chief cell*) dan sel enteroendokrin. Sel-sel induk berbentuk silindris rendah dengan inti lonjong di dekat dasar sel, ditemukan di bagian leher, namun jumlahnya hanya sedikit. Sel ini memperlihatkan banyak gambaran mitosis (Junqueira & Carneiro, 2007).



Gambar 2.3 Mikroanatomi Unit Gaster pada Korpus. (Di atas) Unis gaster tipikal pada tikus, yang dicat menggunakan H&E, dengan lumen gaster di sebelah kiri dan otot pada sebelah kanan. Di bawah adalah potongan transversal dari isthmus (nampak adanya sel yang sedang membelah), leher dan dasar. (Mills & Shivdasani, 2011)

Selain mukosa, lambung memiliki lapisan submukosa yang terdiri dari jaringan ikat padat yang mengandung pembuluh darah dan pembuluh limfe, lapisan ini disebut sel-sel limfoid, makrofag, dan sel mast. Lapisan muskularis terdiri atas serabut otot polos yang tersusun dalam 3 arah utama. Lapisan luar tersusun longitudinal, lapisan tengah tersusun sirkular, dan lapisan dalam tersusun oblik. Di pylorus, lapisan tengah sangat menebal membentuk sfingter pylorus. Lambung dilapisi oleh selapis tipis serosa (Junqueira & Carneiro, 2007).

2.1.2 Mekanisme Pertahanan Mukosa Lambung

2.1.2.1 Mekanisme Pertahanan Mukosa Lambung Lokal

Pertahanan mucus-bikarbonat-fosfolipid adalah pertahanan mukosa lini pertama. Pertahanan ini terbentuk dari gel mukus, bikarbonat dan surfaktan fosfolipid yang melapisi permukaan mukosa. Lapisan bikarbonat ini disekresikan oleh epitel permukaan untuk mempertahankan lingkungan yang netral (pH~7,0) pada permukaan sel epitel dan mencegah penetreasi pepsin dan pencernaan

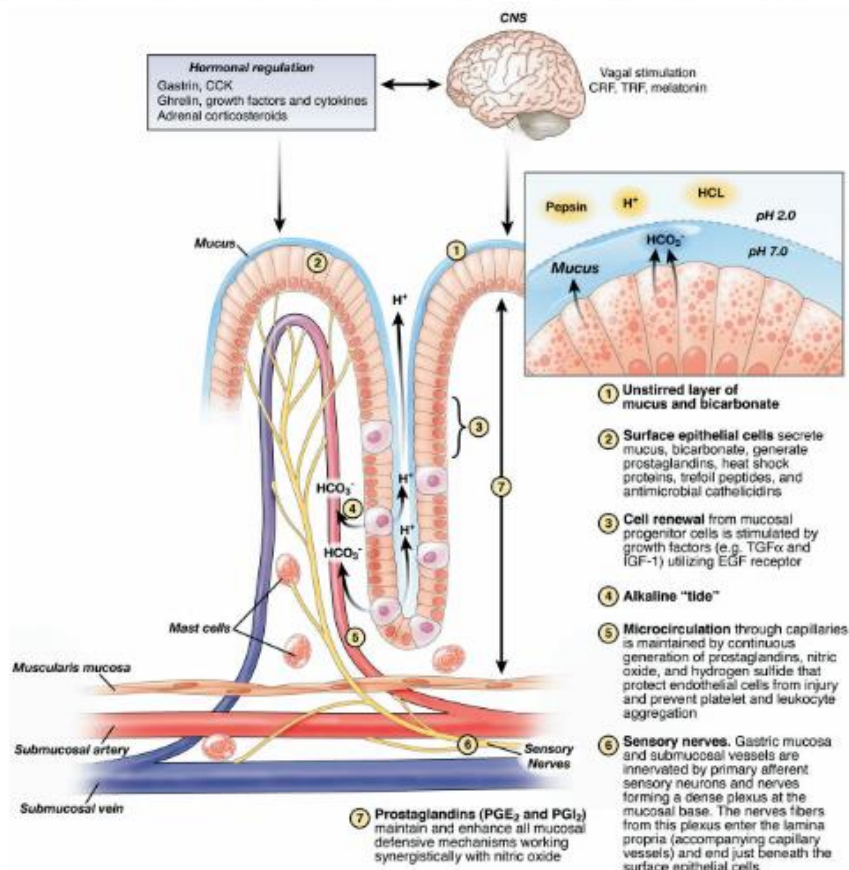
oleh proteolitik pada epitel permukaan (Allen & Flemström, 2005). Gel mukus mengandung fosfolipid dan permukaan lumen juga dilapisi oleh surfaktan fosfolipid yang memiliki sifat hidrofobik yang kuat (Atuma *et al.*, 2001). Pertahanan ini hanyalah pertahanan preepitel diantara lumen dan epitel. Saat pertahanan ini tidak lagi mampu atau dirusak akibat penyakit tertentu, maka mekanisme pertahanan lainnya akan bekerja (Laine *et al.*, 2008).

Pertahanan selanjutnya adalah lapisan epitel permukaan yang mana mampu mensekresikan mukus, bikarbonat, membentuk prostaglandin, *heat shock protein*, *trefoil factor family peptide* (TFF) dan *cathelicidin*. Sel saling berhubungan oleh *tight junction*, sehingga mampu menjadi pertahanan yang mencegah pertahanan balik dari asam dan pepsin (Allen & Flemström, 2005). Heat shock protein dibentuk oleh sel epitel gaster sebagai respon terhadap stress, seperti peningkatan temperatur, stres oksidatif dan agen sitotoksik. Kerjanya adalah menghambat denaturasi dan melindungi sel dari injuri. Cathelicidin dan β defensin adalah peptida kationik yang berperan dalam sistem imun innate pada permukaan mukosa untuk mencegah kolonisasi bakteri. Sel epitel permukaan mensekresi TFF yang meregulasi proses re-epitelisasi dan menunjukkan proteksinya terhadap mukosa (Taupin & Podolsky, 2003).

Sel-sel pada lambung memiliki kemampuan untuk melakukan pembaharuan dari sel mukosa progenitor untuk mempertahankan integritas mukosa. Sel epitel terus menerus diperbaharui melalui proses proliferasi yang terkoordinasi dengan baik dan terkontrol oleh sel progenitor yang berfungsi untuk mengganti sel epitel permukaan yang rusak atau tua. Pada kelenjar gaster, terdapat sel induk yang mengalami pembelahan untuk membentuk sel progenitor yang selanjutnya berdiferensiasi menjadi sel epitel (Modlin *et al.*, 2003). Proses regenerasi mukosa lambung ini dibagi menjadi dua mekanisme, yang pertama adalah proses yang disebut restitusi atau pemulihan, dimulai dalam hitungan

menit melalui migrasi dari sel epitel yang terletak di area leher kelenjar gaster.

Selanjutnya diikuti proses regenerasi yang berkelanjutan melalui diferensiasi dan proliferasi sel induk dan sel progenitor dalam waktu hari hingga bulan (Hoffmann, 2008).



Gambar 2.4 Gambaran Skematis Pertahanan Mukosa Gaster. (1) Lapisan mukus dan bikarbonat, (2) Sel epitel permukaan yang mensekresikan mukus, bikarbonat, membentuk prostaglandin, *heat shock protein*, peptida trefoil, dan *cathelicidin* antimikroba (3) Pembaharuan sel dari sel progenitor yang distimulasi growth factor (TGF- α dan IGF-1) dengan menggunakan reseptor EGF (4) *Alkaline tide* (5) Mikrosirkulasi melalui kapiler dipertahankan dengan pembentukan prostaglandin, nitric oxide dan hidrogen sulfida berkelanjutan yang melindungi sel endotel dari perlukaan dan mencegah agregasi platelet dan leukosit (6) Saraf sensorik. Pembuluh darah mukosa dan submukosa gaster diinervasi oleh saraf sensorik aferen primer dan saraf membentuk pleksus pada dasar mukosa. Serabut saraf dari pleksus ini memasuki lamina propria (bersama dengan pembuluh darah kapiler) dan berakhir tepat dibawah sel epitel permukaan (Laine *et al.*, 2008)

Pada gaster juga ditemukan terdapat kondisi yang disebut sebagai *alkaline tide* yang mana terjadi akibat sel parietal yang terstimulasi mensekresikan asam hidroklorida menuju lumen kelenjar gaster secara

bersamaan juga mensekresikan bikarbonat ke dalam interstisial dan lumen pembuluh darah. Bikarbonat ini diangkut menuju basal dari epitel permukaan dan lumen gaster yang mana akan membentuk lapisan mukus dan bikarbonat (Laine *et al.*, 2008).

Mikrosirkulasi mukosa penting untuk mengantarkan oksigen dan nutrisi juga untuk mengangkut substansi toksik. Pada muskularis mukosa, kebanyakan arteri bercabang menjadi kapiler yang mana akan memasuki lamina propria dan menuju epitel kelenjar gaster. Pada dasar sel epitel permukaan, kapiler berubah menjadi venula (Guth, 1992). Sel endotel yang melapisi pembuluh darah mikro membentuk vasodilator kuat seperti nitric oxide (NO) dan prostasiklin (PGI₂) yang melindungi mukosa gaster dari perlukaan dan melawan vasokonstriktor mukosa seperti leukotrien C₄, tromboksan A₂ dan endotelin. PGI₂ dan NO mempertahankan viabilitas sel endotel dan mencegah perlekatan platelet dan leukosit pada endotel mikrovaskular (Laine *et al.*, 2008). Selain itu juga terdapat hidrogen sulfida yang memiliki kemampuan proteksi mukosa dengan menurunkan ekspresi *tumor necrosis factor* α (TNF- α), menurunkan perlekatan leukosit pada endotel vaskular, mencegah NSAID yang mampu menyebabkan perlukaan pada mukosa gaster (Fiorucci *et al.*, 2005).

Pembuluh darah mukosa dan submukosa gaster diinervasi oleh saraf sensori aferen primer dan membentuk pleksus pada dasar mukosa. Serabut saraf dari pleksus ini memasuki lamina propria (bersama dengan pembuluh darah kapiler) dan berakhir tepat dibawah sel epitel permukaan. Saraf ini mengenali isi lumen dan/atau masuknya asam ke dalam mukosa melalui *acid-sensing channel*. Aktivasi saraf ini secara langsung mempengaruhi tonus arteri submukosa, yang mana akan meregulasi aliran darah mukosa (Laine *et al.*, 2008).

Mekanisme pertahanan yang terakhir adalah pembentukan PGE₂ dan PGI₂ yang berkesinambungan oleh mukosa yang penting untuk mempertahankan integritas mukosa dan memberikan perlindungan terhadap zat yang menyebabkan ulkus ataupun nekrosis (Kemmerly & Kaunitz, 2014). Hampir seluruh mekanisme pertahanan gaster distimulasi dan atau difasilitasi oleh prostaglandin. Prostaglandin mampu menghambat sekresi asam, menstimulasi mukus, bikarbonat, sekresi fosfolipid, meningkatkan aliran darah mukosa dan mempercepat restitusi epitel dan penyembuhan mukosa (Brzozowski *et al.*, 2005).

2.1.2.2 Mekanisme Pertahanan Mukosa Lambung Melalui Regulasi Neurohormonal

Selain adanya mekanisme pertahanan mukosa gaster lokal, pertahanan juga diregulasi oleh sistem saraf pusat dan faktor hormonal. Aktivasi vagal sentral meningkatkan mucus dan pH intraseluler dari lambung tikus dan jalur sinyal *corticotrophin-releasing factor* (CRF) sentral terlibat dalam respon endokrin dan visceral terhadap stress (Chatzaki *et al.*, 2006). Mekanisme yang terkait CRF perifer juga ikut berkontribusi pada perubahan yang diinduksi stress pada motilitas usus dan fungsi mukosa. Reseptor CRF2 terdapat pada lambung manusia yang berperan protektif dengan mencegah apoptosis. Aktivasi dari reseptor CRF di perifer dan sel mast merupakan mekanisme yang penting yang terlibat dalam perubahan terkait stress dari fisiologi usus (Kaneko *et al.*, 2002). Juga, aktivasi dari reseptor opioid sentral meningkatkan mekanisme pertahanan lambung (Gyires *et al.*, 2001).

2.2 Ulkus Peptikum

2.2.1 Definisi dan Etiologi Ulkus Peptikum

Ulkus peptikum adalah lesi sedalam seluruh lapisan mukosa dan muskularis mukosa yang terdapat di sepanjang lambung atau duodenum. Ulkus

peptikum diketahui disebabkan oleh adanya ketidakseimbangan antara faktor agresif seperti asam hidroklorida (HCl), pepsin, refluks asam empedu, leukotriene, *reactive oxygen species* (ROS) dan faktor pertahanan yaitu lapisan mucus-bikarbonat, prostaglandin, aliran darah mukosa, kemampuan pembaharuan dan migrasi sel, antioksidan non-enzimatik dan enzimatik dan beberapa *growth factor* (Amandeep *et al.*, 2012). Infeksi *Helicobacter pylori* dan penggunaan *nonsteroidal anti-inflammatory drug* (NSAID) adalah penyebab tersering dari ulkus peptikum.

H. pylori adalah penyebab utama ulkus pada lambung. *H. pylori* adalah bakteri basilus Gram negatif, motil, mikroaerofilik, berflagel dan berbentuk spiral (Majumdar *et al.*, 2011). *H. pylori* strain tipe I memiliki aktivitas patogenik, yang mengkode protein efektor *cytotoxin-associated gene A* (*cagA*). Setelah translokasi menuju sel pejamu, *cagA* mempengaruhi bentuk sel, meningkatkan motilitas sel, mengganggu hubungan antar sel sehingga aktivitas ini mampu menyebabkan terjadinya karsinoma gaster dan ulkus peptikum (Buti *et al.*, 2011). Infeksi *H. pylori* menyebabkan peningkatan sitokin tertentu seperti TNF- α , IL-1 β , infiltrasi leukosit polimorfonuklear, limfosit, monosit dan sel plasma di lamina propria dan intraepitel. Penggunaan regimen antibiotik mampu mengeradikasi infeksi dengan resolusi sempurna inflamasi mukosa dan memberikan peluang yang minimal untuk terjadinya rekurensi dari ulkus (Akram *et al.*, 2010).

Asam lambung diketahui sebagai salah satu faktor mampu menyebabkan terjadinya ulkus. Dilaporkan bahwa 50% pasien dengan ulkus gaster mengalami hipersekresi pepsin dan asam lambung (Aihara *et al.*, 2003).

Namun sebenarnya asam lambung ini memerankan peranan yang penting dalam pertahanan lambung. Asam lambung menjadi pertahanan pertama lambung untuk mencegah kolonisasi bakteri dan mengurangi kemampuannya untuk

memasuki lapisan mukosa. Asam lambung dihasilkan melalui stimulasi dari histamin, asetilkolin dan gastrin (Amandeep *et al.*, 2012).

NSAID merupakan obat yang banyak sekali digunakan, tidak hanya sebagai anti-inflamasi namun juga sebagai analgesik dan antipiretik. Sayangnya NSAID memiliki efek mampu menginduksi terjadinya ulkus gaster. Setidaknya 25% pengguna kronis NSAID mengalami ulkus gaster (Scarpignato & Hunt, 2010). Beberapa studi menjelaskan bahwa NSAID menyebabkan terjadinya ulkus dengan mempengaruhi ekspresi enzim siklooksigenase (COX) yaitu menghambat konversi asam arakhidonat menjadi prostaglandin yang mana akan mengganggu perlindungan mukosa dan pada akhirnya memberikan efek korosif akibat kerja pepsin di mukosa lambung dan terbentuklah ulkus (Whittle, 2003). Asam lambung memperburuk efek dari NSAID dengan memperdalam lesi superfisial, mengganggu dengan agregasi platelet dan proses penyembuhan ulkus (Malfertheiner *et al.*, 2009).

2.2.2 Patofisiologi Ulkus Peptikum yang Diinduksi NSAID

Nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) dapat menyebabkan perlukaan pada traktus gastrointestinal melalui efek topikal dan sistemik, yang mana efek sistemik muncul akibat sintesis prostaglandin yang dihambat melalui inhibisi enzim siklooksigenase, COX-1 dan COX-2 (Laine *et al.*, 2008). Namun, inhibisi COX bukanlah mekanisme inti dari perlukaan traktus gastrointestinal akibat NSAID dan mekanisme lain yang tidak bergantung prostaglandin juga memerankan mekanisme yang penting. Selain menyebabkan perlukaan, NSAID juga menghambat baik fase awal restitusi yang penting untuk memperbaiki perlukaan superfisial maupun fase lanjutan proliferasi sel dan angiogenesis yang pada akhirnya menyebabkan terhambatnya penyembuhan ulkus (Musumba *et al.*, 2009).

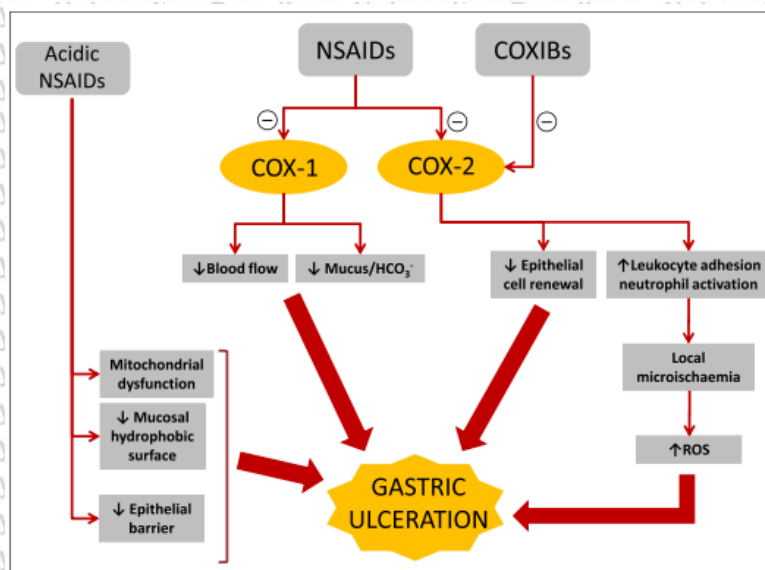
Efek topikal diinisiasi melalui erosi mukosa yang disebabkan adanya gangguan pada lapisan sel epitel gaster (Tomisato *et al.*, 2004). Kemampuan NSAID dalam menyebabkan efek topikal bergantung pada pKa (pengukuran keasaman yang juga penting untuk inhibisi enzim COX) dan kelarutannya dalam lemak (log P). Kebanyakan NSAID adalah asam organik lemah (pKa 3-5) yang mengandung grup asam monokarboksilik dalam strukturnya. Grup karboksilik dari NSAID berkontribusi secara signifikan pada kemampuan kelarutannya di air (Bjarnason *et al.*, 2007).

NSAID terakumulasi di sel epitel melalui 'ion trapping', yang selanjutnya menyebabkan fosforilasi oksidatif *uncoupling* di mitokondria dan inhibisi rantai transport elektron. Hal ini menyebabkan deplesi ATP intraseluler, toksisitas Ca^{2+} seluler dan pembentukan ROS seperti superoksida dan radikal hidroksil. ROS mampu mengoksidasi langsung protein seluler, lemak atau asam nukleat dan menyebabkan kematian sel melalui beberapa proses kaskade sinyal yang menyebabkan nekrosis dan apoptosis (Orrenius, 2007). *Uncoupling oxidative phosphorylation* juga menghilangkan potensial transmembran mitokondria dan dapat menyebabkan apoptosis melalui pelepasan sitokrom c (Nagano *et al.*, 2005). NSAID juga merusak fosfolipid membran dan meningkatkan permeabilitas dengan menginduksi perubahan pada hidrofobisitas membran, ketebalan, kelenturan dan membentuk pori (Darling *et al.*, 2004). Hal ini menyebabkan asam mampu berdifusi balik, menyebabkan kematian sel melalui apoptosis, nekrosis dan terbentuknya ulkus gaster (Lichtenberger *et al.*, 2006).

Mekanisme sistemik NSAID mampu menyebabkan ulkus gaster adalah akibat dari defisiensi prostaglandin (PG) yang dikarenakan inhibisi dari siklooksigenase (COX). Terdapat dua isoenzim, COX-1 dan COX-2. COX-1 penting berperan untuk menjaga mukosa saluran pencernaan, sedangkan COX-2 berfungsi dalam kondisi patologis seperti inflamasi. Terjadinya ulkus gaster

dikarenakan inhibisi pada COX-1 yang lebih dominan dibandingkan pada COX-2 (Takeuchi, 2012). Namun studi lain yang menggunakan inhibitor COX-1 dan COX-2 secara selektif menunjukkan bahwa efek ulkus yang timbul pada saluran pencernaan akibat NSAID bukan hanya akibat inhibisi COX-1 semata, namun juga memerlukan inhibisi dari COX-2 (Tanaka, 2002). Inhibisi dari COX-1 meningkatkan ekspresi COX-2 pada mukosa gastrointestinal dan PG yang dihasilkan oleh COX-2 membantu menjaga integritas mukosa saat terjadi defisiensi PG karena inhibisi COX-1 (Takeuchi *et al.*, 2010).

Mekanisme sistemik lainnya yaitu peranan dari hipermotilitas gaster yang dimediasi akibat inhibisi COX-1 mampu menyebabkan terjadinya ulkus pada penelitian menggunakan hewan coba. Hal ini disebabkan karena adanya restriksi aliran darah sementara menuju mukosa akibat amplitudo kontraksi yang tinggi sehingga terjadi kerusakan mikrovaskular melalui hipoksia jaringan, interaksi neutrofil endotel dan penurunan resistensi mukosa (Tanaka *et al.*, 2005). Peningkatan hipermotilitas gaster menyebabkan meningkatkan permeabilitas mukosa dan aktivitas myeloperoksidase dan munculnya lesi gaster (Tanaka, 2002). NSAID menyebabkan kerusakan pada gaster melalui inhibisi dari produksi prostaglandin yang bergantung pada COX-1 sehingga terjadi peningkatan hipermotilitas melalui sistem saraf pusat dan gangguan mikrovaskular yang disebabkan penempelan neutrofil endotel dan kerusakan akibat ROS. Karena COX-2 juga dihambat, maka tidak ada kompensasi peningkatan prostaglandin oleh COX-2 yang terjadi untuk mengimbangi efek ini (Wallace *et al.*, 2000).



Gambar 2.5 Patofisiologi Ulkus Gaster yang Diinduksi oleh NSAID Non Selektif. Obat anti inflamasi menunjukkan efek yang merugikan melalui dua mekanisme utama: inhibisi COX-1 dan COX-2 secara simultan dan efek sitotoksik topik langsung. Efek langsung ini bergantung dari struktur kimiawi NSAID. Coxib tidak memiliki efek yang berbahaya untuk mukosa lambung karena mampu menginhibisi COX-2 secara selektif, namun tidak mempengaruhi fungsi protektif COX-1. ROS: *reactive oxygen species* (Fornai *et al.*, 2011)

NSAID juga mampu menyebabkan kerusakan mukosa dengan melibatkan sel sel inflamasi seperti neutrofil dengan menggeser keseimbangan mukosa menuju pengambilan dan adhesi endothelial neutrophil sirkulasi melalui inhibisi biosintesis prostaglandin (Whittle, 2003). Sekali menempel, neutrofil menyumbat mikrovaskuler menyebabkan penurunan aliran darah mukosa secara lokal dan pelepasan faktor yang merusak jaringan, termasuk di dalamnya enzim proteolitik dan leukotriene, yang meningkatkan tonus vascular, memperburuk iskemia jaringan, menstimulasi produksi ROS, dan menyebabkan destruksi matriks intestinal yang pada akhirnya menyebabkan nekrosis jaringan fokal dengan derajat yang parah, khususnya saat pH di lumen rendah (Whittle, 2003; Jiménez *et al.*, 2004).

2.2.3 Manifestasi Klinis dan Diagnosis Ulkus Peptikum

Gejala dari ulkus peptikum umumnya tidak spesifik sehingga memiliki nilai prediktif yang rendah. Pasien dengan ulkus duodenal menunjukkan rasa lapar

dan nyeri pada perut pada malam hari. Sedangkan pasien dengan ulkus di gaster menunjukkan gejala nyeri perut tiap kali setelah makan, mual, muntah dan adanya penurunan berat badan. Bila tidak diobati, seringkali gejalanya akan muncul berulang karena adanya penyembuhan yang sifatnya spontan namun gejala masih sering muncul akibat penyebab yang tidak tertangani dengan baik (Lanas *et al.*, 2017).

Komplikasi utama dari penyakit ini adalah perdarahan dan perforasi. Perdarahan biasanya bermanifestasi sebagai melena atau hematemesis, dapat terjadi tanpa adanya gejala peringatan sebelumnya (Lanas *et al.*, 2011). Perforasi biasanya terjadi tiba-tiba dengan rasa nyeri pada perut bagian atas. Mortalitasnya dapat mencapai 20% bergantung dengan usia dan komorbiditas yang ada (Lanas & Chan, 2017).

Endoskopi adalah standar baku untuk diagnosis ulkus peptikum. Selain untuk mengeksklusi kemungkinan penyakit keganasan, deteksi infeksi *H. pylori* dengan histologi atau tes urease cepat diperlukan untuk rencana pengobatan selanjutnya (Lanas & Chan, 2017). Karena *H. pylori* adalah penyebab tersering dari ulkus peptikum, pengujian yang sifatnya non-invasif diutamakan untuk pasien muda dibawah 50-55 tahun dengan gejala dispepsia, tidak ada gejala yang membahayakan dan memiliki prevalensi infeksi *H. pylori* lebih dari 20%. Pada pasien yang lebih tua, endoskopi untuk saluran pencernaan atas lebih diutamakan untuk mengonfirmasikan penyakit (Agréus *et al.*, 2016).

2.2.4 Tatalaksana Ulkus Peptikum

NSAID adalah salah satu penyebab penting terjadinya ulkus peptikum pada negara-negara dengan pendapatan yang tinggi (Del Valle, 2015). Lebih dari 85% ulkus yang terkait dengan penggunaan NSAID sembuh dalam 6-8 minggu dengan terapi menggunakan *proton-pump inhibitor* (PPI), namun penggunaan

NSAID harus dihentikan. Penyembuhan ulkus dapat terjadi, namun akan terhambat apabila penggunaan NSAID masih dilanjutkan (Lanas *et al.*, 2017).

Terdapat beberapa cara pencegahan terjadinya ulkus pada pengguna NSAID adalah penggabungan penggunaan NSAID dengan PPI, antagonis reseptor H_2 atau misoprostol; atau substitusi penggunaan NSAID non-selektif dengan NSAID yang selektif COX-2 (Chan, 2006). PPI adalah agen profilaksis yang paling populer. Dari review sistematik dan meta-analisis didapatkan bahwa kombinasi NSAID dengan PPI memberikan proteksi yang paling baik terhadap komplikasi ulkus peptikum (Regula *et al.*, 2006).

Pencegahan ulkus peptikum dan komplikasi yang terkait pada pasien yang menggunakan NSAID memerlukan penilaian adanya faktor resiko baik pada saluran pencernaan dan juga pada kardiovaskular. Faktor resiko dinilai dengan resiko rendah atau resiko tinggi. Pasien dikatakan memiliki faktor resiko tinggi pada gastrointestinal apabila pasien berusia 60 tahun atau lebih, memiliki riwayat ulkus, atau pasien sedang dalam terapi menggunakan antiplatelet, antikoagulan, kortikosteroid, atau *selective serotonin reuptake inhibitor* (Scarpignato *et al.*, 2015). Pasien dimasukkan dalam kelompok dengan faktor resiko kardiovaskular yang tinggi apabila pasien memiliki riwayat penyakit kardiovaskular atau memiliki riwayat diabetes. Resiko kejadian kardiovaskular juga dapat dinilai menggunakan sistem skoring seperti skoring resiko Framingham atau sistem European SCORE. Pada pasien dengan resiko gastrointestinal dan kardiovaskular yang rendah dapat menggunakan NSAID yang non-selektif (Chan, 2006). Bila pasien masuk dalam kategori resiko gastrointestinal tinggi disertai resiko kardiovaskular yang rendah, maka dapat menggunakan NSAID yang non-selektif namun ditambahkan dengan PPI, atau menggunakan celecoxib ditambah dengan PPI.

Bila pasien masuk dalam kategori resiko kardiovaskular yang tinggi dengan resiko gastrointestinal yang rendah, dapat dipilih dengan menggunakan

naproksen. Bila kedua resiko tinggi maka sebaiknya tidak menggunakan NSAID atau menggunakan naproxen ditambah dengan PPI atau dengan menggunakan celecoxib dosis rendah ditambah aspirin dan PPI (Lanas *et al.*, 2017).

Kebanyakan kasus ulkus peptikum sembuh setelah 6-8 minggu. Apabila ulkus gagal sembuh, kepatuhan dalam mengonsumsi obat harus dinilai ulang.

Tes darah dan kemampuan untuk menggali anamnesa dengan lebih cermat biasanya mampu menunjukkan bahwa pasien masih secara terus menerus menggunakan NSAID sehingga menyebabkan ulkus yang berulang. Penggunaan PPI dengan dosis dua kali lipat untuk 6-8 minggu seringkali direkomendasikan.

Tes serologis juga dapat digunakan untuk mendeteksi false negatif infeksi *H. pylori* (Dore *et al.*, 2016).

2.3 NSAID dan Penyembuhan Ulkus Gaster

Secara morfologi, ulkus gaster terdiri dari dua komponen yaitu tepi ulkus yang dikelilingi oleh mukosa non-nekrotik dan dasar ulkus, mengandung jaringan granulasi yaitu jaringan ikat yang kaya akan makrofag, fibroblas dan mikrovaskular yang berproliferasi (Kumar *et al.*, 2015). Penyembuhan ulkus merupakan suatu proses yang kompleks dimana jaringan melakukan perbaikannya sendiri setelah terjadi perlukaan. Prosesnya terjadi dalam beberapa fase yang sekuensial, beberapa terjadi tumpang tindih, yaitu fase haemostasis, inflamasi, proliferasi dan remodeling (Stadelmann *et al.*, 1998).

Schmassmann menjelaskan bahwa penyembuhan ulkus dimulai dengan fase perkembangan ulkus yang dikarakteristikkan dengan nekrosis jaringan, infiltrasi inflamasi, pembentukan tepi ulkus dan perkembangan jaringan granulasi; fase penyembuhan yang termasuk di dalamnya penyembuhan awal (migrasi cepat sel epitel dan kontraksi dasar ulkus) diikuti dengan penyembuhan akhir (angiogenesis pada dasar ulkus, remodeling jaringan granulasi dan re-epitelisasi lengkap dari ulkus); fase rekonstruksi yang termasuk di dalamnya adalah

rekonstruksi kelenjar, muskularis mukos dan muskularis propria; fase maturasi yang dikarakteristikan dengan maturasi dan diferensiasi sel yang terspesialisasi (Schmassmann, 1998).

Penyembuhan ulkus diinisiasi dengan pembentukan 'zona penyembuhan', yang terdiri dari kelenjar yang berdilatasi, dimana sel akan mengalami de-diferensiasi, mengekspresikan *epidermal growth factor receptor* (EGF-R) dan mulai untuk aktif berproliferasi. Pada tahapan ini, infiltrasi inflamasi terjadi berdekatan dengan jaringan nekrotik dan ulkus. Sebagai respon dari *growth factor*, tepi ulkus terbentuk, sel yang berdekatan dengan tepi mengalami de-diferensiasi, dan jaringan granulasi terbentuk pada dasar ulkus. Selama masa penyembuhan, jaringan granulasi mengalami remodeling, kontraksi dan perubahan pada komposisi seluler, dimana sel inflamasi muncul pada awal fase penyembuhan, digantikan dengan fibroblas dan mikrovaskular pada fase penyembuhan akhir (Kumar *et al.*, 2015).

Modulasi farmakologi dengan target seluler dan molekuler yang terlibat dalam penyembuhan ulkus mampu mempengaruhi prosesnya. Pembaharuan sel di tepi ulkus dan angiogenesis ditemukan secara signifikan terganggu selama masa pemberian NSAID dengan keterlambatan proses penyembuhan secara signifikan. Sachez-Fidalgo (2004) dengan menggunakan model tikus ulkus yang diinduksi dengan asam asetat, menemukan bahwa area ulkus dikarakteristikan dengan peningkatan ekspresi bFGF dan densitas mikrovaskular pada jaringan granulasi dasar ulkus bersamaan dengan peningkatan baik sel apoptosis dan ekspresi *proliferation cellular nuclear antigen* (PCNA). Studi lain juga menemukan bahwa indometasin menghambat penyembuhan ulkus dan meningkatkan regulasi caspase-3 namun tidak dengan *proliferation cellular nuclear antigen* (PCNA) pada jaringan ulkus yang menunjukkan NSAID

mengganggu penyembuhan ulkus dengan meningkatkan apoptosis sel (Colucci *et al.*, 2009).

Prostaglandin diketahui mampu menstimulasi angiogenesis secara *in vivo* dan *in vitro*. Oleh karenanya, obat yang bekerja dengan mengambalik siklus oksigenasi seperti NSAID mampu mempengaruhi angiogenesis dalam keadaan penyembuhan ulkus gaster (Fornai *et al.*, 2011). Penelitian menunjukkan baik NSAID non-selektif dan inhibitor COX-2 selektif mampu menghambat penyembuhan ulkus gaster dengan menghambat angiogenesis pada jaringan granulasi di dasar ulkus. Indometasin dilaporkan mampu menurunkan jumlah mikrovaskular secara signifikan (>37%). Mekanisme NSAID dalam menghambat angiogenesis yaitu dengan perubahan lokal ekspresi *growth factor* angiogenik, perubahan dalam regulator kunci VEGF, peningkatan apoptosis sel endotel, menghambat migrasi sel endotel dan pengambilan sel inflamasi dan platelet (Tarnawski & Jones, 2003).

NSAID mampu menghentikan proliferasi sel endotel dengan menekan protein siklus sel karena indometasin mampu menghambat proliferasi sel endotel yang distimulasi bFGF secara signifikan dengan menurunkan *cyclin D1* dan meningkatkan ekspresi protein p21 (Pai *et al.*, 2001). Indometasin juga mampu menghambat aktivasi gen *early growth response factor* (Egr1) yang diinduksi VEGF, yang merupakan faktor transkripsi yang diaktifkan oleh hipoksia dalam angiogenesis (Szabo *et al.*, 2001). Penelitian lain juga menjelaskan bahwa NSAID non selektif mengganggu proses angiogenesis, menghambat penyembuhan ulkus dan meningkatkan serum endostatin (Ma *et al.*, 2002).

2.4 Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)

Basic fibroblast growth factor (bFGF) merupakan salah satu faktor yang paling potensial dalam menginduksi angiogenesis. Aktivitas biologis dari bFGF adalah stimulasi migrasi dan proliferasi beberapa sel mesenkim termasuk fibroblast dan sel otot polos dan juga sel endotel yang pada akhirnya mengarahkan menuju angiogenesis (Ernst *et al.*, 2001). bFGF memerankan peranan yang krusial dalam proses penyembuhan lesi mukosa karena *growth factor* ini telah terdeteksi pada beberapa kompartemen mukosa gastrointestinal, utamanya pada sel epitel superfisial di sepanjang traktus gastrointestinal, di lamina basalis dan maktriks ekstraseluler (Ernst *et al.*, 1994). Dua sistem reseptor bFGF yaitu sistem afinitas tinggi dari reseptor transmembran dan sistem afinitas rendah *heparin sulfate proteoglycan* terletak di matriks ekstraseluler (Danopoulos *et al.*, 2017).

Studi sebelumnya menerangkan bahwa pengobatan dengan rekombinan bFGF yang stabil-asam mampu menyebabkan angiogenesis yang lebih efektif dan penyembuhan luka yang lebih efektif di tikus (Szabo *et al.*, 1994). Hal ini menyebabkan munculnya hipotesa bahwa bFGF endogen mungkin ditemukan pada jaringan granulasi ulkus dan di mukosa, berperan penting untuk penyembuhan ulkus, oleh karena stimulasi angiogenesis. Lebih lanjut, pengobatan oral dengan bFGF eksogen menunjukkan adanya percepatan penyembuhan ulkus. Pengobatan ulkus duodenal dengan bFGF pada manusia juga dilaporkan berhasil dilakukan (Hull *et al.*, 1995).

Penelitian oleh Ernst *et al* (2001) menunjukkan bahwa bFGF terbentuk pada area di sekitar ulkus yang berkontribusi pada proses penyembuhan ulkus.

Mekanisme dari penyembuhan ulkus merupakan proses yang kompleks dari interaksi matriks sel, proliferasi sel, migrasi sel dan angiogenesis. Untuk angiogenesis, beberapa polipeptida seperti bFGF, angiogenin, TGF α , TGF β ,

TNF α , PDGF, dan angiotropin memerankan peranan yang penting dalam menginduksi proliferasi dan diferensiasi sel endotel (Ernst *et al.*, 1996). Dari seluruh faktor angiogenik, bFGF terkarakteristik paling baik dan ditemukan berada di traktus gastrointestinal termasuk mukosa gaster. Penggunaan oral bFGF stabil-asam Nampak mampu mempercepat penyembuhan ulkus gastroduodenal yang diinduksi asam asetat atau *cysteamine*. Hal ini menunjukkan bahwa bFGF endogen terdapat pada area ulkus dan memerankan peranan yang penting dalam penyembuhan ulkus gaster (Konturck *et al.*, 1994).

Studi yang mengamati *Helicobacter pylori* menunjukkan bahwa *H. pylori* mampu berikatan dengan bFGF dan hal ini berkontribusi dengan menurunnya ketersediaan lokal peptida ini (Ascencio *et al.*, 1995). Pada penelitian Ernst *et al.* (2001) pemberian bFGF lokal mempercepat penyembuhan ulkus gaster dan efek ini diikuti dengan supresi sekresi asam gaster dan peningkatan aliran darah gaster di area tepi ulkus. Eliminasi bFGF dari area ulkus dapat mengganggu proses penyembuhan spontan yang menyebabkan memanjangnya proses penyembuhan ulkus. bFGF memerankan peranan yang penting dalam mekanisme penyembuhan ulkus dan proses pembentukan mikrovaskular baru pada jaringan granulasi di ulkus. bFGF berkontribusi terhadap angiogenesis dengan meningkatkan reinnervasi pembuluh darah mikro yang baru terbentuk (Ernst *et al.*, 2001). Penelitian melalui metode imunohistokimia menunjukkan bahwa bFGF terdeteksi pada sel epitel permukaan (sel epitel mukosa, sel parietal, sel kelenjar basal), membrana basalis, jaringan ikat, dan muskularis mukosa (Ernst *et al.*, 1994; Satoh *et al.*, 1997).

Terdapat 2 tipe reseptor dan sistem penyimpanan yang diketahui untuk bFGF, reseptor transmembran afinitas-tinggi dan sistem reseptor afinitas-rendah, termasuk *heparin sulfate proteoglycan*. Proteoglikan adalah protein yang mengandung rantai karbohidrat dan bagian dari matriks ekstraseluler. Beberapa

proteoglikan bekerja sebagai modulator dari *growth factor*. Ikatan dari bFGF dengan heparin atau rantai heparin sulfat dari proteoglikan melindungi *growth factor* ini dari degradasi. bFGF dilepaskan oleh heparinase dari platelet yang teraktivasi atau granulosit neutrofil dan dapat dibentuk oleh proteolisis protein inti proteoglikan atau oleh degradasi parsial rantai heparin sulfat (Danopoulos *et al.*, 2017). Pada ulkus gaster yang kronis, adanya kerusakan dari barrier mukosa, menyebabkan enzim proteolitik mampu memasuki matriks ekstraseluler di lamina propria dan submucosa sehingga mengubah bFGF yang non-aktif menjadi bentuk yang aktif (Ernst *et al.*, 2001).

2.5 Sox2 (*sex-determining region Y/SRY- related HMG box*)

Penelitian protein SOX (*sex-determining region Y/SRY- related HMG box*) dimulai dari penemuan dari *testis determining factor Sry* mamalia. Protein ini mengandung *high mobility group* (HMG) yang mana menyebabkan DNA mampu berikatan dengannya. Protein yang membawa domain HMG dengan 50% atau lebih asam amino yang mirip dengan *Sry* disebut dengan protein Sox (Carrasco-Garcia *et al.*, 2016). SOX adalah famili faktor transkripsi yang dikarakteristikan mengandung domain HMG, yang memungkinkan untuk bertindak sebagai aktivator (contoh mengaktifkan gen gen untuk proliferasi sel seperti p27, p21, CCND3, dll) atau supresor gen transkripsi (contoh untuk supresi gen untuk apoptosis seperti ORAI1) (Weina & Utikal, 2014). Setidaknya terdapat 20 anggota famili ini pada manusia dan mencit, berdasarkan dari identitas sekuens HMG, dan mereka dikelompokkan dalam 8 grup (Schepers *et al.*, 2002).

SOX2 termasuk dalam subgroup SOXB1 bersama dengan gen SOX1 dan SOX3. Protein ini dibutuhkan oleh *embryonic stem cell* dan pemeliharaan embrio awal. Protein ini juga salah satu faktor yang penting untuk pemrograman akhir sel yang terdiferensiasi untuk diinduksi menjadi *pluripotent stem cell* (Avilion *et al.*, 2003). Selama masa perkembangan, Sox2 memiliki fungsi tambahan sebagai

regulator yang penting untuk pemeliharaan *stem cell* dan diferensiasi akhir dari sel. Lebih lanjut, Sox2 pada masa dewasa juga berperan untuk mengontrol keseimbangan dan regenerasi jaringan (Arnold *et al.*, 2011).

Selama masa embrionik, Sox2 banyak diekspresikan *foregut* yang sedang berkembang yang penting dalam proses pembentukan lambung. Selama masa dewasa, Sox2 diekspresikan dalam epitel kelenjar lambung dan dari penelitian dengan menelusuri secara genetik didapatkan bahwa sel yang mengekspresikan Sox2 mampu membentuk seluruh tipe sel yang membangun unit gaster (Que *et al.*, 2007). Ablasi sel Sox2 menyebabkan gangguan dari proses pembaharuan epitel gaster secara fisiologis, dan hal ini mengindikasikan pentingnya peranan Sox2 pada diferensiasi gaster (Arnold *et al.*, 2011).

2.6 Pegagan (*Centella asiatica*)

2.6.1 Deskripsi dan Morfologi Tanaman Pegagan

Tanaman pegagan (*Centella asiatica*) adalah tumbuhan kosmopolit yang tersebar di daerah tropis dan subtropis. Pegagan menyebar liar dan dapat tumbuh subur di atas tanah dengan ketinggian 100-2.500 m dpl, pada tanah lembab sampai berpasir teraungi maupun di lahan terbuka. Tanaman ini berasal dari Asia, tersebar di Asia Tenggara (termasuk Indonesia, India, Cina, Jepang, dan Australia). Tanaman pegagan merupakan genus *Centella*, famili *Umbelliferae* (*Apiaceae*), ordo *Umbellales*, kelas *Dicotyledonae*, subdivisi *Angiospermae* dan divisi *Spermatophyta* (Bermawie *et al.*, 2008)



Gambar 2.6 Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) A: Daun tanaman pegagan; B: Batang tanaman pegagan; C: Bunga tanaman pegagan (Bermawie *et al.*, 2008)

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan tumbuhan merayap yang menutupi tanah, tidak berbatang, tinggi tanaman antara 10 – 50 cm, memiliki daun satu helaian yang tersusun rapi. Daunnya berwarna hijau, berbentuk seperti kipas atau seperti ginjal, permukaan dan punggungnya licin, tepinya agak melengkung ke atas, bergerigi, dan kadang – kadang berambut. Tangkai daun berbentuk seperti pelepah, agak panjang, berukuran 5 – 15 cm tergantung kesuburan tanahnya. Jumlah tangkai bunga antara 1 – 5. Bentuk bunga bundar lonjong, cekung, dan runcing ke ujung dengan ukuran sangat kecil. Sementara itu akarnya rimpang dengan banyak *stolon* (akar membentuk rumpun), berkelompok dan lama kelamaan meluas hingga menutupi tanah, merayap dan berbuku – buku (Singh *et al.*, 2010).

2.6.2 Kandungan dan Manfaat

Kandungan aktif utama *Centella asiatica* adalah saponin (juga disebut sebagai triterpenoid), termasuk di dalamnya asiaticoside yang mana bagian tisakaridanya berkaitan dengan *aglycone asiatic acid*, *madecassoside* dan *madasiatic acid*. Saponin triterpen dan sapogeninnya penting dalam proses penyembuhan luka dan mempengaruhi vaskular dengan menghambat produksi kolagen pada tempat luka. Komponen lainnya yang diisolasi dari *Centella asiatica* adalah brahmoside dan brahminoside, yang berperan penting pada

sistem saraf pusat dan uterorelaksan namun masih belum dilakukan studi klinisnya. Ekstrak kasarnya mengandung glycosides isothankuniside dan thankuniside yang menunjukkan efek antifertility pada mencit (Heidari *et al.*, 2007). Centelloside dan derivatnya ditrmukan efektif untuk pengobatan hipertensi vena. Ekstrak tanaman secara keseluruhan mengandung sterol, flavonoid, dan komponen lain yang tidak diketahui aktivitas farmakologisnya, yaitu kaya akan tanin (20-25%), asam esensial (0,1% dengan *beta-chariophylen*, *trans-beta-pharnesen* dan *germachrene D*), *phytosterols* (*campesterol*, *sitosterol*, *stigmasterol*), *mucilages*, *resins*, asam amino bebas (*alanine*, *serine*, *aminobutyrate*, *aspartate*, *glutamate*, *lysine* dan *treonine*), flavonoid (derivates dari *chercetin* dan *kempferol*), alkaloid (*hydrochotine*), komponen pahit (*vallerine*), asam lemak (*linoleic acids*, *linolnelic*, *oleic*, *palmitic* dan *stearic acid*) (Srivastava *et al.*, 1997).

Ekstrak *Centella asiatica* secara tradisional telah dimanfaatkan untuk penyembuhan luka. Penelitian dengan menggunakan luka terbuka pada tikus menunjukkan adanya peningkatan proliferasi seluler dan sintesis kolagen pada luka. Peneliti menemukan luka yang diobati dengan ekstrak *Centella asiatica* terjadi epitelisasi yang lebih cepat dan kecepatan kontraksi luka lebih tinggi dibanding dengan luka kontrol (Brinkhaus *et al.*, 2000). Asiaticoside, salah satu unsur dalam ekstrak *Centella asiatica*, memiliki aktivitas penyembuhan luka dengan meningkatkan pembentukan kolagen dan angiogenesis. Asiaticoside juga mampu menghambat proses inflamasi yang menyebabkan terjadinya skar hipertropi dan memperbaiki permeabilitas kapiler (Incandela *et al.*, 2001).

Penelitian laboratoris juga menunjukkan bahwa ekstrak *Centella asitica* secara efektif mampu menghambat lesi gaster yang diinduksi dengan pemberian etanol (Cheng *et al.*, 2000). Peneliti menyimpulkan bahwa ekstrak *Centella asiatica* mampu memperkuat pertahanan mukosa gaster dan mengurangi efek

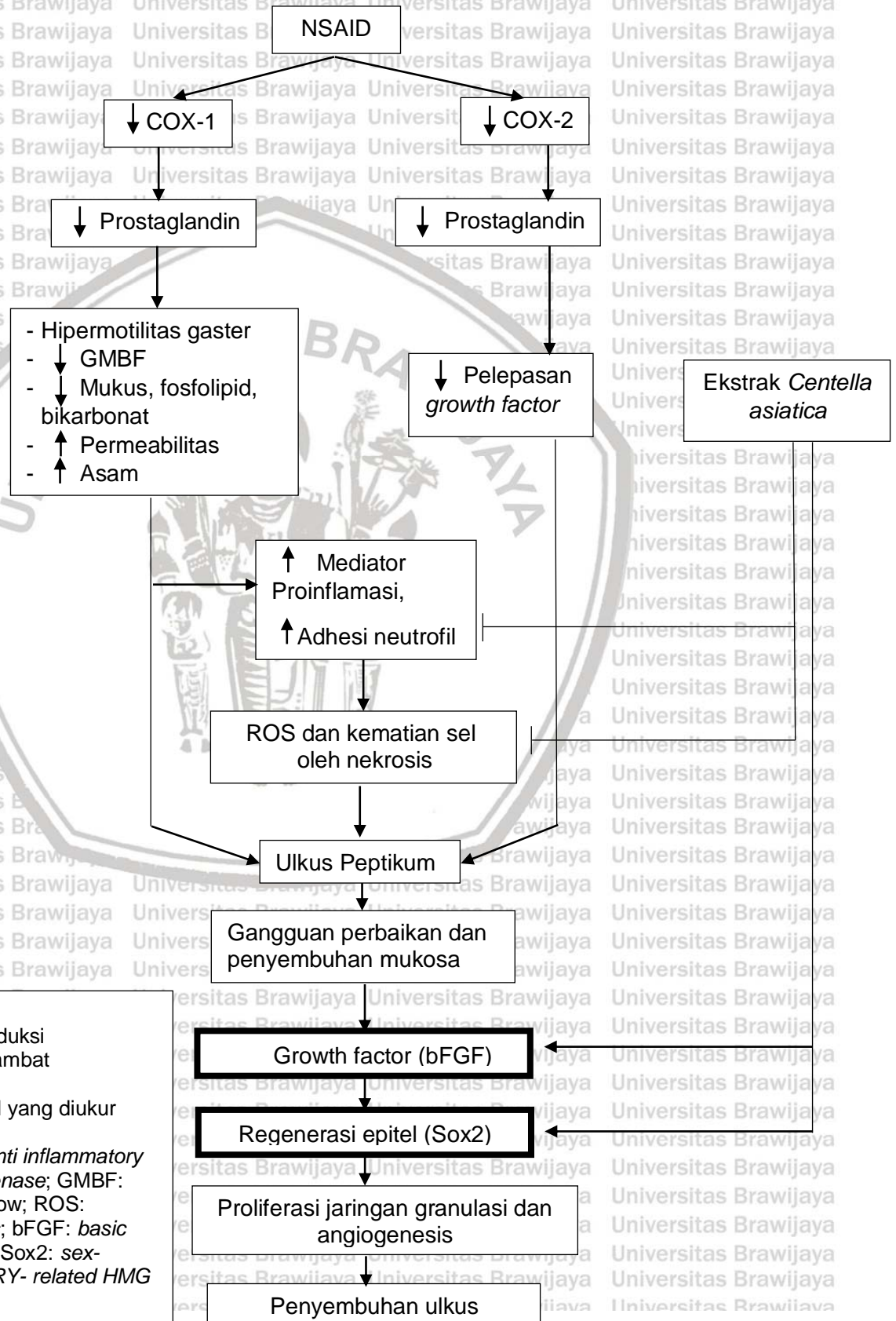
merusak dari radikal bebas (Sairam *et al.*, 2001). Penelitian lain juga menemukan bahwa *Centella asiatica* dan unsur *asiaticoside* di dalamnya mampu memberikan efek anti-inflamasi dengan menghambat *nitric oxide* (NO) sehingga menyebabkan penyembuhan ulkus (Cheng *et al.*, 2004).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Integritas dari mukosa lambung bergantung pada pembentukan prostaglandin E_2 (PGE_2) dan prostasiklin (PGI_2) yang dimediasi oleh COX-1 dan COX-2. PGE_2 dan PGI_2 adalah vasodilator kuat dan mampu mengontrol hampir seluruh aspek dari pertahanan dan penyembuhan mukosa lambung (Musumba *et al.*, 2009). Kemampuan NSAID dalam menyebabkan ulkus peptikum adalah akibat dari defisiensi prostaglandin yang dikarenakan inhibisi dari COX-1 dan COX-2 (Takeuchi *et al.*, 2010).

Inhibisi dari COX-1 mampu menyebabkan perlukaan lambung melalui inhibisi produksi prostaglandin yang bergantung COX-1. Hal ini mempengaruhi sistem saraf pusat, menyebabkan hipermotilitas lambung dan mengakibatkan adanya peningkatan permeabilitas mukosa (Tanaka, 2002). Selain itu juga terjadi gangguan mikrovaskular, menyebabkan adhesi neutrofil endotel dan peningkatan jumlah ROS (Tanaka *et al.*, 2005). Inhibisi COX-1 yang menyebabkan deplesi prostaglandin juga mengakibatkan adanya penurunan aliran darah pada mukosa gaster dan penurunan mukus, fosfolipid dan bikarbonat, yang merupakan mekanisme pertahanan lambung (Kim *et al.*, 2007). NSAID juga mampu meningkatkan sekresi asam basal sehingga asam mampu berdifusi balik dalam keadaan barrier mukosa lambung yang rusak dan menyebabkan lesi mukosa superfisial hingga lesi yang dalam (Musumba *et al.*, 2009).

Setelah terjadinya ulkus peptikum, tubuh akan merespon dengan melakukan penyembuhan ulkus. Mulanya dimulai dengan adanya peningkatan *growth factor* yang dihasilkan dari tepi ulkus akibat stimulasi PGE_2 , sitokin (seperti IL-1 β dan IL-6) atau gastrin (Koike *et al.*, 2007). *Growth factor* ini penting dalam proteksi gastroduodenal, penyembuhan ulkus peptikum dengan stimulasi angiogenesis, pembentukan jaringan granulasi dan re-epitelisasi (Szabo & Vincze, 2000). Salah satu *growth factor* yang berperan adalah *basic fibroblast growth factor* (bFGF) yang mampu menstimulasi proliferasi sel epitel dan

angiogenesis sehingga penting untuk proses penyembuhan ulkus (Cheng *et al.*, 2004). NSAID mampu menghambat perbaikan mukosa gastrointestinal dengan menekan produksi *growth factor* yang dimediasi PGE₂ (Musumba *et al.*, 2009).

Saat terjadi perlukaan akibat NSAID, lambung memiliki kemampuan untuk melakukan regenerasi dan mekanisme perbaikan. Terdapat dua mekanisme regenerasi dan perbaikan dari epitel, yang pertama adalah restitusi yaitu dengan reepitelisasi area luka melalui migrasi sel disekitar luka. Yang kedua adalah regenerasi berkelanjutan dengan proliferasi dan diferensiasi sel progenitor dan *stem cell* untuk pembaharuan sel epitel mukus (Hoffmann, 2008). Salah satu marker *stem cell* yang ditemukan di lambung adalah Sox2 (Kim, T.-H. & Shivdasani, 2016).

Ekstrak *Centella asiatica* memiliki aktivitas penyembuhan luka dengan meningkatkan angiogenesis (Incandela *et al.*, 2001). Ekstrak *Centella asiatica* mampu memperkuat pertahanan mukosa gaster dan mengurangi efek merusak dari radikal bebas (Sairam *et al.*, 2001). Penelitian lain juga menemukan bahwa *Centella asiatica* dan unsur *madecassocide* di dalamnya mampu memberikan efek anti-inflamasi dengan menghambat *nitric oxide* (NO) sehingga menyebabkan penyembuhan ulkus (Cheng *et al.*, 2004).

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak ethanol pegagan (*Centella asiatica*) berpengaruh terhadap penyembuhan ulkus melalui peningkatan bFGF dan Sox2 pada tikus *Rattus norvegicus* model ulkus gaster melalui induksi indometasin.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental-randomized posttest only controlled group design* secara *in vivo* pada tikus (*Rattus norvegicus*) galur

Wistar yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi bFGF dan Sox2 pada jaringan lambung tikus yang diinduksi Indometasin.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel dari penelitian ini adalah bahan biologis lambung tersimpan dari hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) model ulkus peptikum, dengan diinduksi indometasin 30 mg/kgBB (Akpamu *et al.*, 2013) dan diberikan perlakuan ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*). Sampel terbagi dalam enam kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol negatif yaitu tikus tidak mendapat perlakuan apapun, kelompok kontrol positif hari pertama yaitu tikus diinduksi dengan indometasin namun tidak mendapatkan ekstrak pegagan dan dikorbkan pada hari pertama, kelompok kontrol positif hari kedelapan yaitu kelompok kontrol positif yang dikorbkan di hari kedelapan, kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 yaitu tikus diinduksi dengan indometasin dan mendapatkan ekstrak pegagan dengan dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB (Abdulla *et al.*, 2010) selama 7 hari dengan frekuensi 1x/hari (Cheng *et al.*, 2004).

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan selama 1 bulan yaitu bulan September 2018 hingga Oktober 2018.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Independen

Variabel independen dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) yang diberikan dalam tiga dosis pada tiga kelompok perlakuan, yaitu pada kelompok perlakuan pertama mendapat ekstrak etanol pegagan sebanyak 100 mg/kgBB, pada kelompok perlakuan kedua mendapat ekstrak etanol pegagan sebanyak 200 mg/kgBB dan pada kelompok perlakuan ketiga mendapat ekstrak etanol pegagan sebanyak 400 mg/kgBB

4.4.2 Variabel Dependen

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah kadar bFGF dan SOX-2 pada jaringan lambung tikus.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

Bahan - bahan yang digunakan adalah bahan untuk pembuatan preparat dan pengukuran kadar bFGF dan Sox-2: lambung tikus dalam bentuk parafin blok, alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol 96%, alkohol 100%, alkohol asam, xylol, phosphate buffer saline (PBS), aquades, antibodi primer, blocking buffer, H₂O₂ 3%, antibodi sekunder (konjugat biotin), enzim Streptavidin Horseradish Peroxidase (SA-HRP), chromogen diaminobenzidin (DAB), Mayer's hematoxilen counterstaining, entellan, dan air.

4.5.2 Alat Penelitian

1. Alat pembuatan preparat: *rotary microtome*, *object glass*, dan *cover glass*.

2. Alat pewarnaan imunohistokimia: oven, kulkas, micropipet, mikroskop kamera untuk membaca hasil.

4.6 Definisi Operasional

- Hewan coba tikus (*Rattus novergicus*) model ulkus peptikum adalah tikus (*Rattus novergicus*) galur Wistar yang telah mendapatkan perlakuan dengan dipuasakan terlebih dahulu selama 8 jam kemudian diberikan indometasin dengan dosis 30 mg/kgBB (Akpamu *et al.*, 2013).
- Indomethasin adalah *non-steroid antiinflammatory drug* (NSAID) non-selektif yang digunakan untuk menginduksi perlukaan pada lambung tikus (Akpamu *et al.*, 2013). Pada penelitian ini digunakan indomethasin merk Sigma.
- Ekstraks etanol pegagan (*Centella asiatica*) adalah ekstrak tanaman pegagan diambil dari seluruh bagian tanaman yang berada di atas permukaan tanah terdiri dari batang dan daun melalui proses ekstraksi dengan metode maserasi (Rahman *et al.*, 2013).
- Imunohistokimia adalah metode yang digunakan untuk memvisualisasikan distribusi dan lokasi dari antigen spesifik atau komponen seluler pada jaringan melalui reaksi ikatan antigen dan antibodi. Pengukurannya yaitu dengan menghitung ekspresi antigen/komponen seluler yang terekspresi dari 20 lapang pandang dengan pembesaran 1000x atau 10 lapang pandang dengan pembesaran 400x (Soini *et al.*, 1998; Pižem & Cör, 2003).
- bFGF (*basic fibroblast growth factor*) adalah protein sitosolik, yang merupakan salah satu *growth factor* yang paling potensial dalam menginduksi angiogenesis, diekspresikan oleh traktus gastrointestinal dan dari imunohistokimia terdeteksi pada sel epitel permukaan, membrana basalis, jaringan ikat dan muskularis mukosa (Ernst *et al.*, 2001). Pada penelitian ini bFGF (antibodi primer: anti-bFGF abcam, ab 16828) dinilai distribusinya

pada jaringan menggunakan metode immunohistokimia dengan menghitung rerata jumlah sel yang tercatat coklat pada bagian sitoplasma, 10 lapang pandang pembesaran 400x.

- Sox2 (*sex-determining region Y/SRY-related HMG box*) adalah protein yang berperan sebagai regulator penting dalam pemeliharaan stem cell dan diferensiasi akhir sel, juga mengontrol keseimbangan dan regenerasi jaringan (Arnold *et al.*, 2011). Pada penelitian ini Sox2 (antibodi primer: anti-Sox2 Santa Cruz Biotechnology, Inc, sc-365823) dinilai distribusinya pada jaringan menggunakan metode immunohistokimia dengan menghitung rerata jumlah sel yang tercatat coklat pada bagian inti sel, 10 lapang pandang pembesaran 400x.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Immunohistokimia

Metode untuk pewarnaan immunohistokimia adalah

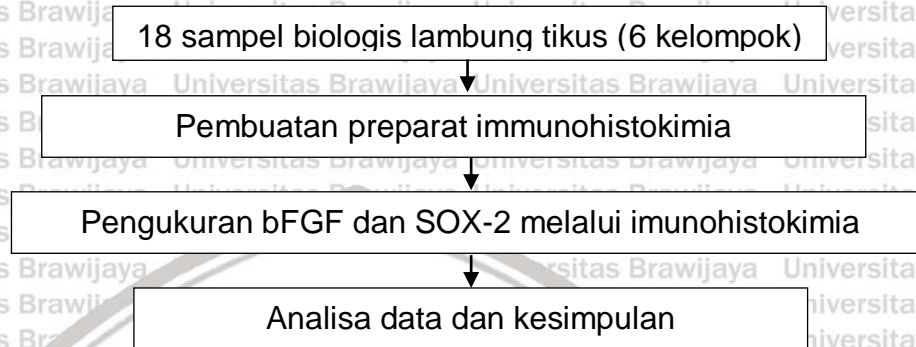
1. Deparafinisasi

- Slide dioven pada inkubator suhu 60° – 80°C sebelum proses deparafinisasi
- Slide dicelupkan pada xylol selama 5-10 menit tergantung jenis jaringan
- Slide dibilas dengan dicelupkan pada xylol baru selama 5-10 menit
- Slide kembali dibilas dengan dicelupkan pada xylol baru selama 5-10 menit
- Slide dibilas dari xylol dengan dicelupkan pada etanol absolut selama 5-10 menit
- Slide dicelupkan pada etanol absolut selama 5-10 menit
- Slide dicelupkan kembali pada etanol 70% selama 5-10 menit

- Slide dibilas dengan aquades
- 2. Immunostaining
 - Slide dibilas dengan PBS 3 x 5 menit
 - Slide diinkubasi dengan *Peroxidase Blocking for Image Analysis* selama 40 menit pada suhu ruang
 - Slide dibilas dengan PBS 3 x 5 menit
 - Slide diinkubasi dengan *Super Block* semalam pada suhu 4°C
 - Slide dibilas dengan PBS 3 x 5 menit
 - Slide diinkubasi dengan Antibodi Primer (bFGF dan SOX-2) yang diencerkan dalam blocking, 2 jam pada suhu ruang atau semalam pada suhu 4°C
 - Slide dibilas dengan PBS 3 x 5 menit
 - Slide diinkubasi dengan *CRF Anti-Polivalent HRP Polymer* selama 1 jam pada suhu ruang
 - Slide dibilas dengan PBS 1-2x 5 menit
 - Slide dibilas dengan aquades sampai PBS hilang
 - Slide diinkubasi pada *DAB Chromogen dalam DAB Substrate (High Contrast)*, diamati ekspresi dari lokasi target yang diperiksa dengan mikroskop sampai respon ditandai dengan terbentuk warna coklat pada target
 - Reaksi substrat dihentikan dengan cara slide dengenangi menggunakan aquades selama 5 menit
 - Slide dibilas dengan aquades sampai substrat bersih
 - Slide diberikan counterstain Mayer's Hematoxylin (optimasi waktu agar kontras jaringan yang positif terwarnai coklat tidak tertumpuk warna yang terlalu ungu). Diamati dengan mikroskop

- Counterstain dibilas dengan aquades sampai bersih
- Slide dikeringkan
- Jika telah benar-benar kering, slide dimounting dengan entelan

4.8 Skema Prosedur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Prosedur Penelitian

4.9 Pengumpulan Data

Setiap sampel jaringan yang telah dibuat sediaan irisan ketebalan 4 μ m, kemudian dideteksi dengan pemeriksaan hematoxilen-eosin untuk pengamatan struktur sel epitel dan pemeriksaan immunohistokimia terhadap ekspresi bFGF dan Sox-2 pada sel epitel. Untuk keperluan perhitungan, slide yang sudah berkode ditutup nomer kodenya dan diberi nomer baru secara acak. Sehingga pemeriksa tidak mengetahui slide yang diperiksa merupakan sample kelompok apa (*blind*). Pemeriksa terdiri dari 2 orang. Pemeriksaan dan perhitungan sampel dilakukan secara terpisah antara kedua pemeriksa. Perhitungan ekspresi bFGF pada sel epitel dengan melihat adanya warna coklat pada sitoplasma pada sel epitel. Sedang untuk Sox-2 tampak sebagai warna coklat pada inti sel. Hasil setiap perhitungan ditulis pada lembar kerja dan diambil nilai rata-rata per lapang pandang. Dilakukan pemulasan Hematoxilen-Eosin yang digunakan sebagai pembanding struktural. Analisis statistik bila semua hasil sudah dikembalikan ke kode sebenarnya. Dalam rangka menjamin representasi dan mengurangi

kesalahan hasil, diperlukan pengamatan pada kurang lebih sejumlah 10 lapang pandang dengan perbesaran 400x yang masing-masing berisi lebih kurang 1500 sel (Pizem & Cor, 2003; Soini, Paakko, & Letho, 1997).

4.10 Analisis Data

Data yang diperoleh akan dilakukan uji normalitas untuk mengetahui distribusi data. Data yang terdistribusi normal memiliki nilai $Sig > 0,05$. Juga dilakukan uji homogenitas varian untuk menentukan varian data sama atau tidak.

Jika sebaran data normal dan varian data sama maka digunakan uji hipotesis

Oneway Analysis of Variance (ANOVA). Namun, jika data tidak terdistribusi

normal digunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya, untuk melihat perbedaan dari

setiap kelompok digunakan uji *Post Hoc* sebagai lanjutan *one way ANOVA* dan

Dunnett sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis*. Hasil penelitian dianggap bermakna

apabila didapatkan nilai $p < 0,05$ atau dengan kata lain hipotesis null ditolak.

Pada uji ANOVA ini hipotesis null yang diajukan adalah “tidak terdapat

perbedaan ekspresi bFGF pada kelima kelompok” dan “tidak terdapat perbedaan

ekspresi SOX-2 pada kelima kelompok”. Uji statistik di atas diuji dengan

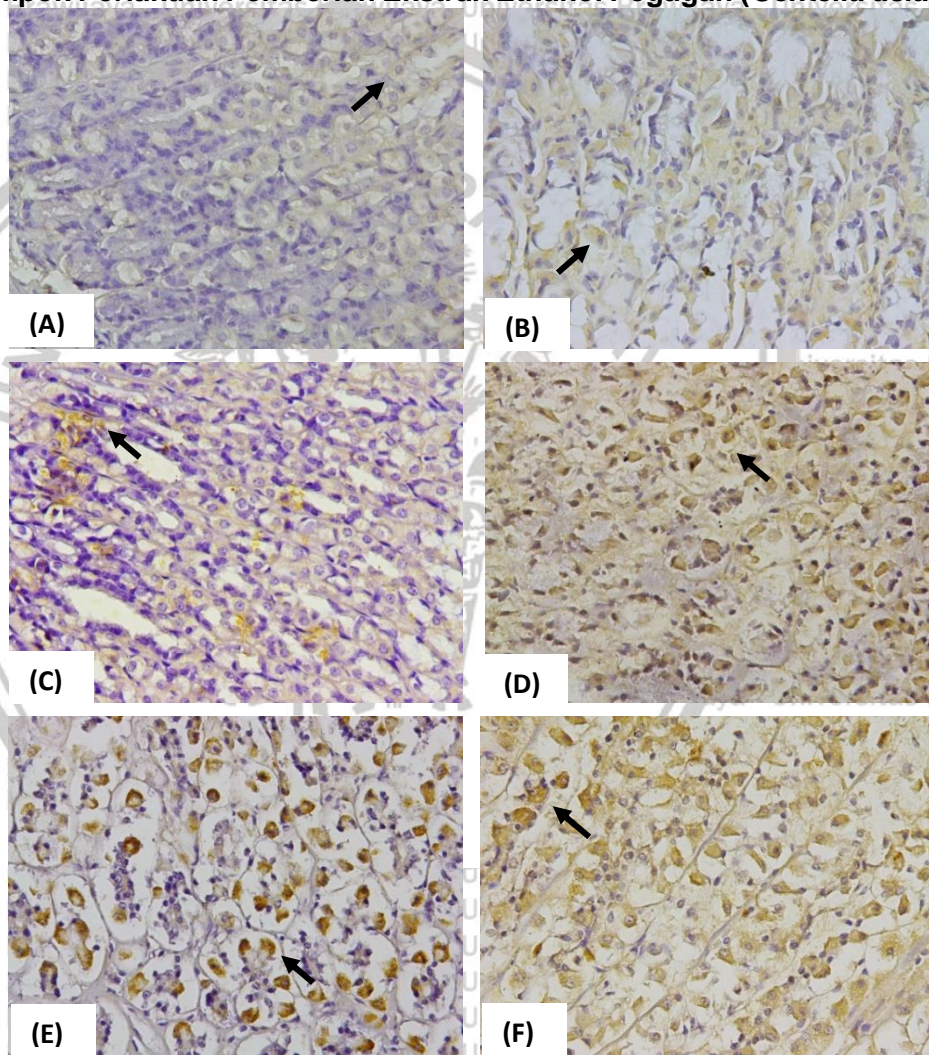
menggunakan *software* program statistik SPSS 23.

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Setelah dilakukan penelitian untuk membuktikan pengaruh ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) terhadap penyembuhan ulkus gaster pada tikus *Rattus norvegicus* melalui ekspresi bFGF dan Sox2, didapatkan hasil sebagai berikut.

5.1 Perbedaan Ekspresi bFGF pada Lambung Tikus Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan Pemberian Ekstrak Ethanol Pegagan (*Centella asiatica*)



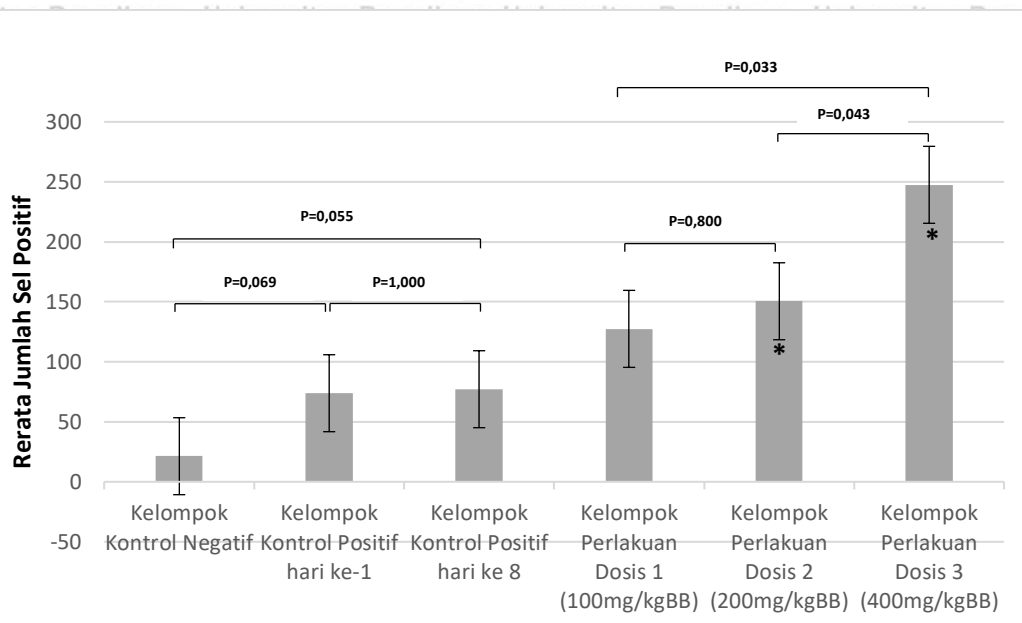
Gambar 5.1 Hasil pengecatan immunohistokimia yang menunjukkan ekspresi bFGF pada lambung tikus berbagai kelompok perlakuan (perbesaran 400x). Kelompok kontrol negatif (A), kelompok kontrol positif hari pertama (B), kelompok kontrol positif hari ke 8 (C), kelompok perlakuan dosis 100 mg/kgBB (D), kelompok perlakuan dosis 200 mg/kgBB (E), kelompok perlakuan dosis 400 mg/kgBB (F). Ekspresi bFGF ditunjukkan oleh tanda panah yang menunjukkan sitoplasma sel epitel mukosa yang tercatat berwarna coklat.

Pada penelitian ini, ekspresi bFGF pada lambung tikus diukur melalui pengecatan imunohistokimia yang kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop dengan kamera, hasilnya dapat dilihat pada gambar 5.1. Pengamatan ekspresi bFGF dengan cara mengamati pada epitel mukosa lambung yang mengekspresikan warna coklat pada daerah sitoplasma sel, dengan menggunakan pembesaran 400x sebanyak 10 lapang pandang. Jumlah sel yang tercat coklat kemudian dihitung, rata-rata masing-masing kelompok dapat dilihat pada tabel 5.1 dan gambar 5.2.

Pada gambar 5.1 menunjukkan bahwa ekspresi bFGF nampak di sel epitel mukosa lambung. Tidak nampak adanya perbedaan ekspresi bFGF pada kelompok kontrol positif hari pertama dan kelompok kontrol positif hari kedelapan.

Pada kelompok kontrol positif hari pertama nampak ekspresi bFGF yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, nampak dari lebih banyaknya sel yang tercat berwarna coklat pada kelompok kontrol positif hari pertama. Hasil yang sama juga ditunjukkan oleh kelompok kontrol positif hari kedelapan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) baik dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB menunjukkan ekspresi bFGF yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol positif hari pertama dan hari ke 8.

Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) mampu meningkatkan proses penyembuhan ulkus melalui peningkatan ekspresi bFGF.



Gambar 5.2 Grafik Rerata Ekspresi bFGF pada Lambung Tikus Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan Pemberian Ekstrak Ethanol Pegagan (*Centella asiatica*)

Signifikansi nilai p apabila $p < 0,05$. Nilai p signifikan dibandingkan dengan kelompok tikus kontrol positif hari pertama dan hari kedelapan (*).

Tabel 5.1 Rerata Ekspresi bFGF pada Lambung Tikus

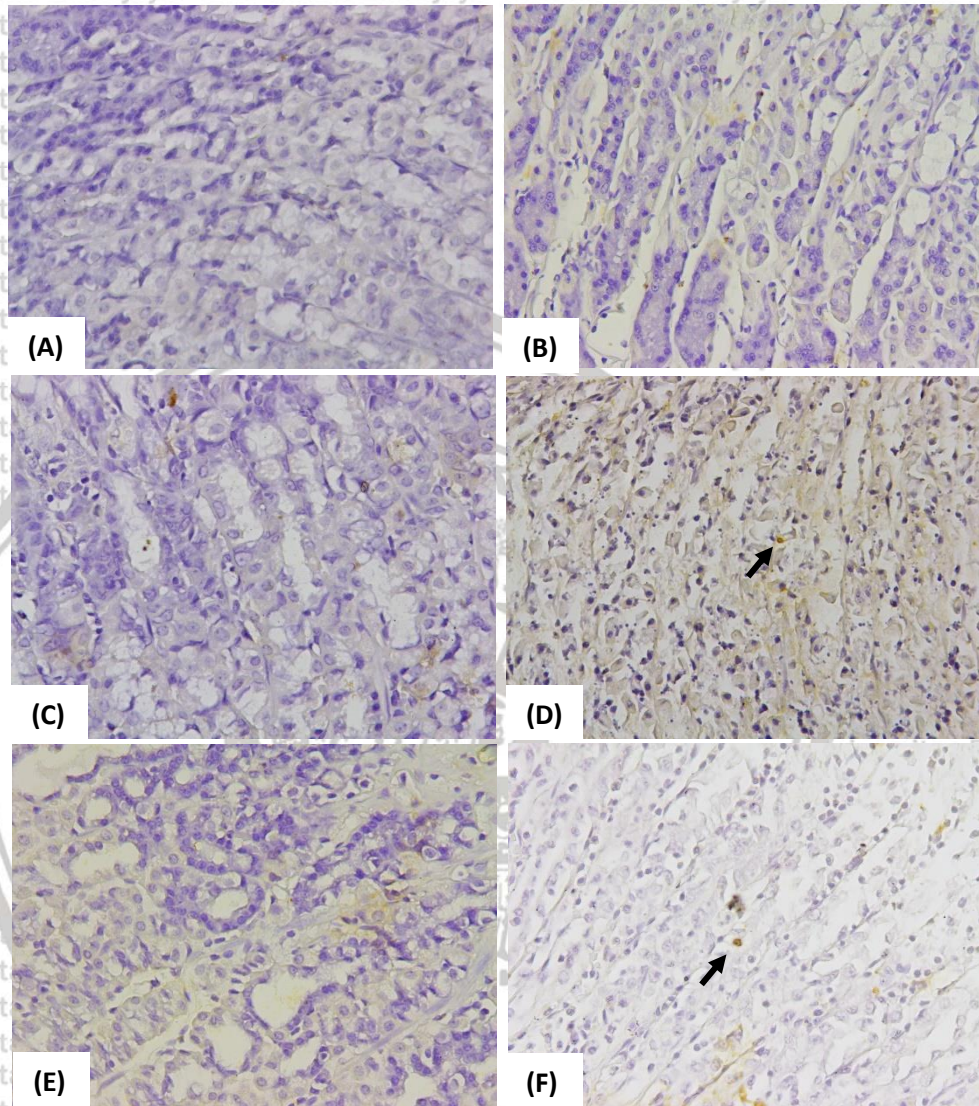
Kelompok Penelitian (n=3)	Rerata Ekspresi \pm SD
Kontrol Negatif	21,33 \pm 14,61
Kontrol Positif hari ke-1	73,83 \pm 7,87
Kontrol Positif hari ke-8	77,17 \pm 8,63
Perlakuan Dosis 1 (100 mg/kgBB)	127,47 \pm 18,88
Perlakuan Dosis 2 (200 mg/kgBB)	150,47 \pm 17,57
Perlakuan Dosis 3 (400 mg/kgBB)	247,53 \pm 2,74

Analisis uji normalitas menggunakan Shapiro-wilk menunjukkan data hasil rerata ekspresi bFGF di lambung tikus pada masing masing perlakuan terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan pada uji homogenitas data, didapatkan hasil variasi data yang tidak homogen ($p < 0,05$), oleh karena itu uji beda dilakukan menggunakan uji Kruskal Wallis. Pada uji Kruskal Wallis didapatkan nilai $p = 0,007$ yang menandakan adanya perbedaan yang bermakna pada minimal dua kelompok perlakuan.

Selanjutnya, uji post hoc menggunakan uji Dunnet dilakukan untuk mengetahui perbedaan pada setiap kelompok. Grafik rerata ekspresi bFGF di lambung pada masing-masing perlakuan terangkum dalam gambar 5.2 dan Tabel 5.1.

Pada grafik gambar 5.2 diatas, dapat diketahui bahwa induksi ulkus peptikum dengan indomethasin pada kelompok kontrol positif hari pertama menyebabkan ekspresi bFGF meningkat ($p=0.069$) dibandingkan dengan kelompok tikus sehat tanpa perlakuan apapun. Sebagian dari tikus kelompok kontrol positif juga dirawat hingga hari ke 8 untuk mengamati proses penyembuhan ulkus oleh kemampuan diri sendiri, nampak adanya peningkatan ekspresi bFGF ($p=0,055$) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Pada kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak ethanol pegagan (*Centella asiatica*) baik dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB menunjukkan rerata ekspresi yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol positif hari ke 8, kelompok dosis 1 vs kelompok kontrol positif hari ke 8 ($127,47 \pm 18,88$ vs $77,17 \pm 8,63$, $p = 0,154$); kelompok dosis 2 vs kelompok kontrol positif hari ke 8 ($150,47 \pm 17,57$ vs $150,47 \pm 17,57$, $p=0,048$); kelompok dosis 3 vs kelompok kontrol positif hari ke 8 ($247,53 \pm 2,74$ vs $77,17 \pm 8,63$, $p= 0,002$). Pada grafik gambar 5.2 tersebut nampak pola peningkatan rerata ekspresi bFGF sesuai besarnya dosis pemberian ekstrak ethanol pegagan (*Centella asiatica*) (Kelompok dosis 1 vs kelompok dosis 2, $p=0.800$; Kelompok dosis 1 vs kelompok dosis 3, $p=0.033$; dan Kelompok dosis 2 vs kelompok dosis 3, $p=0.043$).

5.2 Perbedaan Ekspresi Sox2 pada Lambung Tikus Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan Pemberian Ekstrak Ethanol Pegagan (*Centella asiatica*)



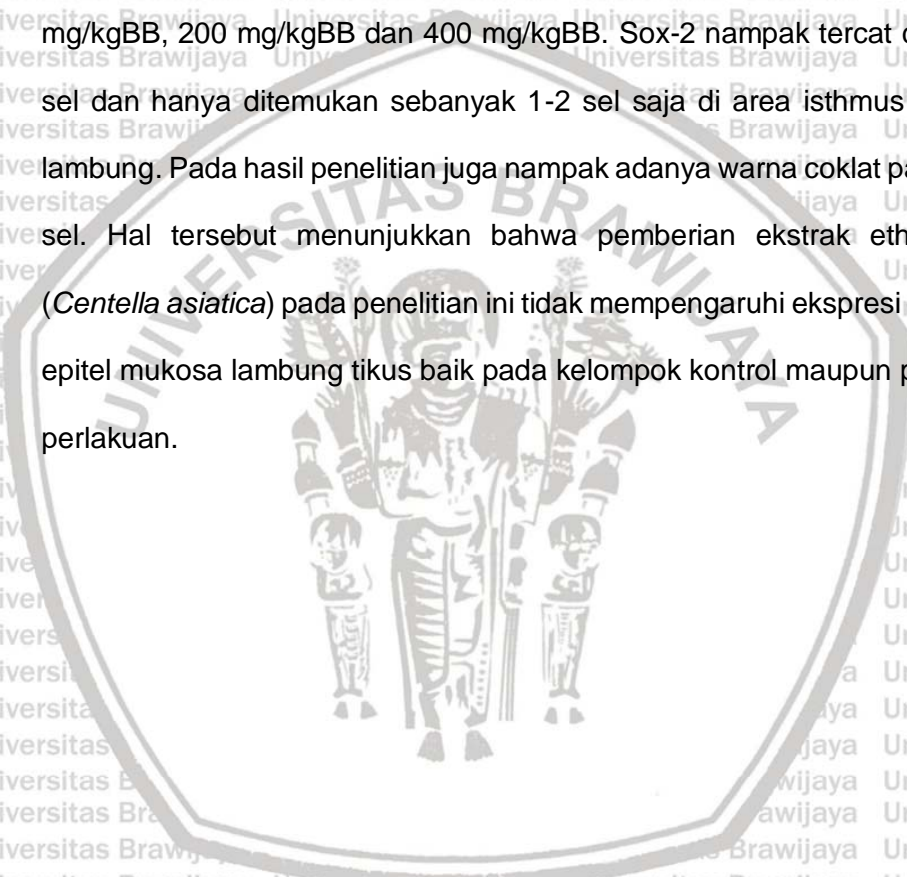
Gambar 5.3 Hasil pengecatan immunohistokimia yang menunjukkan ekspresi Sox-2 pada lambung tikus berbagai kelompok perlakuan (perbesaran 400x). Kelompok kontrol negatif (A), kelompok kontrol positif hari pertama (B), kelompok kontrol positif hari ke 8 (C), kelompok perlakuan dosis 100 mg/kgBB (D), kelompok perlakuan dosis 200 mg/kgBB (E), kelompok perlakuan dosis 400 mg/kgBB (F). Ekspresi Sox-2 ditunjukkan oleh tanda panah yang menunjukkan inti sel epitel mukosa yang tercat berwarna coklat.

Pada penelitian ini, ekspresi Sox2 pada lambung tikus diukur melalui pengecatan immunohistokimia yang kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop dengan kamera, hasilnya dapat dilihat pada gambar 5.3. Pengamatan

ekspresi Sox2 dengan cara mengamati pada epitel mukosa lambung yang mengekspresikan warna coklat pada daerah inti sel, dengan menggunakan pembesaran 400x sebanyak 10 lapang pandang.

Gambar 5.3 menunjukkan bahwa pada penelitian ini ekspresi Sox-2 pada epitel mukosa lambung sangat rendah baik pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif hari pertama dan juga kelompok kontrol positif hari ke-8.

Ekspresi Sox-2 juga nampak sangat rendah pada kelompok perlakuan dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB. Sox-2 nampak tercatat coklat pada inti sel dan hanya ditemukan sebanyak 1-2 sel saja di area isthmus epitel mukosa lambung. Pada hasil penelitian juga nampak adanya warna coklat pada sitoplasma sel. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak ethanol pegagan (*Centella asiatica*) pada penelitian ini tidak mempengaruhi ekspresi Sox-2 pada sel epitel mukosa lambung tikus baik pada kelompok kontrol maupun pada kelompok perlakuan.



BAB VI PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Ethanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi bFGF pada Lambung Tikus Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan Model Ulkus Peptikum yang Diinduksi Indomethasin

Pemberian *non steroidal antiinflammatory drug* (NSAID), pada penelitian ini menggunakan indomethasin dengan dosis 30mg/kgBB, mampu menyebabkan ulkus peptikum akibat dari defisiensi prostaglandin (PG) yang dikarenakan inhibisi siklooksigenase (COX), baik COX-1 maupun COX-2 (Takeuchi *et al.*, 2010). Defisiensi prostaglandin lebih lanjut menyebabkan terjadinya hipermotilitas gaster (Tanaka, 2002), penurunan aliran darah di mukosa lambung, penurunan pembentukan lapisan mukus, bikarbonat dan fosfolipid (Kim, *et al.*, 2007), peningkatan permeabilitas mukosa (Tanaka, 2002) dan peningkatan produksi asam (Musumba *et al.*, 2009). Hal ini menyebabkan teraktivasinya mediator inflamasi, gangguan perbaikan dan penyembuhan mukosa sehingga terbentuk ulkus peptikum (Musumba *et al.*, 2009).

Saat terbentuk ulkus peptikum, tubuh akan melakukan upaya untuk melakukan penyembuhan. Prosesnya dimulai dengan peningkatan *growth factor* salah satunya adalah bFGF/FGF-2. bFGF diekspresikan oleh jaringan lambung normal baik pada tikus maupun manusia dan dilaporkan bahwa ekspresinya meningkat saat terjadi ulkus peptikum (Sato *et al.*, 1997; Hull *et al.*, 1998). bFGF terikat oleh *heparan sulphate proteoglycans* (HSPG) yang memodulasi aktivitas bFGF pada permukaan sel, melindungi bFGF dari inaktivasi oleh asam dan proteolisis, dan berperan sebagai tempat penyimpanan untuk dilepaskan saat terjadinya luka (Hull *et al.*, 1998). Pada penelitian ini diperoleh bahwa bFGF juga diekspresikan oleh kelompok kontrol negatif namun dalam jumlah yang

rendah dan diperoleh peningkatan ekspresi dibandingkan pada kelompok kontrol positif hari pertama ($21,33 \pm 14,61$ vs $73,83 \pm 7,87$, $p=0,069$) maupun pada kelompok kontrol positif hari kedelapan ($21,33 \pm 14,61$ vs $77,17 \pm 8,63$, $p=0,055$).

bFGF merupakan protein sitosolik yang diekspresikan oleh mukosa lambung dan duodenum tikus dan manusia (Sato *et al.*, 1997; Hull *et al.*, 1998).

Ekspresi bFGF nampak pada sel epitel mukosa, sel goblet, sel leher mukosa, sel parietal, sel chief dan sel kelenjar basal (Sato *et al.*, 1997). Pada penelitian ini juga diperoleh ekspresi bFGF nampak tercatat coklat pada sitoplasma sel mukosa lambung, tersebar dari sel epitel mukosa di permukaan hingga ke sel kelenjar basal mukosa lambung (Gambar 5.1).

Ekstrak ethanol *Centella asiatica* dengan kandungan bahan aktif madecassoside dan asiaticoside memiliki aktifitas penyembuhan luka baik secara in vivo maupun in vitro melalui angiogenesis (Shukla *et al.*, 1999). Selain itu zat ini juga mampu menghambat proses inflamasi yang penting pada patogenesis awal terbentuknya ulkus peptikum (Incandela *et al.*, 2001). Penelitian oleh Cheng *et al* (2004) menunjukkan bahwa ekstrak *Centella asiatica* mampu menstimulasi pembentukan pembuluh darah dan regenerasi sel mukosa selama tahap penyembuhan ulkus gaster. Telah diketahui bahwa angiogenesis merupakan bagian yang penting dari proses penyembuhan luka. Angiogenesis membantu penyembuhan luka dengan memperbaiki sirkulasi pada area luka, untuk mengantarkan oksigen dan nutrisi selama proses penyembuhan termasuk untuk reepitelisasi (Szabo *et al.*, 1995). Ekstrak *Centella asiatica* juga berperan dalam fase proliferasi dalam proses penyembuhan luka. Pada fase ini prosesnya didominasi oleh pembentukan jaringan granulasi dan epitelisasi, erat keterkaitannya dengan *growth factor* salah satunya bFGF (Mackay & Miller,

2003). Efek ekstrak *Centella asiatica* dalam membantu penyembuhan ulkus peptikum dapat disebabkan akibat induksi ekspresi bFGF karena peranan bFGF yang penting dalam proses penyembuhan ulkus peptikum (Cheng *et al.*, 2004).

bFGF mampu mempengaruhi sel yang sama untuk berproliferasi dan migrasi salah satunya adalah saat terjadinya regenerasi untuk menutup luka.

Melalui reseptor FGF yang sama, bFGF mampu berperan dalam mitogenesis dan mobilitas sel (Szabo *et al.*, 1995; Milani & Calabrò, 2001; Tarnawski *et al.*,

2001). bFGF mempengaruhi proliferasi sel dengan memberikan efek mitogenik melalui jalur Ras-MAP kinase termasuk di dalamnya melibatkan ERK 1/2 (Boilly

et al., 2000; Dailey *et al.*, 2005). Efek migrasi oleh bFGF diakibatkan oleh aktivasi jalur Src dan jalur MAP kinase melalui p38 (Boilly *et al.*, 2000).

Kemampuan bFGF dalam proses penyembuhan luka dibuktikan oleh penelitian oleh Ernst *et al* (2001) yang menjelaskan bahwa penggunaan bFGF eksogen

mampu mempercepat proses perbaikan jaringan dalam penyembuhan ulkus gaster melalui interaksi kompleks dari matriks sel, proliferasi sel, migrasi sel dan

angiogenesis.

Pada penelitian ini juga didapatkan hasil yang sesuai yaitu adanya peningkatan ekspresi bFGF pada kelompok tikus model ulkus peptikum diinduksi

indometasin yang diberikan ekstrak ethanol *Centella asiatica* dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB, dengan peningkatan ekspresi yang paling tinggi

yaitu pada kelompok dosis 400 mg/kgBB. Kelompok kontrol positif pada penelitian ini dibiarkan tetap hidup hingga hari kedelapan untuk membandingkan

proses penyembuhan ulkus oleh kemampuan diri sendiri dibandingkan dengan tikus yang telah diberikan ekstrak *Centella asiatica*. Hasil penelitian memperoleh

bahwa ada peningkatan ekspresi bFGF yang signifikan pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak *Centella asiatica* dosis 200 mg/kgBB ($p=0,048$) dan

dosis 400 mg/kgBB ($p=0,002$) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif hari kedelapan.

6.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Ethanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi Sox-2 pada Lambung Tikus Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan Model Ulkus Peptikum yang Diinduksi Indomethasin

Saat terjadinya ulkus peptikum yang merusak barier epitel mukosa lambung, tubuh berusaha untuk melakukan regenerasi melalui proliferasi dan diferensiasi sel punca/*stem cell* dan progenitor untuk pembaharuan sel epitel mukosa dalam waktu hari hingga bulan (Hoffmann, 2008). Telah diketahui beberapa marker *stem cell* di lambung yaitu salah satunya adalah Sox-2, faktor transkripsi yang penting untuk homeostasis dan regenerasi (Carrasco-Garcia *et al.*, 2016). Penelitian selama ini banyak membahas mengenai peranan Sox-2 pada sel embrio awal dan regulasinya pada masa fetus (Arnold *et al.*, 2011). Arnold *et al* (2011) menemukan bahwa Sox-2 juga menjadi petanda *stem cell* pada beberapa jaringan epitel dewasa termasuk lambung baik pada area *forestomach*, korpus dan pilorus.

Sox-2 melalui imunohistokimia nampak terekspresi di inti sel dan umumnya ekspresinya meningkat pada kasus kanker contohnya pada kanker lambung (Carrasco-Garcia *et al.*, 2016). Penelitian oleh Aihara *et al* (2016) menunjukkan Sox-2 terekspresi di kompartemen sitoplasma dan nukleus pada area isthmus lambung tikus, dan terekspresi secara sporadis yang sesuai juga dengan penelitian lainya (Baltus *et al.*, 2009). Ekspresi Sox-2 pada lambung normal didapatkan sangat rendah, hanya satu hingga dua sel saja pada tiap kelenjarnya, berbeda dengan marker *stem cell* lainnya pada lambung (Arnold *et al.*, 2011).

Pada penelitian ini, Sox-2 nampak terekspresi di inti sel dan sitoplasma sel epitel isthmus mukosa lambung dengan ekspresi yang sangat rendah yaitu hanya

didapatkan satu atau dua sel saja baik pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

Ekstrak *Centella asiatica* telah diketahui memiliki peran pada fase proliferasi dalam proses penyembuhan luka. Namun dalam penelitian ini tidak didapatkan adanya peningkatan ekspresi Sox-2 pada kelompok perlakuan.

Penelitian oleh Aihara *et al* (2016) yang mengamati penyembuhan ulkus lambung sejak hari ke 8 hingga 8 bulan setelah ulkus, mendapati adanya peningkatan ekspresi Sox-2 pada mukosa lambung pada hari ke 30. Pada penelitian ini dilakukan induksi ulkus peptikum dan kemudian diberikan ekstrak *Centella asiatica* selama 7 hari berturut-turut dan tikus dikorbankan pada hari ke delapan.

Proliferasi sel dalam proses penyembuhan ulkus merupakan salah satu aspek yang penting. Proses ini bisa terjadi dengan melibatkan sel epitel di tepi ulkus ataupun pada tahap selanjutnya diikuti dengan *keterlibatan stem cell* untuk ikut berproliferasi dan berdiferensiasi (Hoffmann, 2008). Dalam penelitian ini, Sox-2 sebagai salah satu penanda *stem cell* epitel lambung tidak nampak ikut terlibat dalam proses penyembuhan ulkus. Hal ini dapat menunjukkan bahwa proses penyembuhan ulkus yang terjadi cukup hanya dengan proliferasi dan migrasi sel epitel di sekitar ulkus dan tidak membutuhkan adanya keterlibatan Sox-2. Jalur yang diaktifkan dapat melibatkan Smad 2/3 yang mampu mengarahkan menuju ke proliferasi tanpa melibatkan Sox-2 dalam prosesnya (Wu *et al.*, 2016).

Penelitian ini juga menunjukkan adanya ekspresi Sox-2 di sitoplasma. Sox-2 terekspresi di sitoplasma akibat dari ekspor nuklear dalam bentuk terasetilasi sebagai regulasi negatif protein ini yang diikuti dengan Sox-2 ubiquitinasi. Keberadaan protein Sox2 tidak selalu menunjukkan protein ini telah bekerja pada waktu tertentu hingga protein ini bertranslokasi menuju nukleus untuk

mengaktifkan gen target (Baltus *et al.*, 2009). Untuk bekerja mempengaruhi proliferasi sel, Sox-2 perlu untuk bertranslokasi menuju nukleus dengan cara terfosforilasi dan mengalami nuklear impor, proses ini erat kaitannya dengan AKT kinase (Jeong *et al.*, 2012; Schaefer *et al.*, 2015).

6.3 Implikasi di Bidang Kedokteran

Ulkus peptikum merupakan penyakit yang sering terjadi di seluruh dunia dan komplikasinya mampu menyebabkan masalah klinis yang serius (Sverden, 2017). Penyebabnya seringkali akibat penggunaan NSAID jangka panjang.

Ekstrak *Centella asiatica* mampu memberikan tambahan informasi dasar mengenai terapi alternatif untuk penyembuhan ulkus peptikum. Ekstrak *Centella asiatica* mampu meningkatkan ekspresi bFGF, *growth factor* yang memerankan peranan krusial untuk menstimulasi proliferasi, migrasi sel epitel dan angiogenesis, proses yang penting dalam penyembuhan ulkus peptikum.



BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian mengenai pemberian ekstrak ethanol *Centella asiatica* pada tikus model ulkus peptikum dapat diambil kesimpulan sebagai berikut

- a. Terdapat peningkatan ekspresi bFGF pada tikus model ulkus peptikum setelah diberikan ekstrak ethanol *Centella asiatica* dibandingkan dengan tikus kelompok kontrol positif hari kedelapan yang mencerminkan ekstrak *Centella asiatica* mampu membantu proses penyembuhan ulkus peptikum melalui peningkatan ekspresi bFGF yang penting untuk proses proliferasi dan migrasi sel epitel mukosa.
- b. Tidak didapatkan peningkatan ekspresi Sox-2 pada tikus model ulkus peptikum setelah diberikan ekstrak ethanol *Centella asiatica* dibandingkan dengan tikus kelompok kontrol. Hal ini dapat menunjukkan bahwa pada kasus ulkus peptikum dalam penelitian ini, proses penyembuhan ulkus terjadi melalui proliferasi sel epitel tanpa melibatkan peranan *stem cell* dalam prosesnya.

7.2 Saran

Saran yang diberikan sehubungan dengan penelitian yang telah dilakukan adalah sebagai berikut

- Diperlukan penelitian dengan menggunakan marker *stem cell* lain yang terekspresi lebih banyak pada lambung seperti Sox9 untuk

mengamati pengaruh pemberian ekstrak ethanol *Centella asiatica* pada tikus model ulkus peptikum terhadap proses penyembuhan ulkus dengan cara regenerasi epitel mukosa lambung melalui proliferasi *stem cell*.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR PUSTAKA

- Abdulla, M. A., AL-Bayat, F. H., Younis, L. T., & Abu Hassan, M. I. (2010). Anti-ulcer activity of *Centella asiatica* leaf extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(13), 1253–1259. <https://doi.org/10.5897/JMPR10.197>
- Agréus, L., Talley, N. J., & Jones, M. (2016). Value of the “Test & Treat” Strategy for Uninvestigated Dyspepsia at Low Prevalence Rates of *Helicobacter pylori* in the Population. *Helicobacter*, 21(3), 186–191. <https://doi.org/10.1111/hel.12267>
- Aihara, T., Nakamura, E., Amagase, K., Tomita, K., Fujishita, T., et al. (2003). Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: Past, present, and future. *Pharmacology and Therapeutics*, 98(1), 109–127. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(03\)00015-9](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(03)00015-9)
- Akpamu, U., Owoyele, V., Ozor, M., & Osifo, U. (2013). Indomethacin-Induced Gastric Ulcer: Model in Female Wistar Rats. *International Journal of Basic, Applied and Innovative Research*, 2(4), 78–84.
- Akram M, Shahab-uddin, Ahmed A, Usmanhani K, Hannan A, Mohiuddin E, et al. (2010) Peptic ulcer and *Helicobacter pylori* eradication: A review article. *Int J Med Sci*, 2:370-375.
- Allen, A., & Flemström, G. (2005). Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 288(1), C1–C19. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00102.2004>
- Amandeep, K., Robin, S., Ramica, S., & Sunil, K. (2012). Peptic Ulcer : a Review on Etiology and Pathogenesis. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(6), 34–38.
- Arnold, K., Sarkar, A., Yram, M. A., Polo, J. M., Bronson, R., et al. (2011). Sox2 + adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell*, 9(4), 317–329. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.09.001>
- Ascencio F, Hansson HA, Larm O, Wadstrom T. (1995). *Helicobacter pylori* interacts with heparin and heparin-dependent growth factors. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 265-272.
- Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., & Holm, L. (2001). The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(5), G922–G929. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.5.G922>
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., et al. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development on SOX2 function. *Genes Dev.*, 17, 126–140. <https://doi.org/10.1101/gad.224503>
- Baltus, G. A., Kowalski, M. P., Zhai, H., Tutter, A. V., Quinn, D., Wall, D., & Kadam, S. (2009). Acetylation of Sox2 Induces Its Nuclear Export in Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 27, 2175–2184.

<https://doi.org/10.1634/stem-cells.2007-1041>

Bermawie, N., Purwiyanti, S., & Mardiana. (2008). Keragaan Sifat Morfologi, Hasil dan Mutu Plasma Nutfag Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban.). *Bul. litro*, XIX(1), 1–17.

Bjarnason, I., Scarpignato, C., Takeuchi, K., & Rainsford, K. D. (2007). Determinants of the short-term gastric damage caused by NSAIDs in man. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 26(1), 95–106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03348.x>

Brinkhaus B, Lindner M, Schuppan D, Hahn EG. (2000). Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine* 7:427-48.

Brzozowski, T., Konturek, P. C., Konturek, S. J., Brzozowska, I., & Pawlik, T. (2005). Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 56(SUPPL. 5), 33–55.

Buti, L., Spooner, E., Van der Veen, A. G., Rappuoli, R., Covacci, A., et al. L. (2011). *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A (CagA) subverts the apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) tumor suppressor pathway of the host. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(22), 9238–9243. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106200108>

Carrasco-Garcia, E., Santos, J. C., Garcia, I., Brianti, M., Garcí ¼a-Puga, et al. (2016). Paradoxical role of SOX2 in gastric cancer. *American Journal of Cancer Research*, 6(4), 701–713.

Chan, F. K. L. (2006). Primer: Managing NSAID-induced ulcer complications - Balancing gastrointestinal and cardiovascular risks. *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology*, 3(10), 563–573. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0610>

Chatzaki, E., Lambropoulou, M., Constantinidis, T. C., Papadopoulos, N., Tache, Y., Minopoulos, G., & Grigoriadis, D. E. (2006). Corticotropin-Releasing Factor (CRF) Receptor Type 2 in the Human Stomach: Protective Biological Role by Inhibition of Apoptosis. *Journal of cellular physiology*, 209, 905–911. <https://doi.org/10.1002/JCP>

Cheng, C. L., & Koo, M. W. (2000). Effects of *Centella asiatica* on ethanol induced gastric mucosal lesions in rats. *Life sciences*, 67(21), 2647–2653. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00848-1](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00848-1)

Cheng, C. L., Guo, J. S., Luk, J., & Koo, M. W. L. (2004). The healing effects of *Centella* extract and asiaticoside on acetic acid induced gastric ulcers in rats. *Life Sciences*, 74, 2237–2249. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.055>

Colucci, R., Fornai, M., Antonioli, L., Ghisu, N., Tuccori, M., et al. (2009). Characterization of mechanisms underlying the effects of esomeprazole on the impairment of gastric ulcer healing with addition of NSAID treatment. *Digestive and Liver Disease*, 41(6), 395–405. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2008.10.004>

Danopoulos, S., Schlieve, C. R., Grikscheit, T. C., & Al Alam, D. (2017). Fibroblast Growth Factors in the Gastrointestinal Tract: Twists and Turns. *Developmental Dynamics*, 246(4), 344–352. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24491>

Darling RL, Romero JJ, Dial EJ, Akunda JK, Langenbach R, Lichtenberger LM. (2004). The effects of aspirin on gastric mucosal integrity, surface hydrophobicity, and prostaglandin metabolism in cyclooxygenase knockout mice. *Gastroenterology*, 127: 94–104.

Del Valle J. (2015). Peptic ulcer disease and related disorders. In: Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine* (19th edn). New York, NY: McGraw-Hill Education, 1911–32

Ernst H, Konturek P, Hahn EG, Brzozowski T, Konturek SJ. (1996). Acceleration of wound healing in gastric ulcers by local injection of neutralizing antibody to transforming growth factor β 1. *Gut*, 39: 172–175

Ernst H, Muller M, Paulus A, Hahn EG, Ell C. (1994) Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in the normal adult gastrointestinal tract. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 6: 559–564.

Ernst, H., Konturek, P. C., Hahn, E. G., Stosiek, H. P., Brzozowski, T., et al. (2001). Effect of local injection with basic fibroblast growth factor (BFGF) and neutralizing antibody to BFGF on gastric ulcer healing, gastric secretion, angiogenesis and gastric blood flow. *Journal of Physiology and Pharmacology*.

Fiorucci, S., Antonelli, E., Distrutti, E., Rizzo, G., Mencarelli, A., et al. (2005). Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology*, 129(4), 1210–1224. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.07.060>

Fornai, M., Antonioli, L., Colucci, R., Tuccori, M., & Blandizzi, C. (2011). Pathophysiology of Gastric Ulcer Development and Healing: Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Options. In J. Chai (Ed.), *Peptic Ulcer Disease* (hal. 113–142). InTech. <https://doi.org/10.5772/17640>

Guth, P. H. (1992). Current concepts in gastric microcirculatory pathophysiology. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 65(6), 677–688.

Gyires, K., Müllner, K., & Rónai, A. Z. (2001). Activation of central opioid receptors may induce gastric mucosal defence in the rat. *Journal of Physiology Paris*, 95(1–6), 189–196. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(01\)00024-9](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(01)00024-9)

Heidari, M., Jamshedi, A. H., Akhondzadeh, S., Novin, M. G., Sadeghi, M. R., et al. (2007). Evaluating the effects of *Centella asiatica* on spermatogenesis in rats. *Medical Journal of Reproduction & Infertility*, 7(4), 367–374.

Hoffmann, W. (2008). Regeneration of the gastric mucosa and its glands from stem cells. *Current medicinal chemistry*, 15(29), 3133–44. <https://doi.org/10.2174/092986708786848587>

Hull, M. A., Brough, J. L., Powe, D. G., Carter, G. I., Jenkins, D., & Hawkey, C. J. (1998). Expression of basic fibroblast growth factor in intact and ulcerated human gastric mucosa. *Gut*, 43(4), 525–536. <https://doi.org/10.1136/gut.43.4.525>

Hull, M. A., Cullen, D. J. E., Hudson, N., & Hawkey, C. J. (1995). Basic fibroblast growth factor treatment for non-steroidal anti-inflammatory drug associated gastric ulceration. *Gut*, 37, 610–612. <https://doi.org/10.1136/gut.37.5.610>

Incandela L, Cesarone MR, Cacchio M, De Sanctis MT, Santavenere C, et al. (2001). Total triterpenic fraction of *Centella asiatica* in chronic venous insufficiency and in high-perfusion microangiopathy. *Angiology*, 52:S9-13.

Jiménez, M. D., Martín, M. J., De La Lastra, C. A., Bruseghini, L., Herrerías, J. M., et al. (2004). Role of L-arginine in ibuprofen-induced oxidative stress and neutrophil infiltration in gastric mucosa. *Free Radical Research*, 38(9), 903–911. <https://doi.org/10.1080/10715760410001705168>

Junqueira, LC, Carneiro, J.(2007). *Histologi Dasar*. Jakarta. Penerbit Buku Kedokteran EGC: 288-295.

Kaneko, H., Taché, Y., & Kusugami, K. (2002). Importance of medullary thyrotropin-releasing hormone in brain-gut circuits regulating gastric integrity: preclinical studies. *Journal of gastroenterology*, 37 Suppl 1, 128–32. Diambil dari <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12572880>

Kemmerly, T., & Kaunitz, J. D. (2014). Gastroduodenal Mucosal Defense Thomas. *Current Opinion in Gastroenterology*, 30(6), 583–588. <https://doi.org/10.1080/10810730902873927>. Testing

Kim, H. K., Kim, J. Il, Kim, J. K., Han, J. Y., Park, S. H., et al. (2007). Preventive effects of rebamipide on NSAID-induced gastric mucosal injury and reduction of gastric mucosal blood flow in healthy volunteers. *Digestive Diseases and Sciences*, 52(8), 1776–1782. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9367-y>

Kim, T.-H., & Shivdasani, R. A. (2016). Stomach development, stem cells and disease. *Development*, 143(4), 554–565. <https://doi.org/10.1242/dev.124891>

Koike, T., Shimada, T., Fujii, Y., Chen, G., Tabei, K., et al. (2007). Up-regulation of TFF1 (pS2) expression by TNF- α in gastric epithelial cells. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 22(6), 936–942. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.04861.x>

Konturck SJ, Brzozowski T, Majka I, Pawlik W, Stachura J. (1994) Omentum and basic fibroblast growth factor in healing of chronic gastric ulcerations in rats. *Dig Dis Sci*, 39: 1064-1071.

Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. (2015). Inflammation and Repair. In *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease* (Ninth, hal. 69–111). Elsevier. Diambil dari <http://clintransmed.springeropen.com/articles/10.1186/2001-1326-3-19>

Laine, L., Takeuchi, K., & Tarnawski, A. (2008). Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 135, 41–60. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2010.02.006>

Lanas, A., & Chan, F. K. L. (2017). Peptic ulcer disease. *The Lancet*, 390(10094), 613–624. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32404-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32404-7)

Lanas, A., García-Rodríguez, L. A., Polo-Tomás, M., Ponce, M., Quintero, E., Pérez-Aisa, M. A., ... Calvet, X. (2011). The changing face of hospitalisation due to gastrointestinal bleeding and perforation. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 33(5), 585–591. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04563.x>

Lichtenberger LM, Zhou Y, Dial EJ, Raphael RM.(2006). NSAID injury to the gastro- intestinal tract: evidence that NSAIDs interact with phospholipids to

weaken the hydrophobic surface barrier and induce the formation of unstable pores in membranes. *J Pharm Pharmacol*, 58: 1421–8.

Ma, L., del Soldato, P., Wallace, J.L. (2002). Divergent effects of new cyclooxygenase inhibitors on gastric ulcer healing: shifting the angiogenic balance. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol.99, No.20, (October 2002), pp. 13243-13247

Mackay, D., & Miller, A. L. (2003). Nutritional Support for Wound Healing. *Alternative Medicine Review*, 8(4), 359–377. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.09.027>

Mahadevan, V. (2017). Anatomy of the stomach. *Surgery (United Kingdom)*, 35(11), 608–611. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.08.004>

Majumdar, D., Bebb, J., & Atherton, J. (2011). Helicobacter pylori infection and peptic ulcers. *Medicine*, 39(3), 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2010.12.003>

Malfetheriner, P., Chan, F. K., & McColl, K. EL. (2009). Peptic ulcer disease. *The Lancet*, 374(9699), 1449–1461. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60938-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60938-7)

Milani, S., & Calabrò, A. (2001). Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. *Microscopy Research and Technique*, 53(5), 360–371. <https://doi.org/10.1002/jemt.1104>

Mills, J. C., & Shivdasani, R. A. (2011). Gastric epithelial stem cells. *Gastroenterology*, 140(2), 412–424. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.12.001>

Modlin, I. M., Kidd, M., Lye, K. D., & Wright, N. A. (2003). Gastric stem cells: An update. *Keio Journal of Medicine*, 52(2), 134–137. <https://doi.org/10.2302/kjm.52.134>

Musumba, C., Pritchard, D. M., & Pirmohamed, M. (2009). Review article: Cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 30(6), 517–531. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2009.04086.x>

Nagano Y, Matsui H, Muramatsu M, et al. (2005). Rebamipide significantly inhibits indomethacin-induced mitochondrial damage, lipid peroxidation, and apoptosis in gastric epithelial RGM-1 cells. *Dig Dis Sci*, 50(Suppl 1): S76–83

Orrenius S. (2007). Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev*, 39: 443–55.

Pai, R., Szabo, IL, Soreghan, BA, Atay, S., Kawanaka, H., et al. (2001). PGE2 stimulates VEGF expression in endothelial cells via ERK2/JNK1 signaling pathways. *Biochem Biophys Res Comm*, Vol.286, No.5: pp. 923-928

Pížem, J., & Cör, A. (2003). Detection of apoptotic cells in tumour paraffin sections. *Radiol Oncol*, 37(4), 225–232. <https://doi.org/10.1088/0953-4075/43/8/085208>

Que, J., Okubo, T., Goldenring, J. R., Nam, K.-T., Kurotani, R., et al. (2007). Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Development*, 134(13), 2521–2531. <https://doi.org/10.1242/dev.003855>

Rahman, M., Hossain, S., Rahaman, A., Fatima, N., Nahar, T., & Uddin, B. (2013). Antioxidant Activity of Centella asiatica (Linn.) Urban: Impact of

Extraction Solvent Polarity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(6), 27–32.

Regula, J., Butruk, E., Dekkers, C. P. M., De Boer, S. Y., Raps, D., et al. (2006). Prevention of NSAID-associated gastrointestinal lesions: A comparison study pantoprazole versus omeprazole. *American Journal of Gastroenterology*, 101(8), 1747–1755. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00686.x>

Sairam K, Rao CV, Goel RK. (2001). Effect of *Centella asiatica* Linn on physical and chemical factors induced gastric ulceration and secretion in rats. *Indian J Exp Biol*, 39:137-42

Satoh, H., Shino, A., Sato, F., Asano, S., Murakami, I., et al. (1997). Role of endogenous basic fibroblast growth factor in the healing of gastric ulcers in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, 73(1), 59–71. <https://doi.org/10.2307/505723>

Scarpignato, C., & Hunt, R. H. (2010). Nonsteroidal Antiinflammatory Drug-Related Injury to the Gastrointestinal Tract: Clinical Picture, Pathogenesis, and Prevention. *Gastroenterology Clinics of North America*, 39(3), 433–464. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2010.08.010>

Scarpignato, C., Lanas, A., Blandizzi, C., Lems, W. F., Hermann, M., et al. (2015). Safe prescribing of non-steroidal anti-inflammatory drugs in patients with osteoarthritis - an expert consensus addressing benefits as well as gastrointestinal and cardiovascular risks. *BMC Medicine*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0285-8>

Schepers, G. E., Teasdale, R. D., & Koopman, P. (2002). Twenty Pairs of Sox. *Developmental Cell*, 3(2), 167–170. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00223-X](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00223-X)

Schmassmann, A. (1998). Mechanisms of Ulcer Healing and Effects of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *Am J Med*, 104(3A), 43S–51S.

Shetty, B. S., Udupa, S. L., Udupa, A. L., & Somayaji, S. N. (2006). Effect of *Centella asiatica* L (Umbelliferae) on normal and dexamethasone-suppressed wound healing in Wistar albino rats. *International Journal of Lower Extremity Wounds*, 5(3), 137–143. <https://doi.org/10.1177/1534734606291313>

Singh, S., Gautam, A., Sharma, A., & Batra, A. (2010). *Centella asiatica* (L.): A plant with immense medicinal potential but threatened. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 4(2), 9–17.

Soini, Y., Paakko, P., & Lehto, V. P. (1998). Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *American Journal of Pathology*, 153(4), 1041–1053. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65649-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65649-0)

Soybel, D. I. (2005). Anatomy and physiology of the stomach. *Surgical Clinics of North America*, 85(5), 875–894. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2005.05.009>

Srivastava R, Shukla YN, Kumas S. (1997). Chemistry and pharmacology of *Centella asiatica*: a review. *J Med Arom Plant Sci*, 19:1049-56.

Stadelmann, W., et al. (1998). Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surgery*, Vol.176, No.suppl 2A: pp. 26S-38S

- Sung, J. J. Y., Kuipers, E. J., & El-Serag, H. B. (2009). Systematic review: The global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 29(9), 938–946. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2009.03960.x>
- Sverden, E. (2017). *Complicated Peptic Ulcer Disease - Prevention and Treatment*. Karolinska Institutet.
- Syam, A. F., Sadikin, M., Wanandi, S. I., & Rani, A. A. (2009). Molecular mechanism on healing process of peptic ulcer. *Acta medica Indonesiana*, 41(2), 95–8. Diambil dari <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19390129>
- Szabo S, Folkman F, Vattay P, Morales RE, Pinkus GS, Kato K. (1994). Accelerated healing of duodenal ulcers by oral administration of a mutein of basic fibroblast growth factor in rats. *Gastroenterology*, 106:1106-1111.
- Szabo, I.L., Pai, R., Soreghan, B., Jones MK., Baatar D., et al. (2001). NSAIDs inhibit the activation of egr-1 gene in microvascular endothelial cells. A key to inhibition of angiogenesis? *J Physiol (Paris)*, Vol.95, No.1-6: pp. 379-383
- Szabo, S., & Vincze, a. (2000). Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies. *Journal of physiology, Paris*, 94, 77–81. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(00\)00146-7](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(00)00146-7)
- Szabo, S., Kusstatscher, S., Sakoulas, G., Sandor, Z., Vincze, Á., & Jadus, M. (1995). Growth factors: New “endogenous drugs” for ulcer healing. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 30(S210), 15–18. <https://doi.org/10.3109/00365529509090262>
- Takeuchi, K. (2012). Pathogenesis of NSAID-induced gastric damage: Importance of cyclooxygenase inhibition and gastric hypermotility. *World Journal of Gastroenterology*, 18(18), 2147–2160. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i18.2147>
- Takeuchi, K., Tanaka, A., Kato, S., Amagase, K., & Satoh, H. (2010). Roles of COX inhibition in pathogenesis of NSAID-induced small intestinal damage. *Clinica Chimica Acta*, 411(7–8), 459–466. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.12.026>
- Tanaka, A. (2002). Up-Regulation of Cyclooxygenase-2 by Inhibition of Cyclooxygenase-1: A Key to Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Intestinal Damage. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300(3), 754–761. <https://doi.org/10.1124/jpet.300.3.754>
- Tanaka, A., Matsumoto, M., Hayashi, Y., & Takeuchi, K. (2005). Functional mechanism underlying cyclooxygenase-2 expression in rat small intestine following administration of indomethacin: Relation to intestinal hypermotility. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 20(1), 38–45. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2004.03520.x>
- Tarnawski, A. S., & Jones, M. K. (2003). Inhibition of angiogenesis by NSAIDs: Molecular mechanisms and clinical implications. *Journal of Molecular Medicine*, 81(10), 627–636. <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0479-y>
- Tarnawski, A., Szabo, I. L., Husain, S. S., & Soreghan, B. (2001). Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways. *Journal of Physiology Paris*, 95(1–6), 337–344. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(01\)00046-8](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(01)00046-8)
- Taupin, D., & Podolsky, D. K. (2003). Trefoil factors: Initiators of mucosal healing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(9), 721–732.

<https://doi.org/10.1038/nrm1203>

Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Hwang, H. J., Mio, M., et al. (2004). Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions. *Biochemical Pharmacology*, 67(3), 575–585. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.09.020>

Wallace, J. L., McKnight, W., Reuter, B. K., & Vergnolle, N. (2000). NSAID-Induced gastric damage in rats: Requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology*, 119(3), 706–714. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.16510>

Weina, K., & Utikal, J. (2014). SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clinical and Translational Medicine*, 3(1), 19. <https://doi.org/10.1186/2001-1326-3-19>

Whittle, B. J. R. (2003). Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Fundamental & clinical pharmacology*, 17(3), 301–13. <https://doi.org/10.1046/j.1472-8206.2003.00135.x>

Widjaja, H. 2007. Anatomi Abdomen. Jakarta. Penerbit Buku Kedokteran EGC: 53-54.



1. Hasil Statistik

Tes Normalitas Ekspresi bFGF

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Presentase Ekspresi bFGF	.164	18	.200*	.917	18	.113

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Tes Homogenitas Ekspresi bFGF

Test of Homogeneity of Variances

Presentase Ekspresi bFGF

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.416	5	12	.038

Tes Kruskal Wallis Ekspresi bFGF

Test Statistics^{a,b}

	Presentase Ekspresi bFGF
Chi-Square	15.784
df	5
Asymp. Sig.	.007

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

Perlakuan

Tes Post Hoc Dunnett Method Ekspresi bFGF

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Presentase Ekspresi bFGF

Dunnett T3

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok Kontrol Positif	Kelompok Kontrol Negatif	52.50000	9.58361	.069	-6.4126	111.4126
	Kelompok Kontrol Positif dibunuh hari ke 8	-3.33333	6.74578	1.000	-38.3505	31.6838
	Kelompok Perlakuan Dosis 1	-53.63333	11.81125	.135	-134.8636	27.5969
	Kelompok Perlakuan Dosis 2	-76.63333*	11.11870	.046	-150.8065	-2.4602
	Kelompok Perlakuan Dosis 3	-173.70000*	4.81445	.001	-209.2055	-138.1945
Kelompok Kontrol Negatif	Kelompok Kontrol Positif	-52.50000	9.58361	.069	-111.4126	6.4126
	Kelompok Kontrol Positif dibunuh hari ke 8	-55.83333	9.79841	.055	-113.6973	2.0306
	Kelompok Perlakuan Dosis 1	-106.13333*	13.78437	.015	-179.9550	-32.3116
	Kelompok Perlakuan Dosis 2	-129.13333*	13.19579	.006	-198.6157	-59.6510
	Kelompok Perlakuan Dosis 3	-226.20000*	8.58383	.005	-299.8187	-152.5813
Kelompok Kontrol Positif dibunuh hari ke 8	Kelompok Kontrol Positif	3.33333	6.74578	1.000	-31.6838	38.3505
	Kelompok Kontrol Negatif	55.83333	9.79841	.055	-2.0306	113.6973
	Kelompok Perlakuan Dosis 1	-50.30000	11.98620	.154	-129.5674	28.9674
	Kelompok Perlakuan Dosis 2	-73.30000*	11.30437	.048	-145.7286	-.8714
	Kelompok Perlakuan Dosis 3	-170.36667*	5.22898	.002	-210.1476	-130.5857
Kelompok Perlakuan Dosis 1	Kelompok Kontrol Positif	53.63333	11.81125	.135	-27.5969	134.8636
	Kelompok Kontrol Negatif	106.13333*	13.78437	.015	32.3116	179.9550
	Kelompok Kontrol Positif dibunuh hari ke 8	50.30000	11.98620	.154	-28.9674	129.5674
	Kelompok Perlakuan Dosis 2	-23.00000	14.89258	.800	-100.1637	54.1637
	Kelompok Perlakuan Dosis 3	-120.06667*	11.01554	.033	-217.4414	-22.6919
Kelompok Perlakuan Dosis 2	Kelompok Kontrol Positif	76.63333*	11.11870	.046	2.4602	150.8065
	Kelompok Kontrol Negatif	129.13333*	13.19579	.006	59.6510	198.6157
	Kelompok Kontrol Positif dibunuh hari ke 8	73.30000*	11.30437	.048	.8714	145.7286
	Kelompok Perlakuan Dosis 1	23.00000	14.89258	.800	-54.1637	100.1637
	Kelompok Perlakuan Dosis 3	-97.06667*	10.26948	.043	-187.2020	-6.9313
Kelompok Perlakuan Dosis 3	Kelompok Kontrol Positif	173.70000*	4.81445	.001	138.1945	209.2055
	Kelompok Kontrol Negatif	226.20000*	8.58383	.005	152.5813	299.8187

Kelompok Kontrol Positif dibunuh hari ke 8	170.36667*	5.22898	.002	130.5857	210.1476
Kelompok Perlakuan Dosis 1	120.06667*	11.01554	.033	22.6919	217.4414
Kelompok Perlakuan Dosis 2	97.06667*	10.26948	.043	6.9313	187.2020

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



2. Persetujuan Etik Penelitian



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 229 / EC / KEPK – S2 / 09 / 2018

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

- JUDUL** : Pengaruh Ekstrak Ethanol Pegagan (*Centella Asiatica*) terhadap Ekspresi BFGF dan SOX-2 pada Sampel Biologis Tersimpan dari Hewan Coba *Rattus novergicus* Model Ulkus Peptikum.
- PENELITI UTAMA** : Iffa Aulia Hakim
- UNIT / LEMBAGA** : S2 Ilmu Biomedik - Fakultas Kedokteran - Universitas Brawijaya Malang.
- TEMPAT PENELITIAN** : Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.



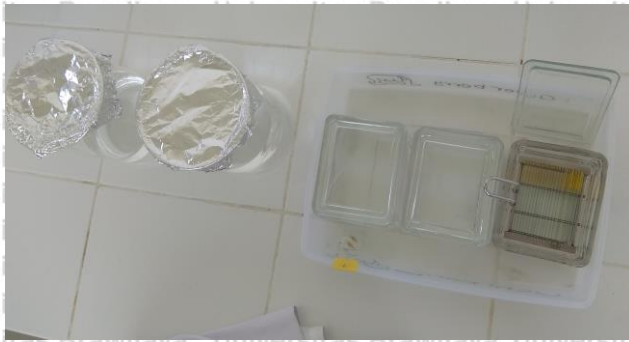
Prof. Dr. Dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr.H.
NIK. 160740863

Catatan :

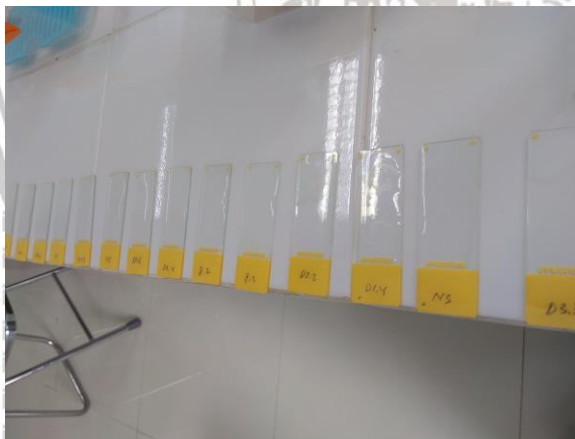
Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Hasil Pelaksanaan Penelitian Wajib Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).

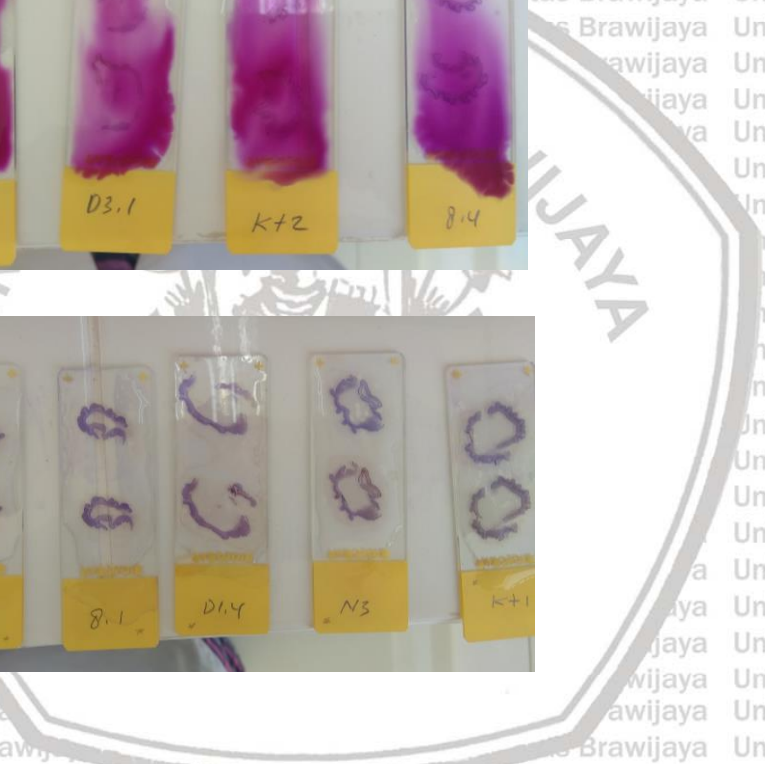
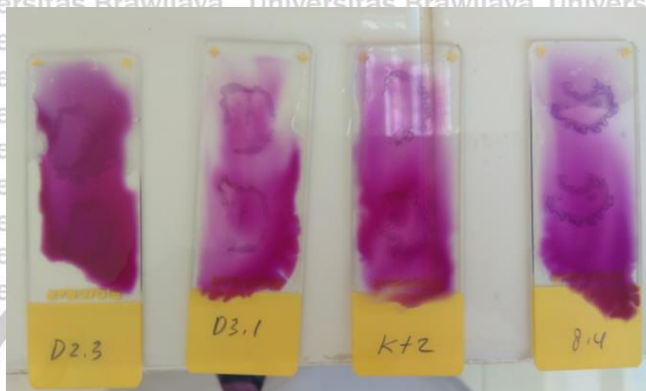
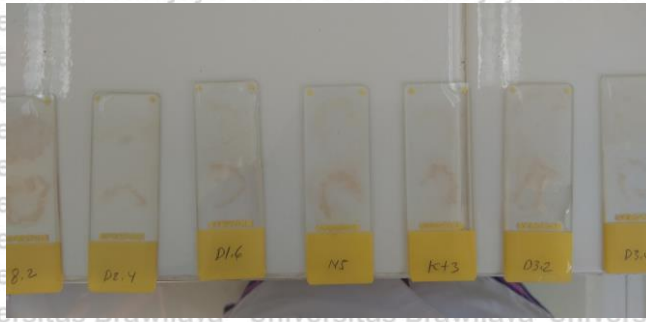
3. Dokumentasi Penelitian

a. Deparafinisasi

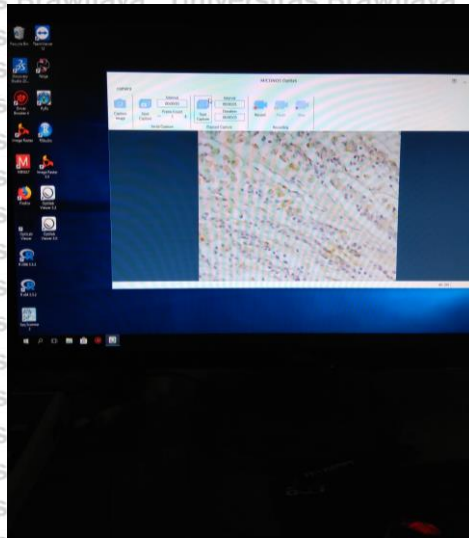


b. Immunostaining





ca. Pengamatan Ekspresi bFGF dan Sox-2 pada Mikroskop Kamera



4. **Bukti Submit dan Accepted Jurnal**

Paper Received Notification Inbox x

 **Ijisrt digital library** <ijisrt@gmail.com> Thu, Dec 20, 1:39 PM (6 days ago) ☆ ↶ ⋮
to me ▾

Hello Author,

Paper ID:- "IJISRT18DC230"

Paper Title :- " Centella asiatica Extract Increased Expression of bFGF but not Sox-2 in Peptic Ulcer Model in Rats Induced by Indomethacin ..."


We have received your submitted paper and your paper is in the process of review. It takes 1-2 days and once completed we will notify you the paper's acceptance/rejection decision.

For any query reply us.

Thanks

Yours sincerely,
Chief-in-Editor
International Journal of Innovative Science and Research Technology(IJISRT)
www.ijisrt.com
ISSN No :- 2456-2165
Impact Factor :- 5.15

Paper Acceptance Notification for Paper ID "IJISRT18DC230" Inbox x

 **Ijisrt digital library** <ijisrt@gmail.com> Sat, Dec 22, 4:35 PM (4 days ago) ☆ ↶ ⋮
to me ▾

Hello Author ,

Greetings of the day

Paper ID:- "IJISRT18DC230"

Paper Title :- " Centella asiatica Extract Increased Expression of bFGF but not Sox-2 in Peptic Ulcer Model in Rats Induced by Indomethacin ..."

Congratulations.....

We are happy to inform you that your research paper has been "Accepted" for publishing in "International Journal of Innovative Science and Research Technology". After completion of the registration processes, your research paper will be available on our office website (www.ijisrt.com) in Volume 3 - December - Issue 12, 2018.