

repository.ub.ac.id

**KAJIAN EFEK EKSTRAK METANOL AKAR TAMBOLEKAR
(*Coptosapelta flavesrens Korth*) SEBAGAI
BRONKODILATOR dan ANTIINFLAMASI**

DISERTASI

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Doktor



Oleh

KHEMASILI KOSALA

117070100011057

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

MINAT BIOMEDIK

JURUSAN KEDOKTERAN FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019



DISERTASI

KAJIAN EFEK EKSTRAK METANOL AKAR TAMBOLEKAR (*Coptosapelta flavescent Korth*) SEBAGAI BRONKODILATOR DAN ANTIINFLAMASI

Oleh:

KHEMASILI KOSALA

Dipertahankan di depan penguji
Pada Tanggal : 20 Maret 2019
Dan dinyatakan memenuhi syarat

Komisi Pembimbing,

Prof.dr. M. Aris Widodo, MS., SpFK, Ph.D.
Promotor

Prof.Dr.dr. Sanarto Santoso, DTM&H, SpMK.(K).
Ko-Promotor 1

Dr.dr. Setyawati Soeharto, M.Kes.
Ko-Promotor 2

Dr.dr. Wisnu Barlianto, MSi.Med.,SpA.(K).
Penguji 1

Dr.dr. Susanty Diazalaksana, SpP.(K).
Penguji 2

Prof. Dr. Sriko Hardjono, MS., Apt.
Penguji Luar

Malang,
Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan,

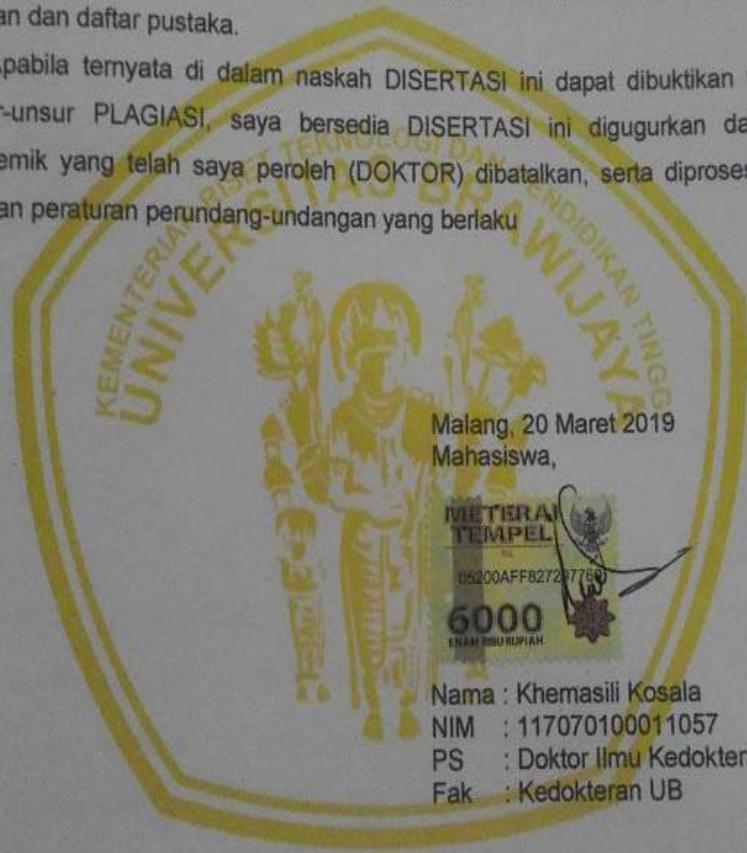


Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si, Med, Sp.A(K)
NIP197307262005011008

PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah DISERTASI ini tidak terdapat karya ilmiah yang diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pemah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila temyata di dalam naskah DISERTASI ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia DISERTASI ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (DOKTOR) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku



Nama : Khemasili Kosala
NIM : 117070100011057
PS : Doktor Ilmu Kedokteran
Fak : Kedokteran UB

IDENTITAS TIM PENGUJI DISERTASI
JUDUL DISERTASI: **KAJIAN EFEK EKSTRAK METANOL AKAR TAMBOLEKAR (*Coptosapelta flavescentis* Korth) SEBAGAI BRONKODILATOR dan ANTIINFLAMASI**

Nama Mahasiswa : Khemasili Kosala
NIM : 117070100011057
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Minat : Biomedik

KOMISI PROMOTOR :
Promotor : Prof.dr.M.Aris Widodo,MS.,SpFK.,PhD.
Ko-Promotor 1 : Prof.Dr.dr.Sanarto Santoso,DTM&H.,SpMK.,(K)
Ko-Promotor 2 : Dr.dr.Setyawati Soeharto,M.kes.

TIM DOSEN PENGUJI :
Dosen Penguji 1 : Dr.dr.Wisnu Barlianto, Msi.Med.,SpA.(K)
Dosen Penguji 2 : Dr.dr. Susanthy Djajalaksana, SpP.(K)
Dosen Penguji 3 : Prof.Dr. Sukohardjono, Drs.,Apt.,M.S.

Tgl Ujian Tertutup : 4 Desember 2018
Tgl Ujian Terbuka : 20 Maret 2019

KOMUNIKASI dan PUBLIKASI ILMIAH

Khemasili Kosala, Moch. Aris Widodo, Sanarto Santoso, Setyawati Soeharto. *In vitro* study of the bronchial relaxation mechanism of *Coptosapelta flavesrens* Korth root's methanol extract on receptors. Indian Journal of Public Health Research & Development. 2019; xx(x):xxx-xxx

Khemasili Kosala, Moch. Aris Widodo, Sanarto Santoso, Setyawati Soeharto. *In vitro* study of the bronchorelaxation effect of *Coptosapelta flavesrens* Korth root's extract and fractions. Asian J Pharm Clin Res, 2019;12(4):xxx-xxx April 2019

Khemasili Kosala, Moch. Aris Widodo, Sanarto Santoso, Setyawati Karyono. *In vitro* and *In vivo* Anti-inflammatory Activities of *Coptosapelta flavesrens* Korth Root's Methanol Extract. Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 8(09), pp 042-048, September, 2018. DOI:10.7324/JAPS.2018.8907, ISSN 2231-3354, Available online at <http://www.japsonline.com>

Khemasili Kosala, Sjarif Ismail, Ika Fikriah, Agustina Rahayu Magdaleni. *In vitro* Exploration of Vasodilation Activity of the Methanol Extract of the *Coptosapelta flavesrens* Korth stem. Journal of Islamic Medicine Research, 2017 Volume 1, No 2. December 2017 P 10-14, E-ISSN: 2580 927X, <http://riset.unisma.ac.id/index.php/fk>

Sjarif Ismail, **Khemasili Kosala**, Ika Fikriah, Agustina Rahayu Magdaleni. Mechanism of Vasorelaxation Induced by *Coptosapelta Flavescens* Stems Extract In Rat Thoracic Aorta. *J. Trop. Pharm. Chem.* 2017. Vol 4. No. 2. P 96-102, ISSN: 2087-7099; e-ISSN: 2407-609

Khemasili Kosala. Uji fitokimia dan toksitas fraksi ekstrak akar tambolekar (*Coptosapelta flavesrens* Korth) dengan reaksi warna dan *Brine Shrimp Lethal Test*. Molucca Medica Jurnal Kedokteran dan Kesehatan, 2015 8(1) p 98-104. ISSN 1979-6358

KATA PENGANTAR

Dengan memanjangkan puji syukur ke hadirat Tuhan YME, atas limpahan rahmat dan hidayah-Mu penulis dapat menyelesaikan disertasi atau disertasi yang berjudul:

KAJIAN EFEK EKSTRAK METANOL AKAR TAMBOLEKAR (*Coptosapelta flavescentis* Korth) SEBAGAI BRONKODILATOR dan ANTIINFLAMASI

Dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi tiga tahapan penelitian sebagai berikut : tahap pertama membahas mekanisme aktivitas ekstrak metanol akar Tambolekar sebagai bronkodilator melalui antagonis reseptor kolinergik, reseptor histamin, dan menstimulasi reseptor beta₂ adrenergik;

Tahap kedua membahas mekanisme aktivitas ekstrak metanol akar Tambolekari sebagai anti-inflamasi melalui hambatan edema kaki tikus yang diinduksi carrageenan; dan tahap ketiga membahas aktivitas ekstrak metanol akar Tambolekari sebagai anti-inflamasi dengan menstabilkan membran sel darah merah tikus.

Dengan selesainya disertasi/disertasi ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Pemerintah Daerah Propinsi Kalimantan Timur melalui Gubernur Kepala Daerah Tingkat I Propinsi Kalimantan Timur yang telah memberikan stimulan bantuan dana ‘Kaltim Cemerlang’ untuk pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran di Universitas Brawijaya.
 2. Rektor Universitas Brawijaya Malang Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani AR., MS.. dan mantan Rektor Prof. Dr. Ir. Mohammad Bisri, MS dan Prof. Dr. Ir. Yogi Sugito atas ijin dan kesempatan yang diberikan untuk mengikuti pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran di Universitas Brawijaya.

3. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Dr. dr. Wisnu Barianto, Msi. Med., SpA.(K), mantan dekan Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes. dan mantan Dekan Dr. dr. Karyono Mintaroem, SpPA atas kesempatan, dan fasilitas yang diberikan dalam penyelesaian pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
4. Ketua Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes., SpPK dan mantan KPS Prof. dr. M. Aris Widodo, MS., SpFK.,PhD. atas fasilitas dan kesempatan selama saya menempuh pendidikan Doktor.
5. Sekretaris Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Agustina Tri Endharti, Ssi.,ya PhD dan mantan Sekretaris Prodi Doktor Ilmu Kedokteran FKUB Dr. drg. Nur Permatasari MS. atas dorongan, bimbingan dan arahannya selama saya menempuh pendidikan Doktor.
6. Rektor Universitas Mulawarman, Prof. Dr. H.Masjaya, MSi. Atas ijin dan kesempatan yang diberikan untuk mengikuti pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran di Universitas Brawijaya.
7. Dekan Fakultas Kedokteran Unmul, dr. Ika Fikriah, M.Kes. dan mantan Dekan dr. Emil B. Moerad, SpP. yang telah memberikan ijin dan kesempatan bagi penulis untuk menempuh pendidikan Doktor.
8. Prof. dr. M. Aris Widodo, MS., SpFK.,PhD. selaku Promotor dan dosen MKPD yang telah banyak memberikan dukungan yang luar biasa, motivasi, wawasan, saran, waktu dan keikhlasan membimbing penulis.
9. Prof.Dr.dr.Sanarto Santoso,DTM&H,SpMK.,(K), selaku Kopromotor-1 dan Pembimbing Akademik yang telah banyak memberikan dukungan yang luar biasa, wawasan, saran, waktu dan segala keikhlasan membimbing penulis.

10. Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.Kes. selaku Kopromotor-2 dan dosen MKPD yang telah banyak memberikan koreksi, saran dan masukan yang berharga terutama dalam hal penulisan.
11. Dr. dr. Wisnu Barlianto, Msi, Med., SpA.(K), selaku penguji disertasi dan dosen MKPD atas koreksi, inspirasi, saran dan masukan yang sangat berharga kepada penulis.
12. Dr. dr. Susanthy Djajalaksana, SpP.(K), selaku penguji disertasi, atas koreksi, inspirasi, saran dan masukan yang sangat berharga kepada penulis.
13. Prof. Dr. Suko Hardjono, Drs., Apt., M.S. selaku penguji tamu, atas kesediaannya meluangkan waktu untuk menguji ke Malang, perhatian, pengertian, saran dan masukan kepada penulis.
14. Prof. Dr. dr. Sumarno Reto Prawiro, DMM., SpMK. (K). dan Prof. Dr. dr. Edi Widjajanto, MS., Sp.PK (K). selaku evaluator atas koreksi, saran dan masukan kepada penulis
15. Seluruh staf administrasi dilingkungan Pasca Sarjana Program Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah membantu melancarkan proses administrasi selama menjalani pendidikan Program Doktor.
16. Kepala Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman atas ijin penggunaan fasilitas dan kesempatan yang diberikan untuk melakukan penelitian.
17. Para teknisi Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.
18. Suami tercinta Johanes Nono Juwono dan anak-anakku tersayang Isa dan Wening atas curahan kasih sayang, kesetiaan, pengertian, pengorbanan, dukungan moril, kesabaran dan segalanya yang tak terhingga

19. Semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu, yang telah memberikan bantuan dan masukan dalam penyusunan disertasi.

Trima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak baik yang tersebut diatas, maupun yang tidak bisa disebutkan satu persatu. Semoga Tuhan Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang membalas semuanya dengan pahala yang berlipat.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, masih dirasakan banyak kekurangtepatan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 20 Maret 2019

Penulis



RINGKASAN

Khemasili Kosala, NIM. 117070100011057. Program Doktor Ilmu Kedokteran Jurusan Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, 20 Maret 2019. Kajian Efek Ekstrak Metanol Akar Tambolekar (*Coptosapelta flavescens* Korth) Sebagai Bronkodilator dan Antiinflamasi. Komisi Pembimbing Ketua: Prof.dr. M.Aris Widodo, MS.,SpFK.Ph.D., Anggota: Prof. Dr.dr. Sanarto Santoso, DTM&H., SpMK., (K); Dr.dr. Setyawati Soeharto, M.Kes.

Akar tanaman tambolekar (*Coptosapelta flavescens* Korth dengan sinonim *Coptosapelta Tomentosa*) secara *ethnobotani* digunakan oleh masyarakat Kalimantan selain untuk mengobati sesak napas atau asma, juga untuk mengobati sakit gigi maupun rematik. Sehingga akar Tambolekar diduga memiliki efek bronkodilator dan antiinflamasi. Sementara bukti ilmiah sebagai bronkodilator tidak ada, dan data mekanisme aksi antiinflamasi juga tidak jelas. Oleh sebab itu penelitian ini bertujuan mengevaluasi aktivitas bronkodilator dan antiinflamasi ekstrak metanol akar Tambolekar (*Coptosapelta flavescens* Korth). Ada tiga tahap penelitian.

Penelitian tahap 1 : Mengkaji aktivitas bronkorelaksasi ekstrak metanol akar Tambolekar (EMAT) secara *in vitro* melalui reseptor kolinergik, reseptor histamin dan beta₂ adrenoseptor.

Regulasi kontraktilitas otot polos saluran napas telah diketahui melalui reseptor kolinergik, reseptor histamin dan reseptor beta₂ adrenergik. Tujuan penelitian tahap 1 mengevaluasi aksi bronkorelaksasi EMAT dengan mekanisme: a) mengantagonis reseptor kolinergik, b) mengantagonis reseptor histamin dan c) menstimulasi beta₂ adrenoseptor, pada cincin bronkus guinea pig. Rancangan penelitian tahap 1 adalah eksperimental menggunakan bronkus terpisah guinea pig yang satu sisi dikaitkan pada alat *Transducer* isometrik pada *isolated organ bath*, sisi lainnya dihubungkan dengan *recorder* di computer. Ada tiga kelompok uji : a) cincin bronkus guinea pig dalam organ bath diinkubasi 10 menit dengan 3 dosis berbeda EMAT, lalu di kontraksi dengan metakolin dosis kumulatif; b) cincin bronkus guinea pig diinkubasi 10 menit dengan 3 dosis berbeda EMAT, lalu di kontraksi dengan histamin dosis kumulatif; dan c) cincin bronkus guinea pig diinkubasi dengan 3 dosis berbeda Propranolol, diprekontraksi dengan metakolin dosis tunggal lalu diberi EMAT dosis kumulatif. Data yang diperoleh dibuat Kurva dosis respon (KDR), sehingga diperoleh E_{maks} dan pD₂. Analisa data menggunakan ANOVA dengan p<0,05 dinyatakan berbeda bermakna.

Hasil yang didapatkan pada penelitian tahap 1 adalah a) KDR cincin bronkus yang diinkubasi EMAT 2, 4 dan 6 mg/ml dikontraksi dengan metakolin, bergeser kekanan dengan E_{maks} lebih kecil dan pD₂ (-log EC₅₀) lebih kecil dan berbeda bermakna (P<0,05) dibandingkan kontrol; b) KDR cincin bronkus yang diinkubasi EMAT 2, 3 dan 4 mg/ml dikontraksi dengan histamin, bergeser kekanan dengan E_{maks} lebih kecil dan pD₂ (-log EC₅₀) lebih kecil dan berbeda bermakna (P<0,05) dibandingkan kontrol; c) KDR cincin bronkus yang diinkubasi propranolol 0,5 , 1,0 dan 1,5 μM bergeser kekanan dengan E_{maks} tidak berbeda bermakna (P>0,05) dan pD₂ lebih kecil dan berbeda bermakna (P<0,05) dibandingkan KDR cincin bronkus yang tidak diinkubasi propranolol. Kesimpulan EMAT beraktivitas bronkorelaksasi dengan mekanisme: a) mengantagonis reseptor kolinergik secara nonkompetitif; b) mengantagonis reseptor histamin secara nonkompetitif dan c) men stimulasi reseptor beta₂ adrenergik.

Penelitian tahap 2: menguji aktivitas antiinflamasi EMAT dengan hambatan volume edema kaki tikus Wistar yang diinduksi carrageenan.

Reson inflamasi fase awal melibatkan sel mast yang melepaskan mediator histamin, serotonin, dan fase lambat pembentukan prostaglandin yang dikatalisir oleh enzim cyclooxygenase (COX). Untuk membuktikan akar tambolekar berefek antiinflamasi khususnya pada inflamasi fase awal, dengan pembentukan edema. Dan sekaligus ingin mengetahui EMAT bersifat mencegah atau mengobati inflamasi. Maka tujuan tahap 2 menguji aktivitas antiinflamasi EMAT setelah induksi carrageenan pada kaki tikus Wistar. Rancangan penelitian tahap 2 adalah eksperimental menggunakan tikus Wistar jantan yang diberi EMAT peroral 1 jam sebelum, saat dan 1 jam setelah induksi carrageenan. Pengukuran volume edema kaki tikus menggunakan alat Plethysmometer, dilaksanakan setiap jam setelah induksi carrageenan sampai jam ke 6 dilanjutkan jam ke 24. Analisa data menggunakan ANOVA dengan $p<0,05$ dinyatakan berbeda bermakna.

Hasil yang diperoleh adalah persen hambatan volume edema pada EMAT dosis 1200 mg/kg BB terjadi pada fase awal dan lambat bila pemberiannya 1 jam sebelum diinduksi carrageenan. EMAT dosis 1200 mg/kg BB pada saat dan 1 jam setelah induksi carrageenan, dan dosis 600 mg/kg BB 1 jam sebelum, saat dan 1 jam setelah induksi carrageenan, persen hambatan volume edema terjadi pada fase lambat. Kesimpulan EMAT dosis 600 mg/kg BB beraktivitas antiinflamasi dengan menghambat enzim cyclooxygenase, sementara EMAT dosis 1200 mg/kg BB menghambat pelepasan mediator inflamasi histamin, serotonin bradikinin dan juga menghambat enzim cyclooxygenase.

Penelitian tahap 3 : menguji aktivitas antiinflamasi dengan model menstabilkan membran RBC tikus secara invitro.

Infiltrasi leukosit terjadi selama respon inflamasi karena perannya sebagai bagian dari pertahanan tubuh terhadap inflamasi. Sel-sel ini melepaskan isi lisosomnya, yang menyebabkan kerusakan jaringan dan inflamasi lebih lanjut, dan memicu pelepasan fosfolipase A2 (PLA2). Isi lisosom neutrofil juga menginduksi degranulasi sel mast sehingga melepaskan histamin pada inflamasi fase awal. Karena membran *red blood cell* (RBC) memiliki karakteristik yang mirip dengan membran lisosom, dengan menstabilkan membran RBC yang diinduksi hipotonisitas analog dengan menstabilkan lisosom sehingga menghambat enzym lisis seperti PLA2 dan menghambat degranulasi sel mast sehingga menghambat pelepasan histamin.

Tujuan tahap 3 untuk mengkaji aktivitas antiinflamasi EMAT dengan menstabilkan membran RBC tikus Wistar yang diinduksi hiposalin. Rancangan penelitian juga eksperimental dengan menggunakan Red Blood Cell (RBC) tikus Wistar yang diberi berbagai konsentrasi EMAT dan Indometasin sebagai kontrol. Kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 560 nm di spektrofotometer. Hasil yang diperoleh adalah EC₅₀ pada EMAT ($1,905 \pm 0,119$) mg/ml lebih kecil dan berbeda bermakna ($p<0,05$) dibandingkan EC₅₀ Indometasin ($10,288 \pm 0,212$) mg/ml. Kesimpulan aktivitas antiinflamasi dengan menstabilkan membran sel darah merah pada EMAT lebih kuat dibandingkan Indometasin,

Dari hasil penelitian tahap 1, 2 dan 3 menunjukkan ekstrak metanol akar tambolekar terbukti beraktivitas bronkodilator dengan mekanisme mengantagonis reseptor kolinergik secara nonkompetitif, mengantagonis reseptor histamin secara nonkompetitif dan menstimulasi reseptor beta2 adrenergik pada cincin bronkus guineapig. Dan beraktivitas antiinflamasi dengan menghambat edema kaki tikus yang diinduksi carrageenan, serta menstabilkan membran sel darah merah tikus.

Kata kunci :Ekstrak metanol akar Tambolekar (*C.flavescens* Korth), bronkus guinea pig, bronkorelaksasi, antiinflamasi, carrageenan, stabilisasi membran RBC.

Khemasili Kosala, NIM. 117070100011057. Doctoral Program of Medical Faculty, Brawijaya University Malang, 20 Maret 2019. Study of the Effect of Tambolekar Root Methanol Extract (*Coptosapelta flavescens* Korth) as Bronchodilator and Anti-Inflammatory. Advisor Committee Head: Prof.dr. M.Aris Widodo, MS., SpFK.Ph.D., Members: Prof. Dr.dr. Sanarto Santoso, DTM & H., SpMK. (K) ; Dr.dr.Setyawati Karyono, M.Kes.

The roots of tambolekar plant (*Coptosapelta flavescens* Korth, synonym: *Coptosapelta Tomentosa*) are used ethnobotanically by the people in Borneo in addition to treating shortness of breath or asthma, also for treating toothache and rheumatism. So that the Tambolekar root is thought to have bronchodilator and anti-inflammatory effects. While scientific evidence as a bronchodilator does not exist, and the data on the mechanism of anti-inflammatory action are also unclear. Therefore this study aimed to evaluate the bronchodilator and anti-inflammatory activity of Tambolekar root (*Coptosapelta flavescens* Korth) methanol extract. There were three stages of research.

Stage 1 study: Test the bronchorelaxation activity of Tambolekar root methanol extract (EMAT) *in vitro* through cholinergic receptors, histaminic receptors and beta₂ adrenoceptors.

Regulations for airway smooth muscle contractility are known through cholinergic receptors, histaminic receptors and beta2 adrenergic receptors. The purpose of stage 1 was to evaluate the action of EMAT bronchial relaxation by the mechanism of: a) cholinergic receptor antagonists, b) histaminic receptor antagonists and c) stimulating beta2 adrenoceptor, on guinea pig bronchial ring. The design of the Stage 1 study was experimental using guinea pig isolated bronchus which on one side was connected to the isometric transducer in the isolated organ bath and another side was connected to the recorder on the computer. There were three test groups: a) guinea pig bronchial ring in the organ bath was incubated for 10 minutes with 3 difference EMAT doses, then contracted with cumulative doses of methacholine; b) guinea pig bronchial ring was incubated for 10 minutes with 3 difference EMAT doses then contracted with cumulative doses of histamine; and c) guinea pig bronchial ring was incubated with 3 difference doses of Propranolol, precontracted with a single dose of methacholine and then given cumulative dose of EMAT. The data obtained were presented in dose-response curves (DRC), E_{max} and pD_2 . Data analysis used ANOVA with $p < 0.05$ considered as significantly different.

The results obtained on stage 1 were a) DRC of bronchial ring incubated with EMAT 2, 4 and 6 mg/ml and contracted with methacholine shifted to the right with smaller E_{max} and smaller pD_2 (-log EC₅₀) and significantly different ($P<0.05$) compared with controls; b) DRC of bronchial ring incubated with EMAT 2, 3 and 4 mg/ml and contracted with histamine shifted to the right with smaller E_{max} and smaller pD_2 (-log EC₅₀) and significantly different ($P<0.05$) compared with controls; c) DRC of bronchial ring incubated with propranolol 0.5, 1.0 and 1.5 μ M shifted to the right with E_{max} was not significantly different ($P>0.05$) but pD_2 was smaller and significantly different ($P<0.05$) compared with the DRC of bronchial ring that was not incubated with propranolol. Conclusion: EMAT has bronchorelaxation activity as: a) non-competitive cholinergic receptor antagonist; b) non-competitive antagonists for histamine receptors and c) stimulating beta2 adrenergic receptor.

Stage 2 study: test EMAT anti-inflammatory activity by inhibiting the volume of edema of carageenan-induced Wistar rat's feet

Early phase of inflammation responds involves mast cells that release histamine, serotonin mediators while late phase involves the formation of prostaglandins catalyzed by the cyclooxygenase (COX) enzyme. To prove if tambolekar root has an anti-inflammatory effect, especially in the early phase of inflammation, with edema formation, and at the same time want to know EMAT prevents or treats inflammation. Then the purpose of stage 2 was to determine EMAT anti-inflammatory activity after induction of carrageenan in Wistar rat's feet. The design of stage 2 was experimental using male Wistar rats which were given EMAT orally 1 hour before, during and 1 hour after carrageenan induction. Measurement of volume of rat foot edema were done using Plethysmometer, carried out every hour after carrageenan induction until the 6th hour and continued to the 24th hour. Analysis of data was done using ANOVA with $p<0.05$ stated as significantly different.

The results obtained were: the percent inhibition of edema volume development on EMAT dose of 1200 mg/kg BW occurred both in the early phase and late phase when it was administered 1 hour before carrageenan induction. On EMAT dose of 1200 mg/kg BW administered during and 1 hour after carrageenan induction, and on EMAT dose of 600 mg/kg BW administered 1 hour before, during and 1 hour after carrageenan induction, the percent edema volume inhibition was found in the late phase. Conclusion: EMAT dose of 600 mg/kg BW had anti-inflammatory activity by inhibiting the cyclooxygenase enzyme, while EMAT dose of 1200 mg/kg BW inhibit the release of inflammatory mediators such as histamine, serotonin, and bradykinin and also inhibit the cyclooxygenase enzyme.

Stage 3 study: test anti-inflammatory activity with RBC membranes stabilization model *in vitro*.

Leukocyte infiltration occurs during inflammatory response due to its role as part of the body's defense against inflammation. These cells release the contents of their lysosomes, which cause further tissue damage and inflammation, and trigger the release of phospholipase A2 (PLA2). The contents of neutrophil lysosomes also induce mast cell degranulation such that it releases histamine in the early phase of inflammation. As red blood cell (RBC) membrane has similar characteristics as lysosomal membranes, stabilizing RBC membrane induced with hypotonicity is analogous with stabilizing lysosomes which inhibits lysis enzymes such as PLA2, inhibits mast cell degranulation and therefore, inhibits histamine release. The purpose of stage 3 was to study EMAT anti-inflammatory activity through stabilizing the hyposaline-induced RBC membrane of Wistar rats. The study design was also experimental using Red Blood Cell (RBC) of Wistar rats which were given various concentrations of EMAT and Indomethacin as controls. Then their absorbances were read at 560nm wavelength on the spectrophotometer.

The results obtained were EC₅₀ of EMAT (1.905 ± 0.119) mg/ml was smaller and significantly different ($p<0.05$) compared to EC₅₀ of Indomethacin (10.288 ± 0.212) mg/ml. Conclusion: Anti-inflammatory activity of EMAT by stabilizing red blood cell membrane was stronger than that of Indomethacin.

Conclusions from the results of stages 1, 2 and 3 showed that tambolekar root methanol extract had bronchodilator activity by noncompetitive cholinergic receptor antagonist mechanism, non-competitive histaminic receptor antagonist and stimulating beta2 adrenergic receptors on the guineapig bronchial ring, and had anti-inflammatory activities by inhibiting carrageenan-induced rat foot edema, and stabilizing rat red blood cell membranes.



Keywords: Tambolek root (*C.flavescens* Korth) methanol extract, guinea pig bronchus, bronchorelaxation, anti-inflammatory, carrageenan, RBC membrane stabilization.

DAFTAR ISI	Halaman
COVER	
LEMBAR PENGESAHAN	
PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI	
IDENTITAS TIM PENGUJI DISERTASI	
KOMUNIKASI DAN PUBLIKASI ILMIAH	
KATA PENGANTAR	
RINGKASAN	
SUMMARY	xii
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	
DAFTAR GAMBAR	
DAFTAR LAMPIRAN	
DAFTAR SINGKATAN	
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	
1.2 Rumusan Masalah	
1.2.1 Rumusan Masalah Utama	
1.2.2 Rumusan Sub Masalah	
1.3 Tujuan Penelitian	
1.3.1 Tujuan Umum	
1.3.2 Tujuan Khusus	
1.4 Manfaat Penelitian	
1.4.1 Manfaat Akademis	
1.4.2 Manfaat Praktis	
1.4.3 Manfaat Teoritis	
UNIVERSITAS BRAWIJAYA	

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 <i>Coptosapelta flavescens</i> Korth	7
2.1.1 Taksonomi dan Deskripsi	7
2.1.2 Kegunaan dan Kandungan	9
2.2 Anatomi dan Fisiologi Seluler Sistem Pernapasan	10
2.3 Otot Polos	13
2.3.1 Mekanisme Kontraksi Otot Polos	14
2.3.1.1 Kontraksi Otot Polos Tergantung Calcium	14
2.3.1.2 Kontraksi Otot Polos Dengan Mekanisme Sensitasi Ca^{2+}	16
2.3.2 Mekanisme Relaksasi Otot Polos	17
2.4 Asma	18
2.4.1 Patogenesis dan Patofisiologi Asma	18
2.4.2 Pengobatan Asma	23
2.4.2.1 Short Acting Beta ₂ -agonis	24
2.4.2.2 Antikolinergik	24
2.4.2.3 Xanthin	25
2.4.2.4 Kortikosteroid	25
2.4.2.5 Inhibitor dan Antagonis Leukotrien	26
2.4.2.6 Natrium Kromoglikat / Kromolin	27
2.4.3 Kontraksi dan Relaksasi Otot Polos Saluran Napas Asma	27
2.4.4 Regulasi Saraf dan Parakrin pada Kontraksi Otot Polos Saluran Napas	31
2.5 Reseptor Pada Saluran Napas	33
2.5.1 Reseptor Beta ₂ Adrenergik	33
2.5.1.1 Aktivasi dan Jalur Sinyal Beta ₂ Reseptor	33
2.5.1.2 Interaksi Beta ₂ Reseptor Agonis	35

2.5.1.3 Desensitisasi dan Polimorfisme Beta2 Adrenoseptor	37
2.5.2 Reseptor Kolinergik Muskarinik	38
2.5.2.1 Fungsi Reseptor M_2 dan M_3 pada Otot Polos Saluran Napas	39
2.5.2.2 Peran Asetilkolin di Reseptor Muskarinik Otot Polos Saluran Napas	40
2.5.3 Reseptor Histamin	41
2.5.3.1 Histamin	41
2.5.3.2 Reseptor Histamin H_1	42
2.5.3.3 Reseptor Histamin H_4	45
2.5.4 Reseptor Leukotrin	49
2.5.5 Reseptor Prostaglandin	50
2.6 Kurva Dosis Respon	51
2.6.1 Interaksi Obat-Reseptor Obat	51
2.6.2 Efikasi (E_{maks})	53
2.6.3 Potensi	54
2.6.4 Agonis	55
2.6.5 Antagonis	56
2.7 Pengukuran Respon Kontraksi Relaksasi Otot Polos Saluran Napas	59
2.8 Inflamasi	60
2.8.1 Respon Inflamasi	62
2.8.1.1 Perubahan/Reaksi Vaskuler	62
2.8.1.2 Perubahan / Reaksi Seluler	63
2.8.2 Granulosit (Leukosit Polimorfonuklear, PMN)	65
2.8.2.1 Neutrofil	65

2.8.2.2 Eosinofil	67
2.8.2.3 Basofil	67
2.8.3 Sel Mast	68
2.8.4 Monosit / Makrofag	69
2.8.5 Mediator Inflamasi	72
2.8.5.1 Faktor yang Dilepas dari Plasma	72
2.8.5.2 Faktor yang Dilepas dari Jaringan	74
2.8.6 Rekrutmen Leukosit ke Tempat Inflamasi	77
2.8.7 Fagositosis	77
2.8.8 Mekanisme Reaksi Penghambatan Mediator Inflamasi	81
2.8.8.1 Penghambatan COX	81
2.8.8.2 Penghambatan LOX	82
2.8.8.3 Penghambatan COX dan LOX	83
2.8.8.4 Penghambatan PLA2	83
2.8.8.5 Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs)	84
2.8.8.6 Nitric Oxide Synthase (NOS)	85
2.8.8.7 NF- κ B (<i>Nuclear transcription factor κB</i>)	85
2.9 Patogenesis Inflamasi pada Asma	86
2.9.1 Inflamasi Akut pada Asma	86
2.9.2 Inflamasi Kronis pada Asma	87
2.9.3 Aktivasi Eosinofil, Sel T CD4+, Sel Mast, Epitel dan Sitokin Pada Asma	87
2.10 Membran Sel	89
2.11 Pengukuran Aktivitas Antiinflamasi	90
2.11.1 Induksi Edema dengan Carrageenan pada Telapak	xviii

Universitas Brawijaya	Kaki Tikus	90
Universitas Brawijaya	2.11.2 Stabilisasi Membran Sel	91
Universitas Brawijaya	2.12 Kerangka Teori	93
Universitas Brawijaya	BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	95
Universitas Brawijaya	3.1 Kerangka Konsep	95
Universitas Brawijaya	3.2 Hipotesis	96
Universitas Brawijaya	3.2.1 Hipotesis Umum	96
Universitas Brawijaya	3.2.2 Hipotesis Khusus	96
Universitas Brawijaya	BAB 4 METODE PENELITIAN :	98
Universitas Brawijaya	PENELITIAN TAHAP 1:	
Universitas Brawijaya	UJI AKTIVITAS BRONKORELAKSASI EKSTRAK METANOL AKAR	
Universitas Brawijaya	TAMBOLEKAR (<i>Coptosapelta flavescens</i> Korth) SECARA <i>IN VITRO</i>	
Universitas Brawijaya	MELALUI RESEPTOR KOLINERGIK, RESEPTOR HISTAMIN DAN	
Universitas Brawijaya	BETA2 ADRENOSEPTOR.....	98
Universitas Brawijaya	4.1 Pendahuluan Tahap 1	98
Universitas Brawijaya	4.2 Metode Penelitian Tahap 1	99
Universitas Brawijaya	4.2.1 Rancangan Penelitian Tahap 1	99
Universitas Brawijaya	4.2.2 Tempat dan Waktu Penelitian Tahap 1	100
Universitas Brawijaya	4.2.3 Populasi dan Sampel Penelitian Tahap 1	100
Universitas Brawijaya	4.2.3.1 Populasi	100
Universitas Brawijaya	4.2.3.2 Jumlah Sampel	100
Universitas Brawijaya	4.2.4 Alat dan Bahan Penelitian Tahap 1.....	101
Universitas Brawijaya	4.2.4.1 Alat dan Bahan untuk Ekstraksi Simplicia Akar	
Universitas Brawijaya	Tambolekar	101
Universitas Brawijaya	4.2.4.2 Alat dan Bahan untuk Preparasi Bronkus	
Universitas Brawijaya	Guinea pig	101
Universitas Brawijaya	4.2.5 Variabel Penelitian Tahap 1.....	101
Universitas Brawijaya	4.2.6 Alur Penelitian Tahap 1.....	102
Universitas Brawijaya	4.2.7 Definisi Operasional Variabel	104

4.2.8	Prosedur Kerja	106
4.2.8.1	Pembuatan Larutan Ekstrak metanol akar Tambolekar dan bahan obat	106
4.2.8.2	Pembuatan Larutan Kreb's-Henseleit	107
4.2.8.3	Preparasi Organ Terpisah Cincin Bronkus	107
4.2.8.4	Perlakuan terhadap Organ Terpisah Cincin Bronkus	108
4.2.8.5	Perhitungan persen kontraksi/ relaksasi	109
4.2.9	Analisa Data	109
PENELITIAN TAHAP 2:		
UJI AKTIVITAS ANTI-INFLAMASI EKSTRAK METANOL AKAR TAMBOLEKAR (<i>Coptosapelta Flavescens</i> KORTH) MELALUI HAMBATAN VOLUME EDEMA KAKI TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI CARRAGEENAN		110
4.3	Pendahuluan Tahap 2	110
4.4	Metode Penelitian Tahap 2	111
4.4.1	Rancangan Penelitian Tahap 2	111
4.4.2	Tempat dan Waktu Penelitian Tahap 2	112
4.4.3	Populasi dan Sampel Penelitian Tahap 2	112
4.4.3.1	Populasi	112
4.4.3.2	Jumlah Sampel Tahap 2	112
4.4.4	Alat dan Bahan Tahap 2	113
4.4.5	Variabel Penelitian Tahap 2	113
4.4.6	Definisi Operasional Variabel	113
4.4.7	Alur Penelitian Tahap 2	114
4.4.8	Prosedur Kerja Tahap 2	114
4.4.8.1	Pembuatan Larutan Ekstrak metanol akar Tambolekar dan bahan obat	114
4.4.8.2	Perlakuan pada Tikus	115
4.4.9	Analisa Data	116

PENELITIAN TAHAP 3:	
UJI AKTIVITAS ANTI-INFLAMASI EKSTRAK METANOL AKAR TAMBOLEKAR (<i>Coptosapelta Flavescens</i> Korth) MELALUI STABILISASI MEMBRAN RED BLOOD CELL (RBC) TIKUS YANG DI INDUKSI HIPOTONISITAS	117
4.5 Pendahuluan Tahap 3	117
4.6 Metode Penelitian Tahap 3	119
4.6.1 Rancangan Penelitian Tahap 3	119
4.6.2 Tempat dan Waktu Penelitian Tahap 2	119
4.6.3 Jumlah sampel Tahap 3	119
4.6.4 Alat dan Bahan Penelitian Tahap 3	119
4.6.5 Variabel Penelitian	120
4.6.6 Definisi Operasional Variabel	120
4.6.7 Alur Penelitian Tahap 3	121
4.6.8 Prosedur Kerja	121
4.6.8.1 Pembuatan Larutan Ekstrak metanol akar Tambolekar dan bahan obat	121
4.6.8.2 Persiapan Suspensi Red Blood Cell (RBC)	122
4.6.9 Analisa Data	123
BAB 5 HASIL PENELITIAN	124
5.1 Hasil Penelitian Tahap 1	124
5.1.1 Hasil Rendemen Ekstrak Metanol Akar Tambolekar	124
5.1.2 Hasil Uji Aktivitas Bronkorelaksasi EMAT Melalui antagonis Reseptor Kolinergik	124
5.1.3 Hasil Uji Aktivitas Bronkorelaksasi EMAT Melalui antagonis Reseptor Histamin (H_1)	128
5.1.4 Hasil Uji Aktivitas Bronkorelaksasi EMAT melalui Agonis Reseptor Beta ₂ Adrenergik	131
5.2 Hasil Penelitian Tahap 2	135

5.2.1 Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus dengan Pemberian EMAT Satu Jam Sebelum Induksi Carrageenan	135
5.2.2 Persen Peningkatan Volume Edema kaki Tikus dengan Pemberian EMAT Pada Saat Induksi Carrageenan	138
5.2.3 Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus Dengan Pemberian EMAT Satu Jam Setelah Induksi Carrageenan	141
5.2.4 Aktivitas Antiinflamasi EMAT2 (600 mg/KgBB) Pada Pemberian Satu jam Sebelum, Saat dan Satu jam Setelah Induksi Carrageenan	144
5.2.5 Aktivitas Antiinflamasi EMAT3 (1200 mg/KgBB) Pada Pemberian Satu Jam Sebelum, Saat dan Satu Jam Setelah Induksi Carrageenan	146
5.3 Hasil Penelitian Tahap 3	149
BAB 6 PEMBAHASAN	151
6.1 Pembahasan Penelitian Tahap 1	151
6.1.1 Aktivitas Bronkorelaksasi EMAT melalui Antagonis Reseptor Kolinergik	152
6.1.2 Aktivitas Bronkorelaksasi EMAT melalui Antagonis Reseptor Histamin	154
6.1.3 Aktivitas Bronkorelaksasi EMAT melalui Agonis Reseptor Beta ₂ Adrenergik	155
6.2 Pembahasan Penelitian Tahap 2	158
6.3 Pembahasan Penelitian Tahap 3	159
6.4 Pembahasan Umum	162
6.5 Keterbaruan Penelitian	169
6.6 Keterbatasan Penelitian	169
BAB 7 KESIMPULAN dan SARAN	170



7.1	Kesimpulan Tahap 1	170
7.2	Kesimpulan Tahap 2	170
7.3	Kesimpulan Tahap 3	171
7.4	Kesimpulan Umum	171
7.5	Saran	171
DAFTAR PUSTAKA		173
LAMPIRAN		185

DAFTAR TABEL		
Tabel 2.1	Jenis Reseptor Histamin dan Efek Biologisnya	42
Tabel 4.1	Pembagian Kelompok Perlakuan.....	112
Tabel 5.1	E_{maks} dan pD ₂ Cincin Bronkus yang di Inkubasi EMAT 3 Konsentrasi dan diberi Metakolin Dosis Kumulatif	126
Tabel 5.2	E_{maks} dan pD ₂ Cincin Bronkus yang di Inkubasi EMAT 3 Konsentrasi dan diberi Histamin Dosis Kumulatif	129
Tabel 5.3	E_{maks} dan pD ₂ Cincin Bronkus yang di Inkubasi Propranolol 3 Konsentrasi, Pre kontraksi Metakolin Lalu di Beri EMAT di Bandingkan Terhadap Persen Relaksasi Cincin Bronkus tanpa Inkubasi Propranolol	132
Tabel 5.4	Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus dengan Pemberian EMAT 1 Jam Sebelum Induksi Carrageenan	137
Tabel 5.5	Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus, Saat Induksi Carrageenan diberi EMAT	139
Tabel 5.6	Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus dengan Pemberian EMAT 1 Jam Sesudah Induksi Carrageenan	143
Tabel 5.7	Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus dengan Pemberian EMAT2 1 Jam Sebelum, Saat dan 1 Jam Setelah Induksi Carrageenan	144
Tabel 5.8	Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus dengan Pemberian EMAT3 1 Jam Sebelum, Saat dan 1 Jam Setelah Induksi Carrageenan	147
Tabel 5.9	Persen Proteksi Stabilitas Membran RBC terhadap Induksi Hyposalin pada Pemberian EMAT dan Indometasin	149

DAFTAR GAMBAR	
Gambar 2.1 Tambolekar (<i>Coptosapelta flavescent Korth</i>)	8
Gambar 2.2 A) Bunga, B) Buah dan C) akar Tambolekar (<i>Coptosapelta flavescent Korth</i>)	8
Gambar 2.3 Transisi seluler dari saluran nafas konduksi menuju alveolus	11
Gambar 2.4 Eksitasi-Kontraksi Coupling Otot Polos	15
Gambar 2.5 a) AHR pada saluran napas individu normal	30
b) AHR pada saluran napas penderita asma	30
Gambar 2.6 Mekanisme aksi beta ₂ adrenergik reseptor	35
Gambar 2.7 Mekanisme desensitisasi beta ₂ reseptor	38
Gambar 2.8 Mekanisme interaksi obat dengan reseptor	51
Gambar 2.9 Kurva dosis-respons dan Kurva pengikat dosis	53
Gambar 2.10 Cara mengukur agonisme	56
Gambar 2.11 Mekanisme antagonisme reseptor	58
Gambar 2.12 Respon Inflamasi dan Sel Imun yang Terlibat.....	63
Gambar 2.13 Mekanisme Antiinflamasi melalui Jalur Asam Arakidonat ..	81
Gambar 2.14 Kerangka Teori Kajian Aktivitas Ekstrak Metanol Akar Tambolekar (<i>Coptosapelta flavescent Korth</i>) sebagai Bronkodilator dan antiinflamasi	93
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian	95
Gambar 4.1 Bagan Alur Uji Aktivitas Bronkorelaksasi melalui Reseptor Kolinergik	102
Gambar 4.2 Bagan Alur Uji Aktivitas Bronkorelaksasi melalui Reseptor Histamin	103
Gambar 4.3 Bagan Alur Uji Aktivitas Bronkorelaksasi melalui Reseptor Beta2 Adrenergik	104
Gambar 4.4 Bagan Alur Uji Aktifitas Antiinflamasi melalui Hambatan Volume Edema Kaki Tikus yang Diinduksi Carrageenan....	114

Gambar 4.5	Bagan Alur Uji Aktivitas Antiinflamasi Melalui Stabilisasi Membran RBC	121
Gambar 5.1	Kurva Dosis Respon Cincin Bronkus Guinea pig yang di Inkubasi EMAT 3 Konsentrasi dan diberi Metakolin Dosis Kumulatif	125
Gambar 5.2	E_{\max} Cincin Bronkus Guinea pig yang di Inkubasi EMAT 3 Konsentrasi dan diberi Metakolin Dosis Kumulatif	127
Gambar 5.3	Kurva Dosis Respon Cincin Bronkus Guinea pig yang di Inkubasi EMAT 3 Konsentrasi dan diberi Histamin Dosis Kumulatif	130
Gambar 5.4	E_{\max} Cincin Bronkus Guinea pig yang di Inkubasi EMAT 3 Konsentrasi dan diberi Histamin Dosis Kumulatif	131
Gambar 5.5	Kurva Dosis-Respons Cincin Bronkus Guinea pig yang Tidak dan di Inkubasi dengan 3 Konsentrasi Propranolol	133
Gambar 5.6	E_{\max} Cincin Bronkus Guinea pig yang Tidak dan di Inkubasi dengan 3 Konsentrasi Propranolol dan diberi Metakolin Dosis Tunggal diikuti EMAT Dosis Kumulatif	134
Gambar 5.7	Persebaya Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus yang diinduksi Carrageenan, pemberian EMAT 1 jam Sebelum Induksi	136
Gambar 5.8	Persebaya Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus yang diinduksi Caragenan, pemberian EMAT pada Saat Induksi	138
Gambar 5.9	Persebaya Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus yang diinduksi Caragenan, pemberian EMAT 1 jam setelah Induksi	141
Gambar 5.10	Persebaya Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus yang diinduksi Carrageenan, pemberian EMAT2 1 jam sebelum, Saat dan 1 jam Setelah Induksi	145
Gambar 5.11	Persebaya Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus yang diinduksi Carrageenan, pemberian EMAT3 1 jam sebelum, Saat dan 1 jam Setelah Induksi Caragenan	146
Gambar 5.12	Persebaya Proteksi EMAT pada Membran RBC yang di Induksi Hyposalin	150

DAFTAR LAMPIRAN			
Lampiran 1	Ethical Clearance	185	
Lampiran 2	Surat Keterangan Plagiasi	186	
Lampiran 3	Identifikasi Tanaman Tambolekar	187	
Lampiran 4	Pembuatan Larutan Ekstrak Metanol Akar Tambolekar	188	
Lampiran 5	Pembuatan Larutan Atropin	189	
Lampiran 6	Pembuatan Larutan Propranolol	190	
Lampiran 7	Pembuatan Larutan CTM	191	
Lampiran 8	Pembuatan Larutan Metakolin	192	
Lampiran 9	Pembuatan Larutan Histamin	193	
Lampiran 10	Pembuatan Larutan Kreb's- Henselheit	194	
Lampiran 11	Pemberian dosis metakolin kumulatif ke dalam organ bath berisi cincin bronkus	195	
Lampiran 12	Pemberian dosis histamin kumulatif ke dalam organ bath berisi cincin bronkus	196	
Lampiran 13	Pemberian dosis EMAT kumulatif ke dalam organ bath berisi cincin bronkus	197	
Lampiran 14	Persebaya Kontraksi Cincin Bronkus yang di Inkubasi EMAT 3% Konsentrasi dan diberi Metakolin Dosis Kumulatif	198	
Lampiran 15	Persebaya kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi DMSO-etanol 10% 200 ul 10 menit dikontraksi dengan metakolin secara kumulatif	199	
Lampiran 16	Persebaya kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi Atropin Sulfat 10^{-4} M 200 ul 10 menit dikontraksi dengan metakolin secara kumulatif	200	
Lampiran 17	Persebaya kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi EMAT 10% 200 ul 10 menit dikontraksi dengan metakolin secara kumulatif	201	
Lampiran 18	Persebaya kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi EMAT 20% 200 ul 10 menit dikontraksi dengan metakolin secara kumulatif	202	

Lampiran 19	Persen kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi EMAT 30% 200 ul 10 menit dikontraksi dengan metakolin secara kumulatif	203
Lampiran 20	Gambar respon cincin bronkus di inkubasi EMAT di kontraksi dengan Metakolin secara kumulatif.....	204
Lampiran 21	Persen Kontraksi Cincin Bronkus yang di Inkubasi EMAT 3 Konsentrasi dan diberi Histamin Dosis Kumulatif	205
Lampiran 22	Persen kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi DMSO-etanol 10% 200 ul 10 menit dikontraksi dengan histamin secara kumulatif	206
Lampiran 23	Persen kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi CTM 10^{-4} M 100 ul 10 menit dikontraksi dengan histamin secara kumulatif	207
Lampiran 24	Persen kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi EMAT 10% 200 ul 10 menit dikontraksi dengan histamin secara kumulatif	208
Lampiran 25	Persen kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi EMAT 15% 200 ul 10 menit dikontraksi dengan histamin secara kumulatif	209
Lampiran 26	Persen kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi EMAT 20% 200 ul 10 menit dikontraksi dengan histamin secara kumulatif	210
Lampiran 27	Gambar respon cincin bronkus di inkubasi EMAT + Histamin dosis kumulatif	211
Lampiran 28	Persen Relaksasi Cincin Bronkus yang di Inkubasi Propanolol 3 Konsentrasi, Prekontraksi Metakolin lalu diberi EMAT dibandingkan Terhadap Persen Relaksasi Cincin Bronkus tanpa Inkubasi Propranolol	212
Lampiran 29	Respon kontraktilitas cincin bronkus diinkubasi aquabides, diprekontraksi dengan metakolin 2 μ M (20 μ l 10^{-3} M), diberi DMSO etanol 10% kumulatif	213
Lampiran 30	Respon kontraktilitas cincin bronkus diprekontraksi dengan metakolin 2 μ M (20 μ l 10^{-3} M), diberi EMAT secara kumulatif	214
Lampiran 31	Respon kontraktilitas cincin bronkus diinkubasi propranolol 0,5 μ M (100 μ l 5×10^{-5} M), diprekontraks dengan metakolin 2 μ M (20 μ l 10^{-3} M), diberi EMAT secara kumulatif	215

Lampiran 32	Respon kontraktilitas cincin bronkus diinkubasi propranolol 1,0 μM ($100 \mu\text{l} \times 10^{-4} \text{ M}$), diprekontraksi dengan metakolin 2 μM ($20 \mu\text{l} \times 10^{-3} \text{ M}$), diberi EMAT secara kumulatif	216
Lampiran 33	Respon kontraktilitas cincin bronkus diinkubasia propranolol 1,5 μM ($100 \mu\text{l} \times 15 \times 10^{-5} \text{ M}$), diprekontraksi dengan metakolin 2 μM ($20 \mu\text{l} \times 10^{-3} \text{ M}$), diberi EMAT secara kumulatif	217
Lampiran 34	Gambar respon cincin bronkus di inkubasi propranolol, prekontraksi metakolin diberi EMAT dosis kumulatif	218
Lampiran 35	Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus 1 jam sebelum induksi Carrageenan Diberi CMC dan Indometasin	219
Lampiran 36	Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus 1 jam sebelum induksi Carrageenan Diberi EMAT 3 Dosis	220
Lampiran 37	Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus Saat induksi Carrageenan Diberi CMC dan Indometasin	221
Lampiran 38	Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus Saat induksi Carrageenan Diberi EMAT 3 Dosis	222
Lampiran 39	Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus 1 jam Setelah induksi Carrageenan Diberi CMC dan Indometasin	223
Lampiran 40	Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus 1 jam Setelah induksi Carrageenan Diberi EMAT 3 Dosis	224
Lampiran 41	Pemberian dosis EMAT 1% dan Indometasin 5% kedalam RBC yang diinduksi hipotonitas	225
Lampiran 42	Persen Proteksi EMAT dan Indometasin Terhadap Kestabilan Membran Sel Darah Merah diinduksi Hipotonitas	226
Lampiran 43	Dokumentasi gambar bronkus dan alat isolated organ bath	227
Lampiran 44	Dokumentasi gambar 1 set /6 chamber organ bath dan monitor komputer yang terhubung ke recorder	228
Lampiran 45	Dokumentasi gambar alat plethysmometer dan tikus Wistar setelah diinduksi carrageenan	229
Lampiran 46	Dokumentasi gambar Stabilisasi membran RBC	230

DAFTAR SINGKATAN	
2,3-BPG	<i>2,3-biphosphoglycerat</i>
5HT	<i>5-hidroxy Triptamin</i>
AA	<i>Arachidonic Acid</i>
Ab	<i>Antibodi</i>
AC	<i>Adenilat Cyclase</i>
Ach	<i>Acetylcholine</i>
AHR	<i>airway hyperresponsiveness</i>
AMP	<i>adenosine monofosfat</i>
AS	<i>Atropin Sulfat</i>
ASM	<i>airway smooth muscle</i>
ATP	<i>Adenosine Tri Phosphate</i>
b-ARK	<i>beta-adrenoseptor kinase</i>
BAL	<i>Broncho Alveolar Liquid</i>
Ca ⁺	<i>Calcium</i>
CaMK	<i>calmodulin-dependent protein kinase</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CMC	<i>Carboxy Methyl Cellulose</i>
COPD	<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>
COX	<i>Cyclooxigenase</i>
CTM	<i>Chlorpheniramine Maleat</i>
CysLTs	<i>cysteinyl leukotrien</i>
DC	<i>Dendritic Cell</i>
DG	<i>Diasil gliserol</i>
DMSO	<i>Dimetil Sulfoksida</i>
DNA	<i>Deoxy Nucleic Acid</i>

EC₅₀	<i>Efective Concentration</i>
ECF-A	<i>Eosinophil Chemotactic Factor-Anaphylaxis</i>
EDN	<i>eosinophil-derived neurotoxin</i>
Efaks	<i>Efikasi maksimum</i>
EMAT	<i>Ekstrak Metanol Akar Tambolekar</i>
EPR	<i>Early Phase Respons</i>
ERK	<i>extracellular-regulated kinase</i>
FcϵRI	<i>Fragment crystallizable Receptor</i>
Fe²⁺	Ferro
Fe³⁺	Ferri
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i>
GDP	guanosin difosfat
Gi	G protein Inhibition
GM-CSF	<i>Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor</i>
GMP	Guanosine mono Phosphate
GPCR	<i>G Protein Couple Receptor</i>
GR	Glucocorticoid Receptor
Gs	G protein Stimulation
GSK	glikogen sintase kinase
GTP	Guanosine Tri Phosphate
H₁	Histamin
HDAC	<i>histone deacetylase</i>
HETE	<i>hydroxyeicosatetraenoic acid</i>
IC50	<i>Inhibitory Concentration</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
ICSS	<i>Inhalasi Corticosteroids</i>
IFN	<i>Interferon</i>

awijaya	universitas Brawijaya	universitas Brawijaya	universitas Brawijaya	universitas Brawijaya	universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	IgE	Immunoglobulin E	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	IL	Interleukin	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	IP ₃	Inositol Triphosphate	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	KDa	Konstanta disosiasi	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	KDR	kilo Dalton	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	KN	Kurva Dosis Respon	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	LOX	Kontrol Negatif	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	LPR	lipoxygenase	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	LPS	Late Phase Respons	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	LT	lipopolisakarida	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	M ₃	Leukotrin	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	MAPK	Muscarinic	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	MBP	mitogen-activated protein kinase	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	MCF	Major Basic Protein	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	MHC	Mast Cell-rupturing Factor	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	MLCK	Myocin Heavy Chain	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	MLCP	Myocin Light Chain Kinase	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	NADPH	Myocin Light Chain Phosphatase	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	NANC	nikotinamide adenin dinukleotida phosphate	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	NCX	non-adrenergik non-kolinergik	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	NF-κB	Natrium Calcium Exchanger	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	NK	Nuklir faktor-κB	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	NO	natural killer	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	NOS	Nitric Oxyde	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	NSAID	nitric oksida sintase	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	ONOO ⁻	Non Steroid Anti Inflammatory Drug	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya		peroxynitrite	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya

PAF	<i>platelet activating factor</i>
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PDE	<i>Phosphodiesterase</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PG	<i>Prostaglandin</i>
PI3K	<i>Phosphatidil Inositol 3 kinase</i>
PIP2	<i>Phosphatidil Inositol bis Phosphate</i>
PKA	<i>Protein Kinase A</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PLA2	<i>Phospholipase A2</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PMN	<i>Polymorphonuclear</i>
PPARs	<i>Peroxisome proliferator activated receptors</i>
PPOK	penyakit paru obstruktif kronik
PPRE	<i>PPAR Respon Element</i>
R	<i>Receptor</i>
RBC	<i>Red Blood Cell</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RXR	<i>retinoid X reseptor</i>
RyR	<i>Ryanodine Receptor</i>
SABA	<i>Short Acting Beta₂-Adrenergic</i>
SEM	<i>Standard Error Mean</i>
SM	<i>Sel Mast</i>
SM-MHC	<i>smooth muscle (SM) myosin heavy chain</i>
SM-MLCK	<i>smooth muscle (SM) myosin light chain kinase</i>



SP	<i>Sugactan Protein</i>
SRS-A	<i>slow reacting substances of anaphylaxis</i>
SSP	<i>Susunan Saraf Pusat</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Th	<i>T helper</i>
TIR	<i>Toll/IL-1 receptor</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRAFs	<i>TNF receptor-associated factors</i>
TxAs	<i>Tromboxan</i>
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VIP	<i>vasoactive intestinal peptide</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia dikenal kaya akan tumbuhan obat, banyak etnis telah menggunakan tumbuhan disekitarnya untuk pengobatan secara turun temurun.

Berdasarkan penelusuran berbagai pustaka diketahui ada 55 jenis tumbuhan obat

digunakan secara turun temurun untuk mengobati sesak napas atau asma, 15

jenis diantaranya berada di Kalimantan (Moerad *et al.*, 2012). *Coptosapelta*

flavescens Korth dengan sinonim *Coptosapelta tomentosa* Valeton ex K. Heyne

(MyBIS, 2018), marga Rubiaceae, nama lokal Akar Tambolekar (Paser) atau Akar

Merung (Kutai Kartanegara) merupakan salah satu tanaman yang digunakan

Merang (Ratu Kartasugara), merupakan salah satu tanaman yang digunakan
masyarakat Kalimantan untuk mengobati asam urat atau cemas kronik.

masyarakat Kalimantan untuk mengobati sesak napas atau asma bronkitis.

Darusman, 2004). Universitas Brawijaya

Mengingat patofisiologi asma bronkiale adalah bronkokonstriksi dan

inflamasi, maka dapat diduga akar Tambolekar dapat bekerja sebagai

bronkodilator ataupun anti-inflamasi. Sejauh ini belum ada bukti-bukti ilmiah

tentang mekanisme aksi akar Tambolekar sebagai bronkodilator ataupun anti-

Jaya Universitas Brawijaya
Wijaya Universitas Brawijaya

Regulasi kontraktilitas bronkus telah diketahui melalui beberapa reseptor

Universitas Brawijaya antara lain reseptor beta₂ adrenergik (Mutlu and Factor, 2008), reseptor kolinergik

(Pee et al., 2003), reseptor histamin dan sebagainya (Quedraogo and Boucrot, 2004).

(Bos et al., 2007), reseptor histamin dan sebagainya (Ouedraogo and Roux,

2014). Jika diduga akar Tambolekar berefek sebagai bronkodilator, maka

kemungkinan melalui stimulasi reseptor beta₂ adrenergik, hambatan reseptor

kolinergik, ataupun hambatan reseptor histamin. Untuknya membuktikan efek

bronkodilator akar ini Tambolarek w melalui reseptor-reseptor α_1 adrenergik,

kolinergik dan histamin, maka perlu dilakukan penelitian mengkaji efek ekstrak

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya 1

metanol akar Tambolekar (*Coptosapelta flavescens* Korth) sebagai bronkodilator melalui ketiga reseptor tersebut.

Disamping untuk pengobatan sesak atau asma, secara tradisional akar Tambolekar juga digunakan untuk mengobati sakit gigi (Mulyoutami, et al., 2009) dan rematik (Tran and Tran, 2010). Sakit gigi maupun rematik diketahui keduanya merupakan penyakit inflamasi, baik inflamasi akut maupun kronis. Sehingga

diduga akar Tambolekar dapat berefek juga sebagai anti-inflamasi. Sejauh ini hanya ada satu laporan yang menyatakan saponin yang diisolasi dari ekstrak etanol akar *Coptosapelta tomentosa* mempunyai aktivitas antiinflamasi (Tran and Tran, 2010), tetapi mekanisme aksi antiinflamasinya tidak dijelaskan.

Inflamasi merupakan respon protektif fisiologis tubuh terhadap cedera jaringan, yang melibatkan sejumlah peristiwa kompleks seperti pelepasan mediator yang mengaktivasi enzim, ekstravasasi cairan, migrasi sel, kerusakan dan perbaikan jaringan. Peristiwa ini merupakan pertahanan host dan diaktifkan pada kondisi penyakit inflamasi (Kumar et al., 2011). Penyebab umum inflamasi dapat berupa: infeksi virus, infeksi bakteri dan parasit serta reaksi hipersensitivitas, juga secara langsung oleh trauma, ultraviolet atau radiasi lainnya, luka bakar yang

berlebihan dan / atau bahan kimiawi korosif seperti asam, oksidasi iritasi, alkali dan secara eksperimental dengan carrageenan (Abd-Allah et al, 2018).

Inflamasi akut merupakan inflamasi yang onset nya cepat, proses berlangsung singkat, dengan gambaran utama adalah eksudasi cairan dan protein plasma serta pembentukan edema. Sel lekosit yang beremigrasi terutama neutrofil. Sementara inflamasi kronik terjadi akibat dari proses inflamasi akut yang

berulang atau terus-menerus, berlangsung beberapa minggu sampai bulan, bahkan sampai tahunan (Paramita et al., 2016). Diketahui mekanisme pembentukan edema setelah diinduksi carrageenan disebabkan oleh pelepasan mediator inflamasi seperti histamin, serotonin oleh sel mast difase awal inflamasi

akut, dan pembentukan prostaglandin difase kedua (Zhang, et al, 2013). Untuk membuktikan akar Tambolekar berefek anti-inflamasi terutama dalam menghambat pembentukan edema, maka dilakukan penelitian mengkaji mekanisme anti-inflamasi ekstrak metanol akar Tambolekar (*Coptosapelta flavesrens* Korth) dengan menghambat edema yang diinduksi *carrageenan*.

Selama berlangsungnya respon inflamasi, terjadi infiltrasi leukosit ketempat inflamasi, terutama neutrofil. Dalam menjalankan fungsinya sebagai pertahanan tubuh terhadap invasi bakteri ataupun cedera, neutrofil melepaskan isi lisosomnya, dengan mekanisme eksositosis. Pelepasan isi lisosom dapat terjadi akibat adanya influx Ca^{2+} kedalam lisosom, sehingga menyebabkan membran lisosom tidak stabil dan melepaskan isinya (Krystel-Whittemore, et al, 2016).

Pelepasan isi lisosom yang kebanyakan berupa enzim bakterisida dan protease, akan merusak jaringan disekitarnya juga, sehingga menyebabkan inflamasi lebih lanjut. Cedera pada membran lisosom juga menyebabkan pelepasan Phospholipase A2 (PLA) (Umapathy et al., 2010), yang merupakan prekursor inflamasi. Untuk menjaga integritas membran lisosom ataupun membran sel lain yang melepaskan granulnya dengan mekanisme yang sama dengan sifat lisosom, seperti sel mast (Krystel-Whittemore, et al, 2016), maka membran lisosom ataupun membran sel lain perlu distabilkan (Aits S. and Jaättela M, 2013). Akar Tambolekar yang berefek anti-inflamasi kemungkinan melakukan aktivitasnya melalui stabilisasi membran lisosom ataupun membran sel mast. Untuk membuktikan hal tersebut, maka dilakukan juga penelitian menguji efek anti-inflamasi ekstrak metanol akar Tambolekar (*Coptosapelta flavesrens* Korth) melalui stabilisasi membran sel.

Pada penelitian ini dilakukan tiga tahapan yang tidak saling tergantung:

Penelitian tahap I menguji mekanisme aktivitas bronkorelaksasi Ekstrak metanol akar Tambolekar (*Coptosapelta flavesrens* Korth) dengan menguji efek anti-inflamasi ekstrak metanol akar Tambolekar (*Coptosapelta flavesrens* Korth) melalui stabilisasi membran sel.

akar Tambolekar (*Coptosapelta flavesrens* Korth) melalui reseptor kolinergik, reseptor histamin dan beta₂ adrenoseptor, menggunakan organ bronkus terpisah guinea pig secara *in vitro* (Albuquerque *et al.*, 2016). Model ini tidak dipengaruhi oleh faktor farmakokinetik, murni menguji aksi kontraktilitas otot polos bronkus. Penelitian tahap 2 mengkaji mekanisme aktivitas anti-inflamasi menghambat pembentukan edema pada respon inflamasi akut, dengan menggunakan model induksi *carrageenan* pada kaki tikus. Model induksi *carrageenan* umum digunakan untuk menguji aktivitas antiinflamasi bahan obat maupun ekstrak tanaman (Paramita, *et al*, 2017). Penelitian tahap 3 menguji stabilitas membran lisosom dengan menggunakan model stabilisasi membran sel darah merah tikus. Karena membran eritrosit memiliki karakteristik yang sama dengan komposisi membran lisosom (Maji, *et al*, 2011).

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Rumusan Masalah Utama

Apakah ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavesrens* Korth) ber aktivitas bronkorelaksasi melalui reseptor kolinergik, reseptor histamin dan reseptor beta₂ adrenergik dan juga beraktivitas anti-inflamasi ?

1.2.2 Rumusan Sub Masalah

1. Apakah aktivitas bronkorelaksasi ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavesrens* Korth) melalui:
 - a. Hambatan reseptor kolinergik?
 - b. Hambatan reseptor histamin?
 - c. Stimulasi beta₂ adrenoseptor ?

2. Apakah aktivitas antiinflamasi ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescentia* Korth) melalui hambatan volume edema kaki tikus yang diinduksi carrageenan ?

3. Apakah aktivitas antiinflamasi ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescentia* Korth) melalui stabilisasi membran sel darah merah?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengkaji aktivitas bronkorelaksasi ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescentia* Korth) melalui reseptor kolinergik, reseptor histamin dan reseptor beta₂ adrenergik; serta aktivitas anti-inflamasi.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menguji aktivitas bronkorelaksasi ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescentia* Korth) melalui:
 - a. Hambatan reseptor kolinergik pada cincin bronkus guinea pig
 - b. Hambatan reseptor histamin pada cincin bronkus guinea pig
 - c. Stimulasi beta₂ adrenoseptor pada cincin bronkus guinea pigs
2. Menguji aktivitas antiinflamasi ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescentia* Korth) melalui hambatan volume edema kaki tikus yang diinduksi carrageenan
3. Menguji aktivitas antiinflamasi ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescentia* Korth) melalui stabilisasi membran sel darah merah tikus

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Dengan mengetahui aktivitas bronkorelaksasi dan antiinflamasi ekstrak metanol akar Tambolekar dapat merupakan bahan acuan bagi penelitian selanjutnya, sehingga aktivitas bronkorelaksasi melalui reseptor lain atau mekanisme lain dan antiinflamasi melalui metode lain dapat dieksplorasi lebih jauh.

1.4.2 Manfaat Praktis

Sebagai salah satu sumber informasi bagi para praktisi khususnya di bidang kedokteran dan farmasi yang terkait dalam pengembangan tanaman obat khususnya tentang efek akar tambolekar (*Coptosapelta flavesrens Korth*) sebagai bronkodilator dan antiinflamasi. (2) sebagai bahan acuan untuk melakukan uji klinis terhadap akar tambolekar (*Coptosapelta flavesrens Korth*) yang berpotensi sebagai obat untuk terapi sesak napas baru.

1.4.3 Manfaat Teoritis

Memberi gambaran yang lebih jelas tentang mekanisme aksi bronkorelaksasi dan antiinflamasi akar tambolekar (*Coptosapelta flavesrens Korth*).

BAB 2	
TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Coptosapelta flavesrens</i> Korth	
2.1.1 Taksonomi dan Deskripsi	Susunan taksonomi spesimen tanaman Tambolekar yang telah dibuat oleh Laboratorium Dendrologi dan Ekologi Hutan Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman Samarinda tahun 2014 (lampiran 2) adalah sebagai berikut:
Kingdom	: Plantae
Division	: Spermatophyta
Sub Division	: Angiospermae
Class	: Dicotyledonae
Sub Class	: Sympetalae
Ordo	: Rubiales
Family	: Rubiaceae
Genus	: Coptosapelta
Species	: <i>Coptosapelta flavesrens</i> Korth
<i>Coptosapelta flavesrens</i> Korth (sinonim <i>Coptosapelta tomentosa</i> Valeton ex K. Heyne) (MyBIS, 2018) mempunyai nama daerah Tambolekar (Paser), Akar Merung (Kutai Kartanegara), Akar Metedong (Bangka), Kertupai (Lampung), Peruwal (Malaka), Salah (Malaysia), Day Khai (Vietnam). Sejenis perdu dengan batang memanjang, panjang 2 hingga 8 m dengan bunga yang berbau wangi, tumbuh tersebar dibagian barat Nusantara. Di Jawa Barat pada ketinggian dibawah 550 m diatas permukaan laut tanaman tersebut tumbuh dihutan belukar, hutan sekunder dan di tepi-tepi hutan, pada umumnya jarang dijumpai tetapi	

kadang-kadang ditemukan cukup banyak (Heyne, 1987; Lin, 2005; Tran and Tran,

2010; Al'Amrie et al., 2011).



Gambar 2.1 Tambolekar (*Coptosapelta flavescens* Korth)



Gambar 2.2 (A) Bunga, (B) Buah dan (C) Akar Tambolekar (*Coptosapelta flavescens* Korth)

Keterangan : Gb 2.1 Tanaman Tambolekar dari desa Suatang Kabupaten Paser Propinsi Kalimantan Timur. Gb 2.2 A bunga tambolekar yang berbau wangi sekali, mula-mula berwarna putih lama kelamaan berwarna kuning jingga; Gb 2.2 B buah tambolekar; Gb 2.2 C akar tambolekar yang berbau seperti jamu (Kosala, 2015)

Tambolekar (*Coptosapelta flavescens* Korth) berupa tanaman liana yang memanjang / melingkari tanaman lain sampai mencapai 8 meter (lihat gambar 2.1)

Kulit akar berwarna coklat kemerahan & berbau khas seperti jamu (lihat gambar 2.2C); Akar: tunggang; Batang: sejati, merambat, silindris, kasar, batang muda

berwarna hijau, batang tua berwarna coklat; Daun: lengkap, tunggal, ovate,

mucronate, rounded, entire, halus, daun muda berwarna hijau muda, daun tua berwarna hijau, *pinnate, opposite*; bunga : berbau wangi sekali, berwarna mulai putih, lama kelamaan menjadi kuning jingga (lihat gambar 2.2A), bunga mekar setahun sekali pada bulan Maret-April (Kosala, 2015).

2.1.2 Kegunaan dan Kandungan

Di daerah Lampung air perasan dari akar yang telah ditumbuk digunakan untuk mengobati cacingan, Menurut Agr. Bull of the Malay Peninsula 1898 hal 213, di Semenanjung Malaya kulit akar tanaman ini digunakan sebagai racun panah (Heyne, 1987). Di Malaysia *Coptosapelta tomentosa* La (Blume) Valeton ex K.Heyne dengan nama daerah Salah digunakan oleh penduduk Jah Hut Malaysia sebagai obat cacing (Lin, 2005). Di Vietnam nama daerah *C. Tomentosa* (Blume) Vahl. ex Heyne var. *dongnaiensis* (Pit.) adalah Day Khai. Tanaman ini sudah lama digunakan oleh penduduk minoritas Re di Vietnam bagian tengah untuk mengobati rematik, pencuci luka agar terhindar dari infeksi, atau sebagai tonikum. Tran and Tran (2010) melaporkan saponin dari ekstrak etanol akar *C. tomentosa* (Blume) Vahl.ex Heyne var. *dongnaiensis* (Pit.) berefek antiinflamasi dengan melakukan fraksinasi dan mengisolasi senyawa aktifnya (Tran and Tran, 2010).

Penelitian Hidayat (2011) di Kebun Raya Bogor memperoleh data *C. tomentosa* (Blume) Valeton ex K.Heyne dengan nama daerah Kertupai, mempunyai kegunaan mengobati cacingan, bisul, demam. Ajiningrum (2011) melakukan penelitian dengan data *C. tomentosa* nama daerah Manuran, akarnya digunakan untuk obat demam, luka, kejang perut dan pasca bersalin. Al'Amrie et al., (2011) meneliti adanya aktivitas antioksidan pada ekstrak akar Merung *C. tomentosa* Valeton K.Heyne dengan pelarut n-heksan, etil-asetat dan n-butanol. Di Kabupaten Paser *C. flavesens* Korth dengan nama lokal tambolekar digunakan untuk mengobati flu dan demam. Kulit akar dibersihkan dan direndam dengan air,

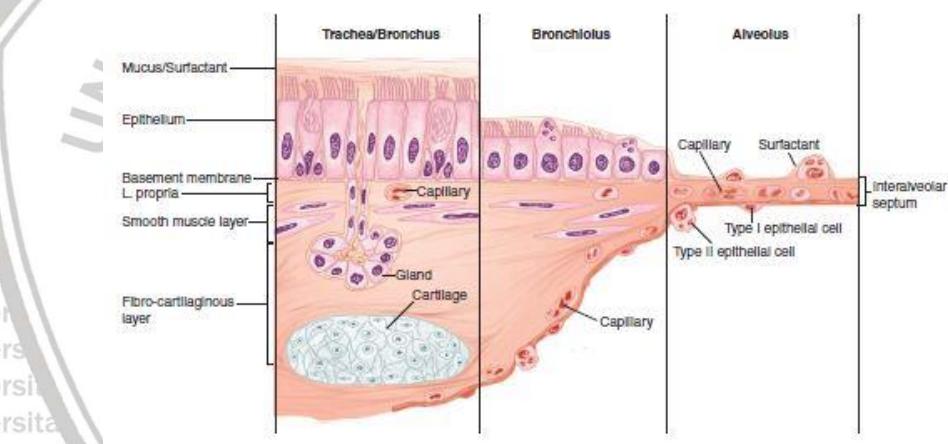
lalu airnya diminumkan untuk bayi. Sedangkan untuk orang dewasa akarnya di masak dengan air, kemudian diminum (Kosala *et al.*, 2012). Ekstrak akar Tambolekar (*C. flavescent* Korth) fraksi n-heksan mengandung steroid dan anthrakuinon, tidak mempunyai aktivitas antioksidan ($IC_{50} = 950$ ppm); fraksi etil asetat mengandung polifenol, terpenoid dan anthrakuinon, dengan aktivitas antioksidan yang kuat ($IC_{50} = 49$ ppm); dan fraksi metanol mengandung polifenol, terpenoid dan saponin dengan aktivitas antioksidan yang lemah ($IC_{50} = 100\text{-}500$ ppm) (Kosala, 2015; Setiorini, 2015; Dhimas, 2015). Anthrakuinon yang telah teridentifikasi adalah *1-hidroksi-2-hydroxymethylanthraquinone* (Houkong *et al.*, 2014); *1,4-Dimethoxy-2-methyl anthraquinone* dan *2-amino-3-methoxycarbonyl-1,4-naphthoquinone* (Kongyen *et al.*, 2014). Saponin yang telah teridentifikasi adalah *3-O- β -D- glucopyranosyl sitosterol*; *3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl]-quinovic*; *3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl]-quinovic acid*; dan *3-O-[β -D-glucopyranosyl -(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl]-quinovic acid 28- β -D-glucopyranosyl ester* (Tran and Tran, 2010).

2.2 Anatomi dan Fisiologi Seluler Sistem Pernapasan

Sistem pernapasan dibagi menjadi tiga zona yang saling berhubungan: Saluran napas bagian atas; saluran napas konduksi; dan saluran napas alveolar yang juga dikenal sebagai parenkim paru. Saluran napas bagian atas terdiri dari rongga hidung dan mulut yang mengarah ke faring, bagian bawah dari faring terdapat larynx yang meluas untuk melengkapi saluran napas atas. Hidung adalah titik masuk utama udara yang dihirup; Oleh karena itu, mukosa epitel yang melapisi saluran napas nasofaring akan terpapar alergen inhalasi, bahan toksik, dan partikel dalam konsentrasi tinggi. Sehingga, selain penciuman, hidung dan saluran napas atas mempunyai dua fungsi tambahan penting dalam saluran napas: (1) penyaringan partikel besar dari ukuran 30-50 μm untuk mencegahnya mencapai

saluran napas konduksi dan alveolar dan (2) berfungsi untuk menghangatkan dan melembabkan udara saat memasuki tubuh. Saluran napas konduksi dimulai dari trachea dan bercabang secara dikotomis ke jaringan paru-paru, dimana sebanyak 16 generasi pertama dari bagian-bagian ini membentuk zona konduksi saluran udara yang mengangkut gas dari dan ke saluran napas bagian atas. Cabang ini terdiri dari bronkus, bronkiolus, dan terminal bronkiolus (Barrett *et al.*, 2012).

Saluran napas konduksi terdiri dari berbagai macam sel khusus yang berfungsi melebihi penyaluran udara mencapai paru (lihat gambar 2.3). Epitel mukosa melekat pada membran dasar yang tipis, di bawahnya ada lamina propria.



Gambar 2.3 Transisi seluler dari saluran napas konduksi menuju alveolus (Barrett *et al.*, 2012).

Keterangan gb 2.3 : Lapisan epitel berubah dari lapisan pseudostratified dengan kelenjar submukosa ke bentuk kuboid dan ke epitel skuamosa. Mesynchyme yang mendasari jaringan dan struktur kapiler juga berubah dengan transisi saluran napas

Secara kolektif ini disebut sebagai "mukosa saluran napas". Sel otot polos

ditemukan di bawah epitel dan jaringan ikat yang membungkusnya diselingi dengan tulang rawan yang lebih dominan pada bagian saluran napas konduksi.

Epitelium mengandung beberapa jenis sel, termasuk sel silia dan sel sekretori (misalnya, sel goblet dan sel kelenjar) yang merupakan komponen kunci untuk imunitas bawaan saluran napas, dan sel basal yang bisa berfungsi sebagai sel progenitor selama cedera. Seperti transisi saluran napas konduksi ke terminal bronchiolus peralihan, histologis penampilan tabung konduksi berubah, dimana kelenjar sekresi tidak ada pada epitel bronkiolus dan terminal bronchiolus, sementara otot polos berperan lebih menonjol dan tulang rawan sebagian besar tidak ada pada jaringan di bawahnya. Sel Clara, yakni sel epitel *cuboidal nonciliatif* yang mensekresi marker pertahanan yang penting dan berfungsi sebagai sel progenitor setelah cedera, membentuk sebagian besar lapisan epitel di bagian terakhir dari saluran napas konduksi (Barrett *et al.*, 2012).

Sel epitel di saluran napas konduksi bisa mengeluarkan berbagai macam molekul yang membantu pertahanan paru-paru seperti Immunoglobulin sekretori A (IgA), collectin (termasuk protein surfaktan (SP)-A dan SP-D), defensin dan peptida dan protease lainnya, reaktif oksigen spesies, dan reaktif nitrogen spesies. Sekresi ini bisa bertindak langsung sebagai antimikroba untuk membantu menjaga saluran napas bebas dari infeksi. Sel epitel saluran napas juga mengeluarkan berbagai kemokin dan sitokin yang merekrut sel imun tradisional dan sel efektor lainnya ke tempat terjadinya infeksi.

Dinding bronkus dan dinding bronkiolus dipersyarafii oleh sistem saraf otonom. Sel saraf di saluran napas menerima rangsangan mekanis atau adanya zat yang tidak diinginkan di saluran napas seperti debu yang dihirup, udara dingin, gas beracun dan asap rokok. Neuron ini bisa memberi sinyal pada pusat pernafasan untuk melakukan kontraksi otot-otot pernafasan dan memulai bersin atau batuk refleks. Reseptor beta₂ memediasi bronkodilatasi, juga meningkatkan sekresi bronkial (misalnya lendir), sementara reseptor adrenergik alpha-1 (α_1) menghambat sekresi (Barrett *et al.*, 2012).

2.3 Otot Polos

Secara anatomis otot polos berbeda dengan otot rangka dan otot jantung karena tidak terlihat gambaran serat lintang. Kontraksi pada otot polos dihasilkan oleh pergeseran antara aktin dan miosin II. Namun, filamen-filamen tersebut tidak tersusun teratur seperti pada otot rangka dan otot jantung sehingga tidak ada serat-lintang. Sebaliknya garis Z pada otot polos digantikan oleh *dense bodies* dalam sitoplasma dan menempel pada membran sel, yang terikat oleh α -actinin pada filamen actin. Otot polos juga mengandung tropomiosin, namun tidak ada troponin. Isoforms aktin dan myosin berbeda dari otot rangka. Retikulum sarcoplasmic juga ada, tapi kurang luas dibandingkan pada otot rangka atau otot jantung. Secara umum, otot polos mengandung sedikit mitokondria yang sebagian besar bergantung pada glikolisis untuk kebutuhan metaboliknya.

Otot polos dapat dibagi menjadi otot polos unit tunggal (atau *visceral*) dan otot polos multiunit. Otot polos unit tunggal memiliki banyak *gap junctional connections* dengan resistensi rendah antara sel otot individu, dan berfungsi dalam model *syncytial*, ditemukan terutama di dinding visera berongga, seperti otot usus, pembuluh darah, perut, kandung kemih, saluran napas, uterus, penis dan sinus kavernosus klitoris. Otot polos multiunit terdiri dari unit individu dengan sedikit (atau tidak ada) *gap junctional bridges*, ditemukan dalam struktur seperti iris mata, di mana terjadi kontraksi bergradasi (Barrett *et al.*, 2012).

Seperti pada otot rangka dan otot jantung, Ca^{2+} berperan penting dalam inisiasi kontraksi otot polos. Namun, sumber peningkatan Ca^{2+} bisa sangat berbeda dalam otot polos unit tunggal. Tergantung pada aktivasi stimulus, kenaikan Ca^{2+} bisa karena influx melalui *voltage-* atau *ligand-gated plasma membrane channel*, effluks dari simpanan intraselular melalui *ryanodine receptor* (RyR), effluks dari simpanan intraseluler melalui *inositol trisphosphate receptor* (IP3 R) Ca^{2+} channel, atau melalui kombinasi dari saluran-saluran ini. Selain itu,



kurangnya troponin dalam otot polos mencegah aktivasi Ca^{2+} melalui ikatan troponin (Barrett *et al.*, 2012).

2.3.1 Mekanisme Kontraksi Otot Polos

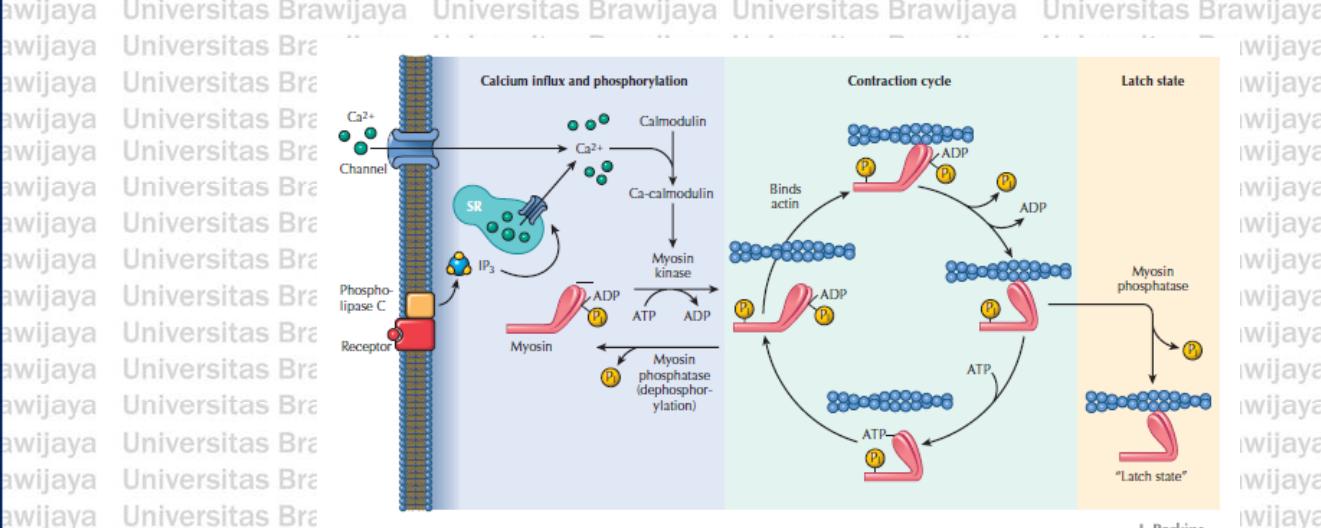
Dalam tubuh yang intak, proses kontraksi sel otot polos diatur terutama

oleh aktivasi reseptor dan mekanik dari protein kontraktil myosin dan aktin.

Perubahan potensial membran, yang disebabkan oleh potensial aksi atau aktivasi saluran ion tergantung peregangan pada membran plasma, juga dapat memicu kontraksi. Untuk terjadi kontraksi, *myosin light chain kinase* (MLC kinase) harus memfosforilasi rantai ringan 20-kDa dari myosin, memungkinkan interaksi molekul myosin dengan aktin. Energi yang dilepaskan dari ATP oleh aktivitas myosin ATPase menghasilkan *cycling* dari *myosin cross-bridges* dengan aktin untuk kontraksi. Dengan demikian aktivitas kontraktil pada otot polos ditentukan terutama oleh keadaan fosforilasi rantai ringan dari myosin, suatu proses yang sangat teratur. Dalam beberapa sel otot polos, fosforilasi rantai ringan dari myosin dipertahankan pada tingkat yang rendah tanpa adanya rangsangan eksternal (misalnya, tidak ada aktivasi reseptor atau mekanik). Aktivitas ini menghasilkan tonus otot polos dan intensitasnya dapat bervariasi (Mulroney and Myers, 2009).

2.3.1.1 Kontraksi Otot Polos Tergantung Calsium

Kontraksi otot polos dimulai oleh perubahan yang dimediasi Ca^{2+} di filamen tebal, sedangkan di otot lurik Ca^{2+} memediasi kontraksi dengan perubahan di filamen tipis. Dalam merespon rangsangan tertentu di otot polos, konsentrasi intraselular Ca^{2+} meningkat, dan aktivator Ca^{2+} ini bergabung dengan kalmodulin protein asam. Kompleks ini mengaktifkan MLC kinase untuk memfosforilasi rantai ringan dari myosin (Gambar 2.4).



Gambar 2.4 Eksitasi-Kontraksi Coupling Otot Polos (Mulroney & Myers, 2009)

Keterangan : Pengikatan ligan ke sarcoplasma menghasilkan peningkatan Ca²⁺ intraseluler, melalui depolarisasi membran sel dan pembukaan saluran Ca²⁺, atau aktivasi enzim phospholipase C. Aktivasi PKC menyebabkan inositol trisphosphate menghasilkan IP₃, yang mengikat ke retikulum sarkoplasma, menyebabkan pelepasan Ca²⁺ yang tersimpan. Ca²⁺ berikatan dengan protein calmodulin, yang mengaktifkan myosin kinase, memulai interaksi aktin-myosin. Siklus kontraksi berlanjut sepanjang Ca²⁺ meningkat. Keadaan *latch* terjadi ketika myosin terdefosforilasi oleh *myosin phosphatase*. Dalam keadaan ini, kontraksi dapat dipertahankan tanpa hidrolisis ATP lebih lanjut.

Ca²⁺ sitosol meningkat melalui pelepasan Ca²⁺ dari penyimpanan intraseluler (sarkoplasma retikulum) serta masuknya Ca²⁺ dari ruang ekstraseluler melalui Ca²⁺ channel (*receptor-operated Ca²⁺ channel*). Agonis (norepinefrin, angiotensin II, endotelin, dll) mengikat reseptor serpentine, bergabung dengan protein G heterotrimeric, merangsang aktivitas fosfolipase C. Enzim ini spesifik terhadap membran lipid *phosphatidylinositol 4,5-bifosfat* untuk mengkatalisis pembentukan dua *second messenger*, yakni *inositol trisphosphate* (IP₃) dan *diasilglicerol* (DG). Pengikatan IP₃ dengan reseptor pada retikulum sarkoplasma menghasilkan pelepasan Ca²⁺ ke dalam sitosol. DG bersama dengan Ca²⁺ mengaktifkan protein kinase C (PKC), yang memfosforilasi protein target tertentu.

Ada beberapa isozim PKC di otot polos yang masing-masing memiliki peran spesifik jaringan (misalnya, pembuluh darah, rahim, usus, dll). Dalam banyak

kasus, PKC memiliki efek mempromosikan kontraksi seperti fosforilasi *L-type Ca²⁺ channel* atau protein lain yang mengatur *cross-bridge cycling*. Ester Phorbol, sekelompok senyawa sintetis yang dikenal untuk mengaktifkan PKC, meniru aktivitas DG dan menyebabkan kontraksi otot polos. Akhirnya, *L-type Ca²⁺ channel* (*voltage-operated Ca²⁺ channel*) di membran juga terbuka dalam merespon depolarisasi membran yang disebabkan oleh bentangan sel otot polos (Webb, 2003).

2.3.1.2 Kontraksi Otot Polos Dengan Mekanisme Sensitasi Ca²⁺

Disamping aktivasi MLC kinase tergantung Ca²⁺, fosforilasi rantai ringan myosin diatur lebih lanjut oleh MLC fosfatase (myosin fosfatase), yang menghilangkan fosfat ber energi tinggi dari rantai ringan myosin untuk mempromosikan relaksasi otot polos. Ada tiga subunit MLC fosfatase: katalitik subunit 37-kDa, variabel subunit 20-kDa, dan *myosin-binding subunit* 110-130-kDa. Ketika *myosin-binding subunit* terfosforilasi, menghambat aktivitas enzimatik MLC fosfatase, yang memungkinkan rantai ringan myosin tetap terfosforilasi, sehingga meningkatkan kontraksi. Mekanisme ini ditandai dengan meningkatnya pemendekan otot polos pada konsentrasi Ca²⁺ tetap, fenomena ini disebut sensitivitas Ca²⁺. Faktor regulasi utama dari sensitivitas Ca²⁺ otot polos adalah Rho kinase dengan penggerak utamanya monomer G-protein RhoA. Protein G kecil RhoA dan target hilirnya Rho kinase berperan penting dalam regulasi aktivitas MLC fosfatase. Rho kinase, suatu kinase serin / treonin, memfosforilasi *myosin-binding subunit* MLC fosfatase, menghambat aktivitasnya dan dengan demikian mempromosikan keadaan terfosforilasi dari rantai ringan myosin. Diperkirakan reseptor mengaktifkan protein G heterotrimeric yang digabungkan ke RhoA / Rho kinase *signaling* melalui faktor pertukaran guanin nukleotida (RhoGEFs). Karena

RhoGEFs memfasilitasi aktivasi RhoA, mereka mengatur durasi dan intensitas sinyal melalui penggabungan reseptor heterotrimeric G protein. Peningkatan ekspresi dan / atau kegiatan protein RhoGEF bisa meningkatkan aktivasi kontraktil otot polos. (Webb, 2003)

2.3.2 Mekanisme Relaksasi Otot Polos

Relaksasi otot polos terjadi baik sebagai akibat dari penghapusan stimulus kontraktil atau dengan aksi langsung dari suatu zat yang merangsang penghambatan mekanisme kontraktil. Apapun, proses relaksasi memerlukan penurunan konsentrasi Ca^{2+} intraseluler dan meningkatkan aktivitas MLC fosfatase. Penurunan konsentrasi intraseluler dari aktuator Ca^{2+} mengakibatkan relaksasi sel otot polos. Beberapa mekanisme yang terlibat dalam penghapusan sitosol Ca^{2+} melibatkan retikulum sarkoplasma dan membran plasma (Wani, et al, 2017).

*Uptake Ca^{2+} ke dalam retikulum sarkoplasma tergantung pada hidrolisis ATP. Ca, Mg-ATPase reticular sarkoplasma ini, ketika terfosforilasi, mengikat dua ion Ca^{2+} , yang kemudian di translokasi ke sisi luminal retikulum sarkoplasma dan dirilis. Mg²⁺ diperlukan untuk aktivitas enzim; ia terikat ke bagian katalitik dari ATPase untuk memediasi reaksi. Ca Mg-ATPase Reticular sarkoplasma dihambat oleh beberapa agen farmakologis yang berbeda seperti *vanadat*, *thapsigargin*, dan asam cyclopiazonic. Ca^{2+} protein-binding sarkoplasma reticular (*calsequestrin* dan *calreticulin*) juga berkontribusi terhadap penurunan tingkat intraseluler Ca^{2+} (Wani, et al, 2017).*

Membran plasma juga mengandung Ca, Mg-ATPase yang menyediakan mekanisme tambahan untuk mengurangi konsentrasi aktuator Ca^{2+} di dalam sel. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) yang juga terletak pada membran plasma membantu

menurunkan Ca^{2+} intraseluler. *Receptor-operated* dan *voltage-operated Ca^{2+}* *channels* yang terletak di membran plasma penting dalam influks Ca^{2+} dan kontraksi otot polos, penghambatan *channel* ini dapat menimbulkan relaksasi. Antagonis *channel* seperti dihidropiridin, *phenylalkylamines*, dan *benzothiazepines* berikatan dengan reseptor yang berbeda pada protein *channel* dan menghambat masuknya Ca^{2+} dalam otot polos (Webb, 2003).

2.4 Asma

Asma merupakan suatu penyakit saluran napas yang ditandai dengan adanya inflamasi kronik, disertai dengan penyempitan saluran napas yang bersifat sementara, dengan sekresi lendir yang berlebihan sehingga menimbulkan manifestasi klinik sesak napas (Moerad *et al.*, 2012).

2.4.1 Patogenesis dan Patofisiologi Asma

Serangan asma dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti paparan alergen, virus, atau polutan dalam dan luar ruangan yang masing-masing dapat menyebabkan respon inflamasi akut. Allergen yang terhirup pada pasien alergi menyebabkan reaksi alergi inflamasi awal dan pada beberapa kasus, dapat diikuti oleh reaksi fase-lambat. Reaksi fase awal dimulai setelah pengaktifan sel mast dan sel basofil yang membawa reseptor Imunoglobulin E (IgE) yang spesifik berafinitas tinggi Fc_εRI. Sel-sel yang diaktifkan, secara cepat melepaskan mediator proinflamasi seperti histamin, eikosanoid, dan spesies oksigen reaktif yang menginduksi kontraksi otot polos saluran napas, sekresi lendir, dan vasodilatasi. Mediator inflamasi menginduksi kebocoran mikrovaskuler dengan eksudasi plasma ke dalam saluran napas. Kebocoran protein plasma yang akut menginduksi penebalan, pembesaran dan edema dinding saluran napas dan berakibat penyempitan lumen saluran napas. Protein plasma juga dapat

membentuk sumbat luminal eksudat kental yang bercampur dengan lendir dan sel-sel inflamasi dan epitel, efek ini berkontribusi pada obstruksi aliran udara. Reaksi inflamasi fase-lambat terjadi antara 6 sampai 9 jam setelah terpapar alergen dan melibatkan perekutan dan aktivasi eosinofil, sel T CD⁴⁺, basofil, neutrofil, dan makrofag. Aktivasi sel T CD⁴⁺ menyebabkan pelepasan sitokin dari sel T helper tipe 2 (Th2) yang dapat menjadi mekanisme kunci dari reaksi fase lambat. Dua puluh empat jam setelah terpapar alergen, terjadi peningkatan aktivasi interleukin-2 (IL-2) dan interleukin-5 (IL-5) serta ekspresi messenger RNA (mRNA) *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) pada bronkus yang dibiopsi. Sitokin seperti IL-5 dan GM-CSF berperan meningkatkan rekrutmen eosinofil ke dinding saluran napas yang mengalami inflamasi. Peningkatan hiperresponsif saluran napas atau *airway hyperresponsiveness* (AHR) biasanya terjadi setelah reaksi fase lambat (Bousquet, et al, 2000).

Patofisiologi Asma melibatkan hiperreaktivitas bronkus, inflamasi dan *remodeling*, fitur ini terkait erat. Hiper-reaktivitas bronkus ditandai dengan respon saluran napas yang berlebihan untuk berbagai rangsangan. Inflamasi bronchial ditandai dengan infiltrasi seluruh lapisan dinding bronkus oleh berbagai sel inflamasi, terutama sel mast, limfosit dan eosinofil. *Remodeling* bronchial didefinisikan dengan berbagai perubahan struktural dari semua komponen dinding bronkial, yang bertanggung jawab terhadap memburuknya penyakit (Ozier, et al., 2011).

Sitokin terlibat dalam berbagai aspek patofisiologi asma, seperti polarisasi

sel T-helper (Th2), presentasi antigen, respon IgE, *remodeling* saluran napas, perekutan sel eosinofil dan aktivasi sel mast (Chung, 2003). Ada bukti yang meyakinkan bahwa sel mast manusia berkontribusi terhadap patofisiologi asma dimana beberapa mediator sel mast memiliki efek pada fungsi otot polos saluran napas. Mediator autacoid ditetapkan sebagai bronkokonstriktor kuat, sedangkan

protease tryptase dan chymase berperan dalam peradangan, remodeling jaringan dan hiperresponsif bronkial. IL-4 dan IL-13, dikenal sebagai produk sel mast, juga menyebabkan hiperresponsif bronchial pada tikus. Sel mast juga menyusup ke kelenjar mukosa saluran napas pada subyek asma, dimana sel mast memainkan peran penting dalam mengatur sekresi kelenjar lendir (Bradding *et al.*, 2007).

Degranulasi sel mast

Sel mast banyak terdapat di saluran napas, terutama di epitel bronkus dan dinding alveolus, sel mast mengandung *neutral tryptase*. Triptase mempunyai bermacam aktivitas proteolitik antara lain aktivasi komplemen, pemecahan fibrinogen dan pembentukan kinin. Sel mast yang teraktivasi akan mengeluarkan berbagai mediator seperti histamin dan *platelet aggregating factor* yang berperan pada fase dini, *prostaglandin-D2* (PGD2), *Leukotrien-C4* (LTC4) dan *chemotactic factor* yang berperan pada fase lambat. Akibatnya, pada fase dini terjadi bronkospasme, edema dan hipersekresi bronkus, sedangkan pada fase lambat terjadi penumpukan sel radang, yang kalau dibiarkan berlarut-larut akan berkembang menjadi keadaan *bronchial hyperresponsiveness*, suatu bentuk inflamasi kronik dengan sel eosinofil sebagai peran utama (Murdoch & Lloyd, 2010).

Degranulasi sel mast dapat terjadi secara IgE-mediated atau tidak. Yang IgE-mediated, yakni *immediate hypersensitivity* atau *anaphylaxis*, berhubungan dengan respons imun yang tidak wajar di saluran nafas terhadap antigen / alergen, berupa pembentukan IgE yang dominan, yang diikat sel mast pada permukaannya melalui reseptor Fc ϵ RI, selanjutnya, bila terjadi pemaparan ulang dengan antigen yang sama, akan terjadi *cross-linking* antara antigen dan 2 molekul IgE pada permukaan sel mast, dan terjadi degranulasi. Yang non IgE-mediated tidak berkaitan dengan respons imun, dipengaruhi antara lain, faktor fisik misalnya

cuaca panas / dingin, kelembaban dan angin, faktor kimia misalnya berbagai polutan / iritan, dan faktor neurogen yang membebaskan asetilkolin (Bradding, 2007).

Mekanisme degranulasi sel mast diawali oleh interaksi Ig E dengan alergen pada permukaan sel mast, mengakibatkan aktivasi enzym proesterase menjadi enzym esterase aktif (E). Enzym tersebut mengaktifkan agregasi mikrotubuli dalam sitoplasma sel mast, yang mendekati membran sel mast. Melalui Mikrotubuli ini mediator akan dilepaskan oleh sel mast. Pelepasan mediator inflamasi berlangsung bila terjadi influks ion Ca^{2+} ekstraselular ke dalam sel mast. Influks Ca^{2+} ini mengakibatkan membran sel mast tidak stabil sehingga mudah ditembus oleh mediator kimia. Degranulasi sel mast juga tergantung kadar *cyclic Adenosine Mono Phosphate* (cAMP) dan *cyclic Guanosine Mono Phosphate* (cGMP) pada sitoplasma sel mast, yang dalam keadaan normal selalu seimbang. cAMP bersifat menghambat proliferasi dan pembentukan mikrotubuli, sedangkan cGMP bersifat menekan efek cAMP. Bila konsentrasi cGMP lebih tinggi dari konsentrasi cAMP, maka efek cAMP akan ditekan. Keadaan ini memudahkan terjadinya proliferasi mikrotubuli yang pada akhirnya memudahkan terjadinya degranulasi sel mast (Krystel-Whittemore, et al, 2016).

Aktivasi makrofag

Makrofag terdapat di lumen saluran nafas dalam jumlah banyak, diaktifasi

oleh *IgE-dependent mechanism* sehingga makrofag berperan dalam proses inflamasi pada penderita asma. Makrofag melepaskan mediator seperti tromboksan A2 (TxA_2), prostaglandin, *platelet activating factor* (PAF), leukotrien-B4 (LTB4), *tumor necrosis factor* (TNF), interleukin-1 (IL-1), reaksi komplemen dan radikal bebas oksigen. Berbeda dengan sel mast, pelepasan mediator oleh

makrofag dapat dihambat dengan pemberian steroid tetapi tidak oleh golongan agonis beta₂ (Meiyanti and Mulia, 2000). **Infiltrasi Eosinofil** Infiltrasi eosinofil di saluran napas merupakan gambaran khas untuk penderita asma. Terdapat korelasi antara jumlah eosinofil pada darah perifer dan pada bilasan bronkoalveolar dengan hiperresponsif bronkus. Eosinofil melepaskan mediator seperti LTC4, PAF, radikal bebas oksigen, *major basic protein* (MBP), *and eosinophil-derived neurotoxin* (EDN) yang bersifat sangat toksik untuk saluran napas (Nakagome and Nagata, 2011).

Aktivasi sel limfosit T

Limfosit T mempunyai peran penting dalam respon inflamasi asma, karena masuknya antigen ke dalam tubuh melalui antigen reseptor CD3. Secara fungsional CD3 dibagi menjadi 2 yaitu CD4 dan CD8. Limfosit T CD4 setelah diaktivasi oleh antigen, akan melepaskan mediator protein yang disebut limfokin.

Limfokin dapat mengumpulkan dan mengaktifkan sel granulosit. Limfosit T CD4 merupakan sumber terbesar dari IL-5. Zat IL-5 dapat merangsang maturasi dan produksi sel granulosit dari sel prekursor, memperpanjang kehidupan sel granulosit dari beberapa hari sampai beberapa minggu, bersifat kemotaksis untuk sel eosinofil, merangsang eosinofil untuk meningkatkan aktivitas respon efektor, mengaktifkan limfosit B untuk membuat antibodi yang dapat menimbulkan respon imun (Murdoch and Lloyd, 2010).

Kerusakan Sel Epitel

Kerusakan sel epitel saluran napas dapat disebabkan oleh karena *major basic protein* yang dilepas oleh eosinofil atau pelepasan radikal bebas oksigen dari berbagai sel inflamasi dan mengakibatkan edema mukosa. Sel epitel sendiri juga

mengeluarkan mediator. Kerusakan pada epitel bronkus merupakan kunci terjadinya hiperresponsif bronkus, ini dapat menjelaskan berbagai mekanisme hiperresponsif bronkus yang disebabkan paparan ozon, infeksi virus, dan alergen. Pada manusia, epitel bronkus dan trachea dapat membentuk PGE2 dan PGF2 alfa serta 12 dan 15 *hydroxyeicosatetraenoic acid* (12-HETE dan 15-HETE). 15-HETE bersifat kemotaksis terhadap eosinofil. Kerusakan epitel mempunyai peranan terhadap terjadinya hiperresponsif bronkus melalui cara pelepasan epitel yang menyebabkan hilangnya pertahanan, sehingga bila bahan iritan terinhalasi, akan langsung mengenai submukosa yang seharusnya terlindungi. Pelepasan epitel bronkus meningkatkan kepekaan otot polos bronkus terhadap bahan spasmogen. Kerusakan epitel bronkus menyebabkan ujung saraf perifer langsung terkena paparan atau teraktivasi oleh mediator inflamasi sehingga mengakibatkan terjadinya inflamasi melalui mekanisme akson refleks. Sel epitel mungkin dapat memproduksi enzim yang merusak mediator, yaitu *neutral actoenzym endopeptidase* yang dapat merusak bradikinin dan substans-P (Bousquet et al., 2000).

2.4.2 Pengobatan Asma

Secara umum obat asma dibagi menjadi dua kelompok, yaitu obat pelega (*relievers*) dan obat pengontrol (*controllers*). Obat pelega asma seperti bronkodilator. Bronkodilator yang banyak dipakai saat ini adalah beta₂-agonis *short acting*, antikolinergik dan xantin (GINA, 2017). Obat pengontrol asma yang banyak dipergunakan adalah kortikosteroid. Disamping obat-obat tersebut diatas dapat ditambah beberapa obat lain sesuai kondisi penderita asma, seperti inhibitor dan antagonis leukotrien, *Long-acting β₂-agonist*, Anti IgE (Omalizumab), Natrium kromoglikat serta berbagai antihistamin generasi baru. (Akib, 2002).

2.4.2.1 Short Acting beta₂-agonis

Beta₂-agonis banyak digunakan oleh subjek asma untuk meredakan gejala obstruktif. Beta₂-agonis yang paling sering digunakan adalah *Short Acting Beta₂-Adrenergic* (SABA) termasuk salbutamol, terbutalin dan fenoterol. Obat ini bekerja dengan mengikat beta₂-reseptor adrenergik, interaksi ini merangsang *adenylyl cyclase* dan mempromosikan peningkatan cAMP intraseluler, mengurangi kalsium intraseluler, mempromosikan aktivasi fosfokinase A dan fosforilasi beberapa protein seperti *myosin light chain*, sehingga terjadi relaksasi otot polos saluran napas (Kasahara, et al, 2005)

Penggunaan agonis SABA inhalasi paling sering adalah salbutamol sebagai terapi pelega lini pertama. 'Pelega' digunakan untuk akut, dalam beberapa menit, menghilangkan gejala asma melalui bronkodilatasi. Dibandingkan dengan pelega lainnya, SABA memiliki efek lebih cepat pada otot polos saluran napas, sementara profil keamanannya cukup baik tergantung dosis; tremor dan takikardi adalah efek samping yang paling umum. SABA oral umumnya sedikit penggunaannya (Papadopoulos et al., 2012).

2.4.2.2 Antikolinergik

Penelitian belakangan menyatakan bahwa antikolinergik seperti Ipatropium Bromida, Tiotropium, yang menempati reseptor Muskarinik dapat memblok asetilkolin. Diketahui asetilkolin yang dilepas baik oleh saraf parasimpatis maupun oleh sel-sel inflamasi mengaktifkan reseptor muskarinik sehingga menginduksi konstriksi otot polos saluran napas dan sekresi mukus. Pada asma dan penyakit paru obstruktif kronik (PPOK), peran asetilkolin terbukti juga meningkatkan proliferasi sel dan memicu pelepasan mediator proinflamasi seperti leukotrin dari sel otot polos, sel epitel dan sel inflamasi saluran napas, sehingga meningkatkan inflamasi saluran napas. Dengan pemberian antikolinergik dapat melegakan

konstriksi otot polos saluran napas, mengurangi inflamasi dan juga menghambat terjadinya *airway remodeling* (Bos *et al.*, 2007).

2.4.2.3 Xanthin

Theophylline (dimethylxanthine) telah digunakan untuk mengobati penyakit saluran napas selama lebih dari 80 tahun. Pada awalnya digunakan sebagai bronkodilator, tetapi dengan dosis yang relatif tinggi sering menimbulkan efek samping, sehingga penggunaannya berkurang, sejak agonis beta₂ inhalasi lebih banyak digunakan. Baru-baru ini telah terbukti teofilin memiliki efek antiinflamasi pada asma dan PPOK pada konsentrasi yang lebih rendah. Mekanisme molekuler bronkdilatasi adalah menghambat PDE3, tetapi efek antiinflamasi mungkin karena penghambatan PDE4 dan aktivasi *histone deacetylase-2* (HDAC2), sehingga menonaktifkan gen inflamasi. Melalui mekanisme ini, teofilin juga membalikkan resistensi kortikosteroid, dan ini merupakan nilai khusus dalam terapi asma berat dan *Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (COPD), yang aktivitas HDAC2-nya berkurang (Barnes, 2013).

2.4.2.4 Kortikosteroid

Kortikosteroid inhalasi (ICSSs) digunakan secara ekstensif dalam pengobatan asma dan PPOK karena efek antiinflamasinya yang luas. Kortikosteroid meningkatkan fungsi paru-paru, gejala, dan kualitas hidup dan mengurangi eksaserbasi dalam kedua penyakit tersebut tetapi tidak mengubah perkembangan penyakit. Mereka menurunkan angka kematian pada asma tetapi tidak PPOK. Sebagian besar manfaat dari ICSSs terjadi pada rentang dosis rendah ke menengah. Dengan penggunaan secara tepat, ICSSs memiliki efek samping sedikit pada dosis rendah sampai menengah, tapi risiko meningkat dengan dosis tinggi. Mekanisme aksi kortikosteroid dengan memasuki sitoplasma sel dan

berikatan dengan kompleks reseptor inaktif glukokortikoid. Akibatnya, reseptor glukokortikoid yang diaktifkan mengikat DNA pada urutan elemen respon glukokortikoid dan mempromosikan sintesis protein antiinflamasi (*transactivation*) dan menghambat transkripsi dan sintesis banyak sitokin proinflamasi (*transrepression*). *Transactivation* juga bertanggung jawab untuk banyak efek sistemik kortikosteroid yang merugikan. Kortikosteroid juga mengurangi jumlah limfosit T, sel dendritik, eosinofil, dan sel mast dalam saluran napas dan mengurangi produksi *inducible nitric oxide* (Raissy et al., 2013).

2.4.2.5 Inhibitor dan Antagonis Leukotrien

Obat antileukotriene meliputi inhibitor 5-lipoxygenase oleh zileuton dan CysLT1 blokade oleh montelukast atau zafirlukast. Dengan memblok reseptor CysLT1, bronkonstriksi yang diinduksi adenosine yang dimediasi oleh sintesis dan pelepasan autacoids oleh sel mast saluran napas dapat dicegah (Rorke, et al, 2002). Manfaat terapi antileukotriene pada anak-anak dan orang dewasa dengan asma meningkatkan fungsi paru, menurunkan gejala asma, mengurangi kebutuhan β_2 *short-acting* agonis sebagai penyelamat, lebih sedikit eksaserbasi asma, dan peningkatan kualitas hidup. Kortikosteroid inhalasi lebih poten dari pada agen antileukotriene, dan karenanya disukai sebagai pengobatan lini pertama; Namun, terapi antileukotriene dapat digunakan awal pada pasien yang tidak dapat atau tidak akan menggunakan kortikosteroid. Agen antileukotriene memiliki manfaat tambahan pada pasien yang penyakitnya tidak dapat dikendalikan oleh kortikosteroid inhalasi, ini mungkin mencerminkan ketidakmampuan kortikosteroid untuk menghambat jalur leukotrien. Montelukast juga memberikan perlindungan terhadap asma akibat olahraga. Dosis oral tunggal montelukast seefektif salmeterol inhalasi, *long-acting* β_2 agonis, dalam mencegah asma yang diinduksi latihan. *Remodeling* saluran napas tampaknya resisten terhadap kortikosteroid.

inhalasi. Namun, pada model tikus asma alergi kronis, CysLT1 blokade dengan montelukast mengembalikan semua fitur histologis dari *remodeling* saluran napas (Peters-Golden and Henderson, 2007).

2.4.2.6 Natrium Kromoglikat / Kromolin

Natrium Kromoglikat / Kromolin mempunyai aktivitas farmakologi sebagai penstabil degranulasi sel mast. Digunakan dalam terapi penyakit yang berhubungan dengan sel mast antara lain rhinitis alergi, asma, konjunktivitis alergi, mastositosis, urtikaria dermatografik maupun colitis ulceratif. Kromolin beraksisi dengan menstabilkan sel mast, mencegah pelepasan mediator-mediator dari membran sel mast, obat tersebut menghambat respon serabut sensori C terhadap iritan kapsasin, menghambat refleks akson lokal pada asma, dan juga menghambat pelepasan sitokin sel T dan mediator-mediator lain yang terlibat dalam asma. Kromolin juga dilaporkan menghambat kanal ion kalsium, kemudian menghambat refleks neuronal akibat stimulasi dari reseptor iritan pada akhir syaraf sensory, dan pelepasan sitokin dari beberapa tipe sel inflamasi (sel T, eosinofil) dalam patogenesis asma alergi. Ringkasnya, senyawa ini menghambat influks kalsium sehingga mencegah degranulasi sel mast, dan akibatnya adalah mencegah pelepasan mediator histamin bisa dicegah (Sano, et al, 2006)

2.4.3 Kontraksi dan Relaksasi Otot Polos Saluran Napas Asma

Asma merupakan penyakit saluran napas yang melibatkan kontraksi dan relaksasi otot polos. Karakteristik asma berupa hiperresponsif dan *remodeling* saluran napas. *Airway Hyperresponsiveness* (AHR) digambarkan sebagai penyempitan berlebihan saluran napas terhadap berbagai rangsangan bahan kimia, fisika dan farmakologi (Dekkers et al., 2009). Yang berperan pada penyempitan saluran napas adalah otot polos saluran napas (*Airway Smooth Muscle*).

Muscle = ASM), yang terletak di dinding saluran napas, dan kontraksinya menginduksi pengecilan lumen jalan napas dan menyebabkan peningkatan resistensi aliran udara. Kontraktilitas ASM dimodulasi oleh berbagai *messenger* ekstraseluler yang beraksi pada reseptor tertentu yang terletak di membran plasma sel ASM. Messenger ekstraseluler yang utama adalah *neurotransmitter* dari sistem saraf otonom dan mediator yang dilepas dari sel-sel inflamasi.

Pengikatan *messenger* kontraktil ke reseptor membran spesifiknya meningkatkan konsentrasi Ca^{2+} sitosol sehingga terjadi kontraksi ASM (Ouedraogo and Roux, 2014), selain itu pengaktifan respon pada reseptor yang terkait dengan *adenylyl cyclase* (AC) akan mengubah konsentrasi siklik AMP intraseluler, bila reseptor merangsang AC akan terjadi relaksasi, sementara yang menghambat AC akan terjadi konstriksi (Yu, 2009).

Terjadinya AHR dibedakan berdasarkan 1). Rangsangan langsung seperti metakolin atau histamin yang berefek langsung pada reseptornya di otot polos saluran napas sehingga menyebabkan kontraksi dan 2). Rangsangan tidak langsung yakni rangsangan melalui pemberian aerosol seperti alergen, agen osmotik (manitol), atau adenosin monofosfat (AMP), yang menyebabkan sel-sel inflamasi melepaskan berbagai mediator bronkokonstriksi seperti histamin, prostaglandin, leukotrin yang bertindak pada reseptor khusus di otot polos saluran napas sehingga menyebabkan kontraksi dan penyempitan saluran napas (Brannan and Lougheed, 2012).

Adapun mekanisme terjadinya AHR bisa melalui beberapa cara seperti *Nitric Oxide*, mekanisme kolinergik dan Rho kinase (lihat gambar 2.5) (Meurs et al., 2008).

Nitric Oxide

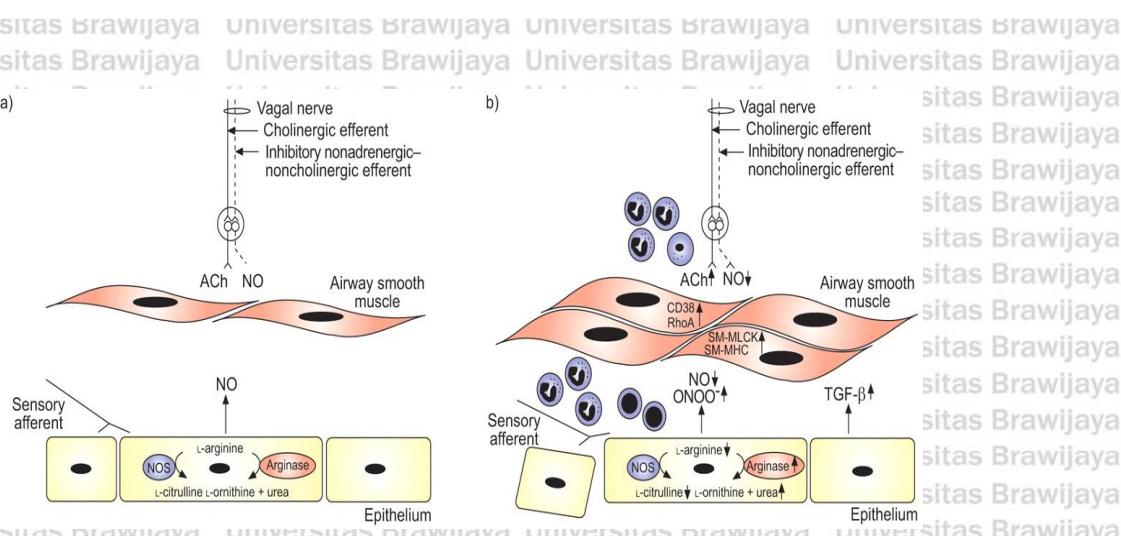
Nitric Oxide (NO) pada spesies mamalia berperan mengontrol fungsi hampir setiap sel maupun organ dalam tubuh termasuk saluran napas. NO yang

berasal dari *endothelial NO synthase* (eNOS) terbukti dapat menghambat inflamasi saluran napas dengan menekan aktivasi *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B), sehingga menghambat ekspresi *inducible NOS* (iNOS), serta produksi sitokin inflamasi (Ricciardolo, 2003). Pada asma eksperimental, iNOS diinduksi dalam saluran napas selama *late phase reaction* (LPR) yang diinduksi alergen, ini meningkatkan kadar NO yang dihembuskan di udara. Konsentrasi tinggi NO yang berasal dari iNOS dapat merugikan saluran napas karena berkontribusi terhadap peningkatan permeabilitas pembuluh darah, hipersekresi lendir, infiltrasi sel inflamasi, kerusakan sel epitel dan meningkatnya respon inflamasi yang dimediasi Th2 di saluran napas (Ricciardolo, 2003).

Efek merusak yang disebabkan oleh NO dari iNOS dapat berlanjut melalui pembentukan peroksinitrit (ONOO $^-$), suatu oksidan yang sangat reaktif yang disintesis oleh reaksi cepat NO dengan anion superokksida (O $_2^-$), yang dihasilkan dalam saluran napas inflamasi. AHR dan inflamasi saluran napas disebabkan oleh kegagalan NO yang berasal dari *constitutive NOS* (cNOS) dan iNOS mengerahkan efek bronkodilator saluran pernafasan dan anti-inflamasi dan bukan oleh kelebihan NO (Ricciardolo, 2003).

Mekanisme kolinergik

Sistem saraf parasimpatis merupakan jalur bronkokonstriksi utama, dimana asetilkolin adalah neurotransmitter utamanya. Berbagai mediator inflamasi akut, termasuk histamin, prostaglandin (PG)D2 dan bradikinin, juga tachykinin (substansi P dan neurokinin A) yang dilepas oleh serat sensorik C *nonmyelin* di saluran napas dapat meningkatkan transmisi kolinergik ganglionik.



**Gambar 2.5 a) AHR pada saluran napas individu normal
b) AHR pada saluran napas penderita asma
(Meurs et al., 2008)**

Keterangan : Gb 2.5 menunjukkan pada saluran napas pasien asma, AHR akut disebabkan sebagian oleh peningkatan mediator yang dilepas oleh sel-sel inflamasi seperti histamin dan leukotrin yang secara langsung menginduksi bronkonstriksi dan meningkatkan respon bronkonstriktor terhadap agonis lain. Mediator inflamasi ini juga meningkatkan pelepasan ACh dengan mengaktifkan serat saraf sensori aferen dan secara langsung memfasilitasi neurotransmisi ganglionik dan pelepasan asetilkolin dari ujung saraf vagal. Pelepasan ACh juga ditingkatkan oleh *disfungsi prejunctional muscarinic M₂ autoreceptors* yang disebabkan oleh pelepasan produk eosinofil MBP, yang bertindak sebagai M₂ reseptor antagonis. MBP juga menyebabkan kerusakan epitel dan meningkatkan tereksposnya serat saraf sensori aferen. Sebaliknya pelepasan bronkodilator NO berkurang selama inflamasi saluran napas sebagai akibat dari berkurangnya ketersediaan L-arginin dalam epitel saluran napas dan inhibitor ujung saraf nonadrenergic–noncholinergic. Rendahnya konsentrasi L-arginin menyebabkan pembentukan peroksinitrit (ONOO[•]) yang prokontraktil dan proinflamasi. Meningkatnya sitokin, faktor pertumbuhan, mediator dan neurotrasmitter kontraktil seperti berkurangnya NO, juga menyebabkan perubahan struktural dan fenotip lapisan otot polos saluran napas yang berimbas pada berbagai respon terhadap peningkatan AHR. Perubahan struktural dan fenotip meliputi peningkatan ekspresi protein kontraktil dan *contraction-regulatory proteins* seperti *smooth-muscle-myosin-heavy-chain* (SM-MHC), *SM-myosin-light chain kinase* (SM-MLCK), CD38 dan RhoA, juga penebalan otot polos saluran napas yang disebabkan oleh hiperplasia dan hipertrofi otot polos saluran napas (Meurs et al, 2008).

Pelepasan asetilkolin dari ujung saraf parasimpatis diatur oleh berbagai reseptor *prejunctional* yang dapat menghambat atau memfasilitasi keluarnya neurotransmitter. Reseptor M₂ *muscarinic Autoinhibitory*, yang diaktifkan oleh asetilkolin sendiri, merupakan suatu umpan balik negatif yang penting, membatasi pelepasan lanjut, terutama pada frekuensi yang lebih tinggi. Pada model hewan

alergi inflamasi saluran napas dan asma, maupun sebagian pasien asma ditemukan disfungsi *autoreseptor M₂* yang berkontribusi terhadap pelepasan asetilkolin yang berlebihan dari ujung saraf vagal, terjadi peningkatan aktivitas refleks kolinergik dalam menanggapi rangsangan inhalasi dan AHR. Sebagian besar disfungsi *autoreceptor M₂* disebabkan oleh eosinofil yang teraktivasi bermigrasi ke saraf kolinergik dan melepaskan MBP, yang bertindak sebagai alosterik M₂ antagonis, menyebabkan bronkokonstriksi dan sekresi mukus dalam saluran napas (Roffel *et al.*, 1990 dalam Awortwe *et al.*, 2011).

Rho Kinase

Kontraksi otot polos saluran napas selain diatur oleh mekanisme Ca²⁺-dependent, juga diatur oleh mekanisme Ca²⁺-independent. Jalur Rho kinase termasuk mekanisme Ca²⁺-independent. RhoA / Rho kinase cascade dapat dirangsang oleh berbagai reseptor, termasuk yang meng-couple ke G12 / 13, Gi dan Gq. Fosforilasi Rho kinase yang diaktifkan, diantaranya, MLC fosfatase (MLCP), yang menyebabkan defosforilasi MLC20; sebagai konsekuensinya, MLCP di-inaktifkan, sehingga terjadi peningkatan fosforilasi MLC20 dan menambah kontraksi. Jadi peran jalur ini terhadap AHR pada asma berdasarkan aktivasi RhoA / Rho kinase pathway oleh mediator inflamasi. Peningkatan RhoA / Rho kinase signaling adalah fitur AHR pada model hewan asma (Witzenrath *et al.*, 2008).

2.4.4 Regulasi Saraf dan Parakrin pada Kontraksi Otot Polos Saluran Napas

Sistem saraf parasimpatis merupakan bronkokonstriktor utama jalur saraf di saluran napas, persarafan kolinergik bertanggung jawab untuk tonus basal saluran napas. Serat kolinergik berjalan kesaraf vagus di dalam ganglia parasimpatis dalam dinding saluran napas. Densitas ganglia parasimpatis adalah

maksimal dalam proksimal saluran napas, sekitar generasi bronkial 5-7. Dari ganglia ini, serabut *post-synaptic* mencapai otot polos dan kelenjar ACh, neurotransmitter utama dari sistem saraf parasimpatis, dilepas pada ganglionik *neurotransmitter* utama dari sistem saraf parasimpatis, dilepas pada ganglionik *nicotinic cholinoreceptors* yang bertanggung jawab untuk neurotransmisi dan reseptor *muscarinic M₁* yang terlibat dalam umpan balik negatif. Pada *neuromuscular junction*, ACh mengaktifkan *post-junction M₃ muscarinic receptor* yang bertanggung jawab untuk kontraksi, dan juga *pre-junction receptor M₂* yang terlibat dalam *retrocontrol* negatif dari pelepasan ACh (Canning, 2006).

Berlawanan dengan stimulasi kolinergik, stimulasi adrenergik merelaksasi saluran napas. Meskipun persarafan adrenergik dari otot polos saluran napas lemah pada manusia, beta₂-adrenoseptor sebagian besar diekspresikan dalam otot polos saluran napas. Selain itu, serat adrenergik dapat menargetkan ganglia parasimpatis, yang memungkinkan sebuah kontrol tak langsung adrenergik dari stimulasi saluran napas. Sebagai tambahan dengan ACh dan noradrenalin, komponen non-adrenergik non-kolinergik (NANC) dari sistem saraf otonom dapat melepaskan bahan kontraktor atau relaksan agonis lainnya seperti *neuropeptide Y*, substansi P, ATP dan neurokinines, atau *vasoactive intestinal peptide* (VIP). Namun, sistem NANC tidak sangat dikembangkan di saluran napas manusia dan memiliki efek regulasi kecil pada fungsi saluran napas manusia (Canning, 2006). Selain sistem saraf otonom, ada beberapa tipe sel yang terletak di dinding saluran napas, seperti sel-sel epitel, sel inflamasi, dan miosit sendiri, dapat melepaskan berbagai mediator seperti, histamin, *endothelin*, ATP, dan metabolit asam arakidonat (AA), yang dapat memodulasi kontraksi saluran napas melalui reseptor membran spesifik (Ouedraogo and Roux, 2014).

2.5 Reseptor Pada Saluran Napas

Fungsi saluran napas dipengaruhi oleh banyak hormon, neurotransmitter, obat-obatan dan mediator, yang menghasilkan efeknya dengan mengikat sisi tertentu atau reseptor pada permukaan eksternal dari berbagai sel target dalam saluran napas. Oleh karena itu bronkokonstriksi dan bronkodilatasi dihubungkan dengan aktivasi atau blokade reseptor. Sebagian besar bronkodilator yang digunakan saat ini menghasilkan efeknya dengan berinteraksi dengan reseptor saluran napas. Reseptor sel yang relevan dengan fungsi jalan nafas bisa dikelompokkan menjadi reseptor otonom, yang memediasi efek dari sistem saraf otonom pada saluran napas (seperti reseptor kolinergik (muskarinik), reseptor β_2 adrenergik), dan reseptor mediator, yang diaktifkan oleh berbagai mediator inflamasi yang terlibat dalam penyakit saluran napas seperti reseptor histamin, reseptor leukotrin, reseptor prostaglandin (Yu, 2009).

2.5.1 Reseptor \Beta_2 Adrenergik

Efek yang ditimbulkan β_2 adrenergik reseptor pada saluran napas yakni bronkodilator. *Beta₂-adrenoceptor* manusia merupakan anggota dari keluarga reseptor dengan 7-transmembran, dikodekan oleh gen pada kromosom 5, dan didistribusikan secara luas di sistem pernapasan, tidak hanya di otot polos saluran napas (30-40,000 per sel) tetapi juga pada sel-sel lain di paru-paru, seperti sel epitel dan sel endotel, sel tipe II, dan sel mast (Johnson, 2006).

2.5.1.1 Aktivasi dan Jalur Sinyal \Beta_2 Reseptor

\Beta_2 -adrenoceptor berosilasi antara 2 bentuk, aktif dan tidak aktif, yang berada dalam keseimbangan, dengan keadaan tidak aktif menjadi predominan.

Bentuk β_2 -reseptor yang diaktifkan berkaitan dengan subunit alfa (α) dari

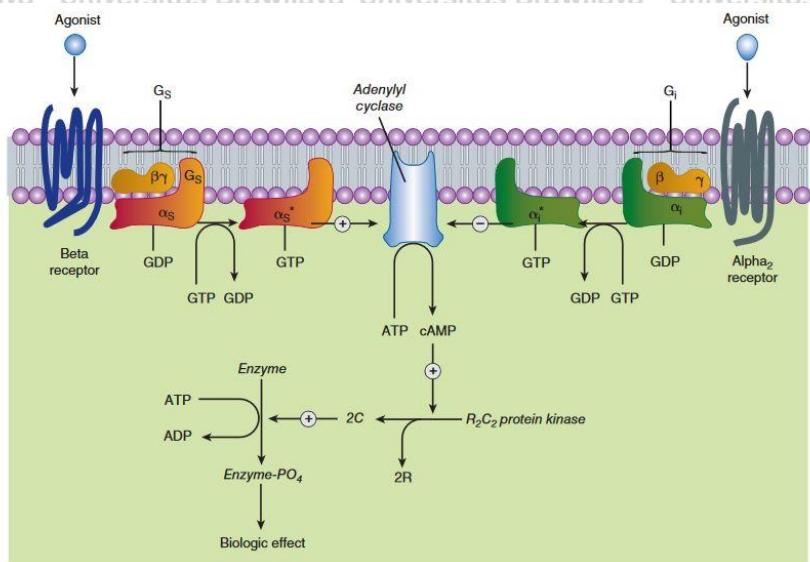
protein Gs, bersama-sama dengan molekul guanosin trifosfat (GTP). Penggantian GTP oleh guanosin difosfat (GDP) secara dramatis mengurangi afinitas subunit alfa untuk reseptor, menyebabkan disosiasi dan menginduksi reseptor untuk kembali ke bentuk tidak aktif. Agonis penuh bisa memindahkan keseimbangan secara menyeluruuh ke arah bentuk diaktifkan (Mutlu and Factor, 2008).

Sejak tahun 1960 telah dinyatakan bahwa aktivasi beta₂-reseptor dimediasi oleh peningkatan level cAMP intraseluler. Stimulasi adenilat siklase mengkatalisis konversi ATP ke cAMP (lihat gambar 2.6). Coupling dari beta₂-reseptor ke adenilat siklase dipengaruhi melalui trimerik protein Gs, yang terdiri dari subunit alfa (yang merangsang adenilat siklase) dan subunit beta-gamma ($\beta\gamma$) (yang mentransduksi sinyal lain). Tingkat cAMP kemudian diatur melalui aktivitas isozim / isoform phosphodiesterase, yang menurunkannya ke 5-amp (Johnson, 2006).

Aktivitas cAMP yang diketahui adalah cAMP mengkatalisis aktivasi protein kinase A (PKA), yang pada gilirannya memfosforilasi protein regulator kunci yang terlibat dalam pengendalian tonus otot. cAMP juga menghasilkan penghambatan pelepasan Ca²⁺ dari penyimpanannya di intraseluler, mengurangi masuknya Ca²⁺ membran, dan penyerapan Ca²⁺ intraseluler, yang mengarah ke relaksasi otot polos saluran napas. Respon relaksasi beta₂-agonis disampingitmelalui mekanisme cAMP-dependent, beberapa respon relaksasi beta₂-agonis mungkin dimediasi melalui mekanisme cAMP-independent, yang melibatkan interaksi langsung dari Gs dengan saluran kalium, yang hadir dalam membran sel otot polos saluran napas (Mutlu and Factor, 2008).

Beta₂-reseptor dapat juga bergabung ke Gi protein, mengakibatkan stimulasi sinyal-regulasi kinase ekstraseluler dan jalur p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). Aktivasi jalur ini oleh beta₂-reseptor dimediasi oleh subunit beta-gamma dari protein G yang bisa berfungsi untuk melepaskan beta₂-reseptor dari Gs, sehingga merupakan sarana mengakhiri sinyal dan respon beta₂-agonis /

reseptor. Selain itu, MAPK yang diaktifasi beta₂-reseptor memfosforilasi reseptor glukokortikoid (GR) yang meningkatkan translokasi GR dari sitosol sel ke inti, ini merupakan langkah mendasar dalam aktivitas anti-inflamasi kortikosteroid dimana terjadi sinergi antara beta₂-reseptor dan GR (Johnson, 2006).



Gambar 2.6 Mekanisme aksi beta₂ adrenergik reseptor (Katchung et al., 2012)

2.5.1.2 Interaksi Beta₂ Reseptor Agonis

Struktur molekul dari beta₂-agonis menentukan cara berinteraksi dengan beta₂-adrenoseptor. *Short-acting* beta₂-agonis, seperti albuterol, yang hidrofilik secara alami, mengakses tempat aktif beta₂-adrenoseptor langsung dari cairan ekstraseluler *compartment*. Oleh karena itu *onset*-nya cepat. Namun, obat ini cepat kembali dalam keadaan seimbang, waktu tinggal mereka di tempat aktif reseptor terbatas, dan menghasilkan durasi kerja pendek (4-6 jam). *Long-acting* beta₂-agonis memiliki mekanisme aksi yang berbeda. Formoterol cukup lipofilik, dan masuk ke dalam membran sel dalam bentuk depot, dari mana secara progresif keluar untuk berinteraksi dengan tempat aktif dari beta₂-receptor. Ukuran depot

ditetukan oleh konsentrasi atau dosis formoterol yang digunakan. *Onset of action* formoterol agak tertunda dibandingkan dengan albuterol, dan durasinya lebih lama dan tergantung konsentrasi. Salmeterol, 10.000 kali lebih lipofilik dari pada albuterol. Partisi molekul cepat (<1 menit) ke dalam membran sel dan kemudian berdifusi secara lateral untuk mendekati lokasi aktivitas β_2 -adrenoseptor melalui membran, proses ini terjadi lambat (> 30 menit). Oleh karena itu *onset of action* salmeterol di otot polos saluran napas lebih lambat dibandingkan β_2 -agonis lainnya, seperti albuterol dan formoterol. Mekanisme kerja dari salmeterol melibatkan interaksi dari rantai samping molekul dengan tempat ikatan tambahan (*exosite*), suatu domain asam amino yang sangat hidrofobik dalam domain keempat dari β_2 -adrenoseptor. Ketika rantai samping ber-asosiasi dengan *exosite* itu, molekul dicegah dari pemisahan β_2 -adrenozeptor, tapi kepalanya bebas terlibat dan melepaskan situs aktif dengan cara *Charnie're* (seperti engsel). Salmeterol tampaknya inheren *long-acting*, di mana efeknya tidak tergantung dosis sebagai akibat dari ikatan *exosite* (Mutlu and Factor, 2008).

Afinitas ligan merupakan ukuran kemampuan mengikat reseptor. Beberapa β_2 -agonis terbukti memiliki afinitas jauh lebih tinggi daripada isoproterenol. Albuterol memiliki afinitas relatif rendah untuk β_2 -adrenoseptor. Sebaliknya, salmeterol dan formoterol memiliki 3 hingga 4 kali lipat afinitas yang lebih tinggi untuk β_2 -adrenoseptor dari pada albuterol. Potensi β_2 -agonis merupakan fungsi dari afinitas reseptor dan efikasi (khasiat). Agonis penuh akan memiliki efikasi yang tinggi, sedangkan antagonis murni akan memiliki efikasi rendah atau nol. Mayoritas β_2 -adrenoseptor agonis memiliki efikasi menengah, dan jika jumlah reseptor mencukupi, mereka akan berperilaku sebagai agonis penuh, tetapi jika densitas reseptor terlalu rendah atau *coupling* reseptor tidak memadai, β_2 -agonis mungkin berperilaku dengan cara parsial; yaitu, akan tidak mampu mencapai efek maksimum yang sama sebagai agonis dengan efikasi yang lebih

tinggi, dan itu mungkin bahkan berperilaku sebagai antagonis. Contoh-contoh senyawa efikasi tinggi (agonis penuh) adalah isoproterenol, fenoterol, dan formoterol, sedangkan albuterol dan terbutaline adalah efikasi sedang (agonis parsial). Salmeterol memiliki efikasi pada beta₂-adrenoseptor di otot polos saluran napas lebih rendah dari pada albuterol. (Johnson, 2006).

2.5.1.3 Desensitisasi dan Polimorfisme Beta₂ Adrenoseptor

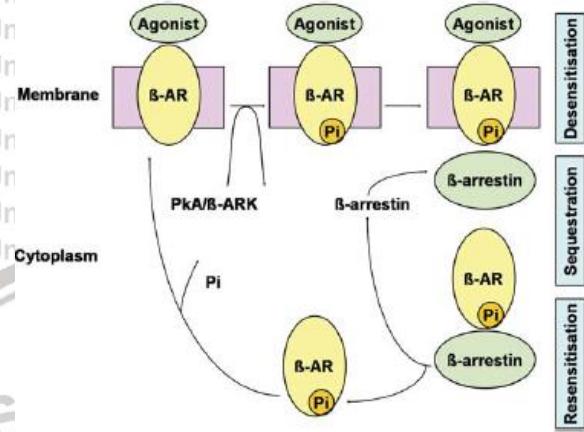
Desensitisasi terjadi sebagai respons terhadap asosiasi dari reseptor dengan molekul agonis. Mekanisme desensitisasi terdiri dari 3 proses utama: (1) uncoupling reseptor dari adenilat siklase, (2) internalisasi reseptor *uncoupled*, dan (3) fosforilasi reseptor yang diinternalisasi. *Uncoupling* terjadi cepat (detik sampai menit) dan prosesnya reversibel secara parsial dimediasi oleh fosforilasi reseptor oleh beta-adrenoseptor kinase (b-ARK), yang beraksi di C-terminus reseptor yang diduduki oleh agonis. β-Y subunit dari Gs meletakkan b-ARK ke membran sel sehingga terjadi fosforilasi reseptor, dan meningkatkan ikatan b-Arrestin, yang menghasilkan *uncoupling* lebih lengkap (lihat Gambar 2.7). Setelah paparan agonis lebih lama, terjadi internalisasi reseptor (disebut juga penyerapan), dimana menghasilkan beberapa kehilangan dari permukaan sel. Internalisasi merupakan defosforilasi yang memakan waktu lebih lama untuk membalik dari *uncoupling* (Barisione et al., 2010).

Down-regulation adalah proses yang lebih lambat (jam-jaman) yang dihasilkan dari paparan dosis tinggi agonis terus menerus. *Down-regulation* melibatkan degradasi protein reseptor dan menurunnya sintesis mRNA, *reversal* adalah proses lambat yang membutuhkan peningkatan regulasi sintesis protein reseptor baru (Barisione et al., 2010).

Diperkirakan sejumlah polimorfisme beta₂-reseptor dapat mengubah perilaku reseptor setelah paparan agonis. Secara klinis, diduga polimorfisme inilah kemungkinan penyebab terjadinya *down-regulation* reseptor di saluran napas sehingga dapat memodifikasi respon bronkodilator. Terdapat 2 gen untuk beta₂-adrenoreseptor, karena itu seorang individu dapat homozigot atau heterozigot untuk polimorfisme yang terjadi. Studi pada beta₂-adrenoceptor teridentifikasi ada total 9 polimorfisme yang berbeda, dengan perubahan basa tunggal di posisi yang berbeda dalam urutan gen yang dikode. 4 polimorfisme, yang dihasilkan dari perubahan basa tunggal, mengubah urutan asam amino dari protein reseptor. Tiga dari polimorfisme ini mengubah sifat fungsional dari reseptor, sehingga saluran napas individu dengan bentuk-bentuk reseptor ini berperilaku berbeda ketika terekspose katekolamin atau beta₂-agonis eksogen (Johnson, 2006).

2.5.2 Reseptor Kolinergik Muskarinik

Di paru-paru, reseptor muskarinik hadir pada otot polos saluran napas dan pada saraf yang mengontrol otot polos saluran nafas. Reseptor muskarinik juga



Gambar 2.7 Mekanisme desensitisasi beta₂ reseptor (Barisione et al., 2010)

dilokalisasi ke epitel dan kelenjar (M_3). Reseptor muskarinik hadir pada otot polos saluran napas dalam trachea dan bronkus, kepadatan terbesar reseptor muskarinik adalah dalam trachea yang lebih rendah. Di sebagian besar spesies alveoli berisi sangat sedikit reseptor muskarinik, sedangkan di beberapa spesies (musang dan marmot) alveoli tidak memiliki reseptor muskarinik. Reseptor muskarinik di trachea manusia merupakan M_2 atau M_3 (Brown, et al., 2013).

2.5.2.1 Fungsi Reseptor M_2 dan M_3 pada Otot Polos Saluran Napas

M_3 reseptor muskarinik di otot polos saluran napas tergabung pada fosfolipase C melalui protein G yang tidak sensitif pertusis toksin (*GTP-binding protein regulator*). Aktivasi fosfolipase C mengkatalisis pembentukan trifosfat inositol dan diasiglycerol dari fosfolipid membran fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat dan fosforilasi protein melalui aktivasi protein kinase. *Coupling* M_3 reseptor ke inositol trifosfat telah dibuktikan dalam semua spesies yang dipelajari, termasuk di otot polos bronkus manusia (Masaru and Yoshihisa, 2006).

Meskipun 50 sampai 80% dari reseptor muskarinik pada otot polos saluran napas adalah reseptor M_2 , fungsi reseptor ini masih belum jelas. Stimulasi reseptor muskarinik M_2 di otot polos saluran napas menyebabkan penghambatan adenilat siklase melalui penghambatan protein G (G_i) yang sensitif pertusis. Jadi, meskipun reseptor muskarinik M_2 tidak berperan langsung pada kontraksi otot polos, mereka muncul untuk menghambat relaksasi otot polos yang membutuhkan aktivasi adenilat siklase, misalnya, relaksasi yang diinduksi beta-agonis (Masaru and Yoshihisa, 2006).

2.5.2.2 Peran Asetilkolin di Reseptor Muskarinik Otot Polos Saluran Napas

Di saluran pernafasan, asetilkolin (ACh) adalah neurotransmitter parasimpatik yang dominan dan perannya dalam meregulasi tonus *bronchomotor* dan sekresi lendir dari kelenjar submukosa, disamping itu, ACh mengatur fungsi tambahan pada saluran pernafasan, termasuk peradangan dan *remodeling* selama penyakit inflamasi paru. ACh menjalankan fungsinya baik melalui reseptor muskarinik, kelas *G-protein-coupled-subtype* reseptor, atau melalui reseptor nikotinik, sebuah kelas saluran kation *ligand-gated*. Reseptor muskarinik diekspresikan oleh sebagian besar sel struktural di dinding saluran nafas, termasuk otot polos saluran napas dan oleh sel inflamasi yang terlibat dalam patogenesis penyakit obstruktif saluran napas. Reseptor muskarinik memainkan peran proinflamasi pada sel-sel ini, yang menunjukkan bahwa penghambatan fungsi reseptor muskarinik memiliki efek antiinflamasi pada penyakit ini. Otot polos saluran napas mengekspresikan M₂ dan M₃ muskarinik reseptor kira-kira dalam rasio 4: 1. Reseptor muskarinik M₃ merupakan target utama ACh di saluran napas, yang terlibat dalam regulasi bronkokonstriksi. Selain itu, reseptor muskarinik mengatur proliferasi dan fungsi proinflamasi otot polos saluran napas. Agonis reseptor muskarinik menginduksi peningkatan proliferasi sel otot polos saluran napas dalam kombinasi dengan *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), yang dimediasi oleh reseptor muskarinik *Gq-protein-coupled* M₃ dan melibatkan sinergistik penghambatan fosforilasi glikogen sintase kinase-3 (GSK-3). GSK-3 adalah enzim yang mengatur banyak protein sinyal dan faktor transkripsi yang terlibat dalam ekspresi protein kontraktil dan proliferasi sel otot polos saluran napas (Kolahian and Gosen, 2012).

Penelitian belakangan menyatakan bahwa antikolinergik seperti Ipatropium

Bromida, Tiotropium, yang menempati reseptor Muskarinik, dapat memblok

pengeluaran ACh yang berlebihan. Diketahui ACh yang dilepas baik oleh saraf parasimpatis maupun oleh sel-sel inflamasi mengaktifkan reseptor muskarinik sehingga menginduksi konstriksi otot polos saluran napas dan sekresi mukus, Pada asma dan PPOK, peran ACh terbukti juga meningkatkan proliferasi sel dan memicu pelepasan mediator proinflamasi seperti leukotrin dari sel otot polos, sel epitel dan sel inflamasi saluran napas, sehingga meningkatkan inflamasi saluran napas. Pemberian antikolinergik dapat melegakan konstriksi otot polos saluran napas, mengurangi inflamasi dan juga menghambat terjadinya *airway remodeling* (Bos, et al, 2007).

2.5.3 Reseptor Histamin

2.5.3.1 Histamin

Histamin adalah molekul kecil yang berasal dari dekarboksilasi asam amino histidin yang dapat dirusak oleh enzim diamin oksidase (histiminase). Histamin merupakan amina biogenik endogen yang disintesis di seluruh jaringan dalam tubuh dan didistribusikan dalam konsentrasi tinggi di paru-paru, kulit, dan saluran gastrointestinal. Histamin disintesis dan disimpan pada konsentrasi tinggi dalam granul pada sel basofil dan sel mast. Sel mast memiliki reseptor permukaan yang mengikat IgE, dan ketika antigen cross-link dengan IgE pada permukaan sel mast, mereka merespon dengan mengeluarkan histamin, bersama dengan berbagai mediator bioaktif lainnya. Histamin sangat dikenal sebagai mediator reaksi alergi, tetapi juga berpartisipasi dalam berbagai proses normal lainnya dan patologis. Sensitivitas dan respon dari sel tertentu terhadap histamin tergantung pada jenis reseptor histamin yang hadir pada sel itu (Velez, et al, 2016).

Histamin beraksi sebagai neurotransmitter di sistem saraf dan sebagai mediator lokal di usus, kulit, dan sistem kekebalan tubuh. Histamin membawa perubahan fisiologis yang kompleks, termasuk neurotransmisi, inflamasi, kontraksi

Tabel 2.1 Jenis Reseptor Histamin dan Efek Biologisnya

Tipe Reseptor	Lokasi Jaringan	Efek Biologis
H ₁	Otot Polos, sel endotel	Respon alergi akut
H ₂	Sel parietal lambung	Sekresi asam lambung
H ₃	Sistem saraf pusat	Modulasi neurotransmisi
H ₄	Sel mast, eosinofil, sel T, sel dendritik	Regulasi respon imun

2.5.3.2 Reseptor Histamin H₁

Reseptor histamin pertama dikenal sejak karakterisasi farmakologis menggunakan antagonis dan agonis, diidentifikasi sebagai glikoprotein diekspresikan di seluruh tubuh dalam epitel pembuluh darah, otot polos pembuluh darah, neuronal, glial, dan sel imun tubuh. Reseptor H₁ milik keluarga GPCR, Reseptor H₁ manusia menghasilkan aksinya terutama dengan *coupling* ke G_{q/11} protein, tetapi juga memberi sinyal melalui G_{i/o} di beberapa sistem. Jalur sinyal utama untuk reseptor H₁ melibatkan aktivasi fosfolipase C, yang menghasilkan 1,2-diasilglicerol dan inositol-1,4,5-trifosfat, menyebabkan aktivasi protein kinase C, mengkatalisis fosforilasi serine/threonine (Ser/Thr) beberapa mediator hilir dan pelepasan ion kalsium dari simpanan intraseluler. Hal ini menyebabkan masuknya ion kalsium melalui saluran kalsium, *cation channel* dari reseptor transient, dan stimulasi dari Na⁺ / Ca²⁺ exchanger. Reseptor H₁ juga memediasi produksi asam arakidonat, nitrat oksida, dan siklik guanosin monofosfat (cGMP) melalui aktivasi

fosfolipase A2 yang dimediasi protein G_i / G_o, [Ca²⁺]-independent nitrit oksida (NO) sintase, dan NO-dependent guanilat siklase. Stimulasi reseptor H₁ meningkatkan transkripsi NO sintase endotel pada sel endotel vaskular manusia melalui jalur sinyal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), yang dapat melindungi di bawah kondisi normal, tetapi sebaliknya, mungkin merusak di bawah kondisi stres oksidatif, karena endotel NO synthase dapat menghasilkan reaktif oksigen spesies dengan mengorbankan NO. Histamin, melalui reseptor H₁, meningkatkan produksi NO endotelial sebagai endothelium-dependent vasodilator, tapi bertindak sebagai vasokonstriktor pada koroner atherosklerotik arteri. Stimulasi reseptor H₁ berujung pada kontraksi sel endotel dan dengan demikian meningkatkan permeabilitas pembuluh darah, dan pelepasan beberapa zat bioaktif termasuk oksida nitrat. Reseptor H₁ juga memodulasi aksi sel chromaffin pada medula adrenal dan limfosit (Panula et al., 2015)

Reseptor H₁ ditemukan di seluruh tubuh dan sistem saraf dengan variasi yang cukup besar di antara spesies. Reseptor H₁ diekspresikan dalam pembuluh darah dan otot polos saluran napas, kondrosit, hepatosit, sel endotel, dendritik sel, monosit, neutrofil, sel T dan sel B (Panula et al., 2015).

Agonis Reseptor H₁

Senyawa aktif agonistik yang terkait reseptor H₁ telah lama diabaikan. Dengan memodifikasi ligan endogen dikembangkan 2-(thiazol-2-yl)ethanamine (**2**), yang berkhasiat sedang sekitar 26% dari yang ditunjukkan oleh histamin dengan perilaku agonis parsial, kemudian 2-(3-bromophenyl)histamine atau 2-(3-(trifluoromethyl)phenyl)histamine (**3**), histaprodifen (**4**) sampai suprahistaprodifen (**5**) dikembangkan sebagai agonis parsial (Straßer et al., 2009).

Antagonis Reseptor H₁

Berbagai macam antagonis H₁ reseptor (antihistamin) tersedia dari beberapa keluarga kimia yang berbeda. Dua subkelompok utama atau "Generasi" telah dikembangkan. Generasi pertama, yang ditandai oleh *diphenhydramine*, sangat tinggi efek penenangnya dengan memblok reseptor otonom. Sub kelompok generasi pertama yang lebih baru mempunyai efek penenang dan efek otonom yang jauh lebih sedikit. Klorfeninamin dan *cyclizine* bisa dianggap sebagai prototipe. Generasi kedua H₁ bloker, ditandai oleh *cetirizine*, *fexofenadine*, dan *loratadine*, jauh lebih tidak larut dalam lipid daripada agen generasi pertama sehingga mengurangi efek penenang dan autonom. Semua antagonis H₁ aktif dengan pemberian oral. Beberapa dipromosikan untuk penggunaan topikal pada mata atau hidung. Sebagian besar di-metabolisme secara ekstensif di hati (Fitzsimons, et al, 2015).

Waktu paruh dari antagonis H₁ yang lebih tua bervariasi dari 4 sampai 12 jam. Agen generasi kedua memiliki waktu paruh 12-24 jam. Mekanisme kerja H₁ antagonis secara farmakologis berkompetitif di reseptor H₁; obat ini tidak berpengaruh pada pelepasan histamin dari tempat penyimpanannya. Mereka lebih efektif jika diberikan sebelum pelepasan histamin terjadi. Karena struktur mereka sangat mirip dengan muskarinik bloker dan bloker alfa-adrenoseptor, banyak generasi pertama antagonis H₁ secara farmakologis poten pada reseptor otonom. Beberapa juga memblokir serotonin reseptor. Seperti dicatat, sebagian besar agen generasi pertama yang lebih tua memiliki efek anestesi, beberapa memiliki efek anti-motion sickness. Banyak H₁ bloker adalah anestetik lokal yang manjur. Obat H₁ antagonis tidak memiliki efek pada reseptor H₂ (Trevor et al., 2013).

Penggunaan klinis H₁ antagonis terutama diaplikasi pada alergi tipe cepat (yaitu, alergi yang disebabkan oleh antigen yang bekerja pada sel mast yang

disensitisasi antibodi IgE). Kondisi ini termasuk *hay fever* dan urtikaria. *Diphenhydramine*, *dimenhydrinate*, *cyclizine*, *meclizine*, dan *promethazine* digunakan sebagai obat anti-mabuk. *Diphenhydramine* juga digunakan untuk kemoterapi yang menyebabkan muntah. Sedasi biasanya terjadi, terutama dengan *diphenhydramine* dan prometazin, hal ini jarang terjadi pada agen generasi kedua, yang tidak mudah masuk Susunan Saraf Pusat (SSP). Efek antimuskarinik seperti mulut kering dan penglihatan kabur terjadi dengan beberapa obat generasi pertama pada beberapa pasien dengan memblok alfa-adrenoseptor, yang signifikan dengan derivat fenotiazin seperti prometazin, dapat menyebabkan hipotensi ortostatik. Interaksi terjadi antara antihistamin yang lebih tua dan obat dengan efek sedatif lain (misalnya benzodiazepin dan alkohol). Obat yang menghambat metabolisme hati bila diberikan bersamaan dengan antihistamin bisa berakibat berbahaya. Misalnya, obat antijamur azole dan Inhibitor *Cytochrome P450 3A4* (CYP3A4) lainnya mengganggu metabolisme astemizole dan terfenadine, 2 agen generasi kedua yang telah ditarik dari pasaran AS karena konsentrasi plasma antihistamin yang tinggi dapat memicu aritmia yang mematikan (Travor *et al.*, 2013).

2.5.3.3 Reseptor Histamin H₄

Reseptor H₄ tergolong dalam kelas GPCR yang berikatan dengan G_o. *Second messenger* yang utama adalah peningkatan Ca²⁺ intraseluler. Jenis sel yang mengekspresikan reseptor H₄ diantaranya adalah eosinofil manusia. Reseptor H₄ manusia menunjukkan aktivitas konstitutif tinggi, agonis reseptor H₄ menurunkan akumulasi cAMP, sedangkan agonis inversi reseptor H₄ meningkatkan akumulasi cAMP (Lim *et al.*, 2005; Kottke *et al.*, 2011 dalam Panula *et al.*, 2015).

Ekspresi reseptor H₄ bersamaan dengan fungsi farmakologis telah ditampilkan pada sel mast; eosinofil; neutrofil; sel dendritik; sel Langerhans; sel natural killer (NK); monosit; sel T, termasuk sel γδT, sel T helper 1, 2, dan 17; keratinoцит; sel epidermis dendritik inflamasi; dan fibroblast (Panula *et al.*, 2015). Fungsi utama dari reseptor H₄ adalah menginduksi kemotaksis. Selain kemotaksis, reseptor H₄ juga terlibat pada pelepasan sitokin dari sejumlah jenis sel. Histamin dapat menginduksi produksi IL-16 dari sel-sel CD8+ T, menghambat pelepasan IL-12p70 dari sel dendritik manusia yang berasal dari monosit dan sel-sel epidermis dendritik peradangan, menginduksi produksi IL-31 di *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) atau sel T yang dipolarisasi Th₂ dan produksi ini meningkat secara signifikan di PBMC dari subyek dengan dermatitis atopik dibanding dengan kontrol yang sehat (Zampeli and Tiligada, 2009).

Produksi sitokin dan kemokin in vivo juga telah terbukti diatur oleh reseptor H₄ dalam beberapa model penyakit. Pengurangan sitokin Th₂ seperti tingkat IL-4, IL-5, dan IL-13 diamati setelah pengobatan dengan antagonis reseptor H₄ pada model tikus asma, rhinitis alergi, dan dermatitis kontak alergi. Tingkat mediator lipid juga dipengaruhi oleh reseptor H₄, dengan antagonis menunjukkan penurunan leukotrien B₄ dan prostaglandin D₂ masing-masing pada model pleuritis dan peritonitis. Penurunan kadar IL-17 melalui blokade reseptor H₄ telah dicatat pada model tikus asma, dermatitis, dan arthritis (Panula *et al.*, 2015).

Pada sel mast manusia dan murine, reseptor H₄ tidak hanya terlibat dalam

kemotaksis tetapi juga dalam fungsi lainnya. Stimulasi reseptor H₄ di sel mast murine yang berasal dari sumsum tulang menginduksi produksi IL-6 dan meningkatkan produksi IL-6 yang diinduksi oleh lipopolisakarida (LPS) melalui aktivasi *extracellular-regulated kinase* (ERK) dan *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K). Stimulasi sel mast murine yang berasal dari sumsum tulang dengan antagonis reseptor H₄ selama fase sensitisasi IgE menghambat degranulasi dan

IgE-induced upregulation reseptor IgE berafinitas tinggi Fc ϵ RI (Mirzahosseini *et al.*, 2013 dalam Panula *et al.*, 2015). Efek *in vitro* pada kemotaksis dan pelepasan mediator dari sel-sel imun menunjukkan bahwa reseptor H₄ terlibat dalam respon inflamasi. Antagonis reseptor H₄ terbukti sebagai anti-inflamasi. Inflamasi eosinofilik tampaknya juga dimediasi oleh reseptor H₄. Pada model tikus asma, antagonis reseptor H₄ mengurangi eosinofilia dan respon Th₂. Pada penggunaan kronis, antagonis reseptor H₄ bersifat antiinflamasi, sedangkan agonis reseptor H₄ bersifat proinflamasi. Hal ini mungkin merupakan akibat dari perubahan ke peradangan yang lebih eosinofilik dengan perawatan kronis (Zampeli and Tiligada, 2009).

Sejak ditemukan di awal milenium, utilitas terapi yang menarget reseptor H₄ telah menjadi subjek penelitian intensif. hasil khasiat klinis pertama di terbitkan tahun 2014. Efek ligan reseptor H₄ pada pruritus adalah satu di antara yang pertama dipelajari secara klinis. Histamin telah lama diketahui sebagai mediator yang menginduksi gatal di kulit manusia normal, dan respon gatal ini terbukti lebih meningkat pada pasien dengan dermatitis atopik. Respon pruritus yang diinduksi histamin di tikus *wild type* berkurang secara signifikan setelah perawatan oral dengan antagonis reseptor H₄ selektif JNJ-7777120. Penyakit saluran napas alergi, seperti asma dan rhinitis alergi, juga telah menjadi indikasi potensial ligan reseptor H₄. Histamin telah lama didokumentasikan dirilis pada paru-paru manusia selama respon asma. Namun, antagonis reseptor H₁ hanya berkhasiat lemah dalam mengobati penyakit inflamasi saluran napas ini, kurangnya kemanjuran antagonis reseptor H₁ dapat mengindikasikan keterlibatan reseptor histamin lain. Tentunya ekspresi reseptor H₄ pada tipe sel imun yang diketahui terlibat di asma (seperti eosinofil, sel mast, limfosit T, dan sel dendritik), ditambah dengan keterlibatannya dalam proses inflamasi termasuk kemotaksis dan produksi sitokin, mendukung konsep bahwa mentargetkan reseptor ini dapat memberi manfaat

terapeutik. Peredaman peradangan saluran napas ini juga telah diamati setelah pemberian antagonis reseptor H₄ pada sejumlah model hewan. Selain efek anti-inflamasi di paru-paru, JNJ-7777120 juga meningkatkan fungsi paru-paru pada model mencit ini (Panula *et al.*, 2015). Reseptor H₄ juga mungkin memainkan peran dalam memediasi peradangan saluran napas bagian atas. Pada pasien dengan rinosinusitis kronis, ada peningkatan yang signifikan dalam tingkat ekspresi reseptor H₄ dalam jaringan polip hidung bila dibandingkan dengan jaringan mukosa hidung normal. Pada model mencit rhinitis alergi, JNJ-7777120 efektif secara signifikan mengurangi berbagai gejala inflamasi saluran napas bagian atas, termasuk bersin dan hidung gatal, ketika senyawa diberikan baik secara oral atau intranasal. Studi klinis pada asma dan rhinitis alergi telah dilaporkan bagi antagonis reseptor H₄ JNJ-39758979, UR-63325, dan PF-03893787 (sekarang dikenal sebagai ZPL-3893787) (Thurmond, *et al.*, 2017).

Studi tambahan telah menunjukkan bahwa senyawa ini seampuh obat anti-inflamasi nonsteroid diklofenak pada model ini. Efek serupa juga telah ditunjukkan dengan antagonis reseptor H₄ lainnya pada model ini di mana efek maksimumnya sama dengan diklofenak (Altenbach *et al.*, 2008; Cowart *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008 dalam Panula *et al.*, 2015).

Oleh sebab itu reseptor H₄ bisa sebagai target obat yang baru dan menarik untuk berbagai indikasi penyakit, khususnya pada gangguan yang terkait dengan peradangan (Bhatt *et al.*, 2010).

Agonis Reseptor H₄

4-methylhistamine ($K_i = 50 \text{ nM}$) adalah agonis reseptor H₄ paling selektif yang telah dilaporkan sampai saat ini, dengan selektivitas lebih dari 100 kali lipat dari reseptor H₁, reseptor H₂ dan reseptor H₃. Obat antipsikotik clozapine memiliki

afinitas untuk sejumlah GPCR tetapi juga memiliki aktivitas agonis reseptor H₄, selektifitasnya lebih dari 300 kali lipat dari reseptor H₃. Ligan *aminopyrimidine ST-1006* dikarakterisasi sebagai agonis reseptor H₄ yang paling ampuh yang dilaporkan sampai saat ini dengan PEC₅₀ 8,95 (Lim *et al.*, 2005).

Antagonis Reseptor H₄

Senyawa *indole carboxamide* JNJ-7777120 (*1-[(5-chloro-1H-indol-2-yl)carbonyl]-4-methylpiperazine*; adalah antagonis H₄ nonimidazol selektif yang pertama diterbitkan. Ia dilaporkan berikatan ke reseptor H₄ manusia dengan afinitas tinggi (K_i = 4 nM) dan memiliki selektivitas yang sangat baik atas GPCRs, termasuk reseptor H₁, reseptor H₂ dan reseptor H₃. JNJ-7777120 juga memiliki afinitas tinggi untuk reseptor H₄ mencit dan tikus, dan ia telah digunakan dengan ekstensif sebagai senyawa acuan untuk menentukan peran antagonisme reseptor H₄ pada berbagai model penyakit hewan percobaan. Kebanyakan studi hewan dengan JNJ-7777120 kompatibel dengan gagasan bahwa reseptor H₄ memainkan peran proinflamasi pada asma bronkial, dermatitis atopik, dan pruritus dan bahwa antagonisme reseptor H₄ memblok efek-efek proinflamasi tersebut. Berdasarkan JNJ-7777120, beragam kelas senyawa yang berbeda-beda strukturalnya telah berkembang sebagai antagonis reseptor H₄ seperti : *benzimidazole* VUF-6002 atau JNJ-10191584, *thienopyrrole* analog, *aminopyrimidine* analog (Zhang *et al.*, 2007).

2.5.4 Reseptor Leukotrin

Leukotrien B₄ dan sulfidopeptide leukotrien C₄, D₄ dan E₄ (yang terdiri dari substansi anafilaksis bereaksi lambat) terlibat dalam bronkokonstriksi asma dengan mengaktifkan reseptor spesifik yang mungkin berbeda. LTB₄ memiliki aktivitas kemotaktik poten, terutama untuk neutrofil, dan menggunakan (3H) LTB₄

specific binding sites yang telah diidentifikasi pada neutrophils manusia. Studi fungsional dengan LTC₄ dan LTD₄ menunjukkan bahwa mungkin ada reseptor untuk setiap leukotrien dan leukotrien antagonis FPL 55712 tampaknya selektif menghambat reseptor LTD₄. Leukotriens sulfidopeptide merupakan stimulan kuat untuk sekresi lendir pada saluran napas manusia secara in vivo dan in vitro dan pada marmut mereka menghasilkan mikrovaskuler Leakiness dan edema bronkial (Bankova, et al, 2016)

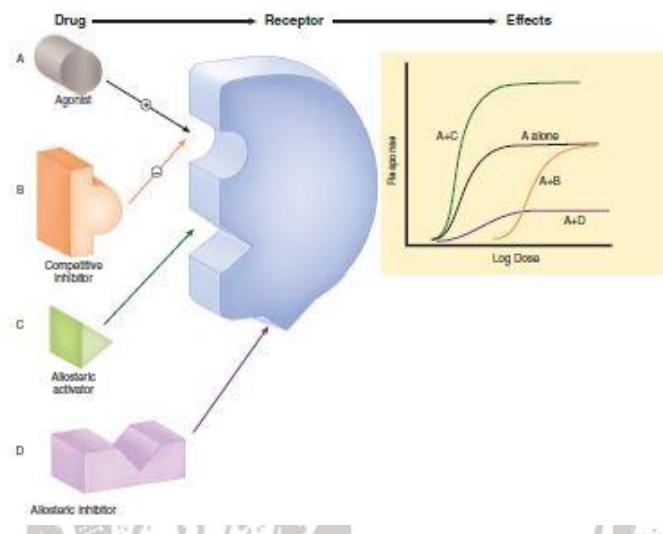
2.5.5 Reseptor Prostaglandin

Beberapa prostaglandin memiliki efek pada saluran napas, meskipun peran mereka dalam asma tidak pasti karena penghambatan siklooksigenase (oleh obat-obatan seperti aspirin dan indometasin), yang menghambat sintesis mereka, biasanya tidak memiliki efek menguntungkan dan ada beberapa individu (sekitar 4% dari penderita asma) yang menunjukkan bronkonstriksi. Reseptor prostaglandin belum ditandai karena tidak ada bloker tertentu yang tersedia. Reseptor prostasiklin spesifik telah diidentifikasi pada paru *guinea pig* dengan *radioligand binding*, meskipun mereka mungkin dilokalisasi ke pembuluh darah daripada saluran napas. PGD₂ (yang merupakan prostaglandin utama yang dihasilkan oleh sel mast paru-paru manusia) dan PGF2a keduanya merupakan bronkonstriktor ampuh dari saluran napas manusia, sedangkan PGE₂ mungkin bronkodilator. Prostaglandin ini berefek dengan mengaktifkan reseptor spesifik pada otot polos saluran napas. Tromboksan A₂, yang juga merupakan produk siklooksigenase, juga merupakan bronkonstriktor poten yang mengaktifkan reseptor tertentu, yang antagonis selektifnya baru-baru ini telah dikembangkan. Prostaglandin memiliki berbagai aktivitas lainnya pada saluran pernafasan

termasuk sekresi lendir, produksi edema bronkial (dengan meningkatkan aliran darah bronkial) dan kemotaksis (Wojno, et al, 2015).

2.6.2 Kurva Dosis Respon

2.6.1 Interaksi Obat-Reseptor Obat



Gambar 2.8 Mekanisme interaksi obat dengan reseptor.

Keterangan: Efek yang mungkin timbul dari interaksi ini digambarkan dalam kurva dosis-respons di sebelah kanan. Proses pengikatan reseptor agonis (obat A) menghasilkan kurva dosis-respon yang dinamai "A alone". B adalah obat antagonis yang kompetitif dengan agonis untuk mengikat sisi reseptor yang sama. Kurva dosis-respon dihasilkan dengan meningkatkan dosis A dengan B pada konsentrasi tetap ditunjukkan oleh kurva "A+B." Obat C dan D bertindak pada sisi berbeda di molekul reseptor; Mereka adalah aktivator alosterik atau inhibitor. Perhatikan inhibitor alosterik tidak bersaing dengan obat agonis untuk mengikat reseptor, dan mereka mungkin mengikat secara reversibel atau ireversibel. (Katzung, et al, 2012)

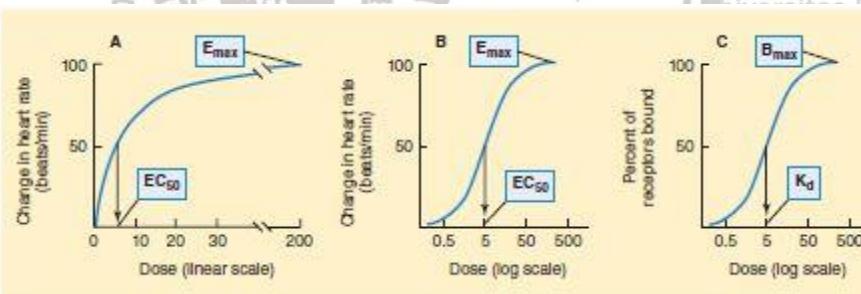
Langley (1878) mengemukakan aksi dan efek obat mungkin ditentukan oleh Hukum Aksi Masa. A.J. Clark yang pertama menerapkan kecocokan matematis dengan konsep tentang aksi obat, dimana aksi obat sebanding dengan jumlah reseptor yang diduduki obat tersebut dan efek maksimal akan dihasilkan apabila semua reseptor telah diduduki. Ariëns (1954) memodifikasi model ini untuk

menggambarkan berbagai efek obat antara agonis penuh dan antagonis sebagai faktor proporsionalitas yang disebut aktivitas intrinsik. Stephenson (1956) menambahkan gagasan tentang stimulus-respons untuk memahami efikasi obat, dan Furchtgott (1966) memberi kontribusi sebuah metode untuk mengukur afinitas agonis dengan membandingkan kurva respons konsentrasi sebelum dan sesudah melumpuhkan sebagian reseptor dengan antagonis ireversibel. Antagonisme dimodelkan oleh Gaddum (1937, 1957) dan Schild (1957) menentukan afinitas antagonis (Trevor *et al.*, 2013).

Interaksi obat dengan reseptor dapat digambarkan secara sederhana seperti hubungan kunci dan lubang kunci (*"lock and key"*). Afinitas (letak kunci yang harus tepat) menggambarkan derajat tertentu yang memungkinkan untuk pembentukan kompleks obat reseptor, sementara aktivitas intrinsik (terbukanya lubang kunci setelah kunci diatur sedemikian rupa) menggambarkan kemampuan obat untuk menghasilkan perubahan makromolekul reseptor seperti perpindahan radikal atau perubahan konfigurasi. Okupasi reseptor oleh molekul obat bisa atau tidak bisa menghasilkan aktivasi. Aktivasi diartikan bahwa reseptor dipengaruhi oleh molekul yang terikat sehingga merubah sifat reseptor terhadap sel dan menghasilkan respon jaringan. Ikatan dan aktivasi merepresentasikan 2 tahap yang berbeda dalam menghasilkan respon pada reseptor. Jika suatu obat, terikat pada reseptor tanpa menyebabkan aktivasi, sehingga mencegah agonis terikat, bahan ini dinamakan antagonist reseptor. Tendensi suatu obat terikat pada reseptor diatur oleh afinitasnya, sementara sekali terikat, untuk mengaktifasi reseptor dipengaruhi oleh efikasinya. Obat dengan potensi tinggi pada umumnya mempunyai afinitas tinggi terhadap reseptor dan oleh sebab itu menempati proporsi reseptor yang significant walaupun pada konsentrasi rendah. Agonis memiliki efikasi yang significant, sedangkan antagonis mempunyai efikasi nol (Rang, *et al.*, 2016).

Dasar farmakologi reseptor adalah kurva dosis-respons, penggambaran efek obat yang diamati sebagai fungsi konsentrasi obat pada reseptor kompartemen. Gambar 2.8 menunjukkan mekanisme interaksi obat dengan reseptor dan menghasilkan efek yang tergambar pada kurva dosis-respon. (Trevor et al., 2013). Kurva ini dapat mengestimasi respon maksimal (E_{maks}) yang dihasilkan obat dan konsentrasi atau dosis yang diperlukan untuk menghasilkan 50% respon maksimal (EC_{50} atau ED_{50}). Pada umumnya digunakan skala logaritma konsentrasi, dimana transformasi kurva dari hiperbolik ke sigmoid menghasilkan porsi tengah adalah linear. Parameter E_{maks} , EC_{50} dan slope biasanya digunakan untuk membandingkan obat-obat yang berbeda yang secara kualitatif menghasilkan efek yang sama (Rang, et al, 2016).

2.6.2 Efikasi (E_{maks})



Gambar 2.9 Kurva dosis-respon dan kurva pengikat dosis. (Dalam jaringan terisolasi, konsentrasi biasanya digunakan sebagai ukuran dosis.) A. Hubungan antara dosis obat atau konsentrasi (absis) dan efek obat (ordinat). Bila sumbu dosis linear, diperoleh kurva hiperbolik. B. Data yang sama, sumbu dosis logaritmik. Dosis atau konsentrasi yang efeknya setengah maksimal adalah EC_{50} , sedangkan efek maksimalnya adalah E_{maks} . C. Jika persentase reseptor yang mengikat obat diplot terhadap konsentrasi obat, didapatkan kurva yang sama, dan konsentrasi di mana 50% reseptor terikat dilambangkan dengan K_d , dan jumlah maksimal reseptor yang terikat disebut B_{maks} . (Katzung, et al, 2012)

Efikasi menggambarkan "kekuatan" agonist-reseptor kompleks dalam meningkatkan respons jaringan. Suatu obat dengan efikasi 0 tidak punya tendensi untuk menyebabkan aktivasi reseptor, dan tidak menyebabkan respon jaringan. Bilas respon dari sistem reseptor-efektor tertentu diukur terhadap peningkatan konsentrasi obat, grafik respon terhadap konsentrasi obat atau dosis disebut kurva respons dosis gradasi (Gambar 2.9). Memplot data yang sama pada sumbu konsentrasi semilogaritmik biasanya menghasilkan kurva sigmoid, yang menyederhanakan manipulasi matematis dari data dosis-respon (Gambar 2.9-B).

Parameter efikasi (E_{maks}) dan potensi (EC_{50} atau ED_{50}) diperoleh dari data ini.

Efikasi atau sering disebut efikasi maksimal, adalah efek terbesar (E_{maks}) agonis yang bisa dihasilkan jika dosisnya mencapai tingkat toleransi tertinggi. Efikasi ditentukan terutama oleh sifat obat dan reseptor dan sistem efektor yang terkait.

Bisa diukur dengan kurva dosis-respon gradasi (Gambar 2.9). Menurut definisi, agonis parsial memiliki efikasi maksimal lebih rendah daripada agonis penuh (Rang, et al, 2016).

2.6.3 Potensi

Potensi dikendalikan oleh empat faktor: Dua berhubungan dengan sistem biologis yang meliputi reseptor (densitas dan efisiensi reseptor dari mekanisme stimulus-respons jaringan), dan dua berhubungan dengan interaksi obat dengan reseptornya (afinitas dan efikasi). Potensi menunjukkan jumlah obat yang dibutuhkan untuk menghasilkan efek yang diberikan. Dalam pengukuran dosis-respons bergradasi, biasanya efek yang dipilih adalah 50% dari efek maksimal dan konsentrasi atau dosis yang menyebabkan efek ini disebut EC_{50} atau ED_{50} (Gambar 2.9-A dan B). Potensi ditentukan terutama oleh afinitas reseptor untuk obat dan jumlah reseptor yang tersedia (Trevor et al., 2013).

Aktivitas intrinsik (α) = standar relatif dari efek maksimal obat, yang dinyatakan paling tinggi = 1. Jika 0,5 maka obat hanya mencapai 50% dari efek maksimal. Makin tinggi afinitas obat menduduki reseptor, maka makin rendah konsentrasi obat yang diperlukan untuk efek 50% dari maksimal. Efek 50% diumpamakan sebagai persamaan : $(A_{50}) = KA$ dimana KA adalah konstanta keseimbangan. Jadi konsentrasi obat yang menimbulkan 50% dari efek maksimal obat adalah sama atau sebanding dengan konstanta disosiasi KA. Makin tinggi (A_{50}) dan KA, maka makin rendah afinitasnya. Kebalikan dari KA yaitu $1/KA$ merupakan gambaran dari afinitas, dan biasanya dinyatakan sebagai :

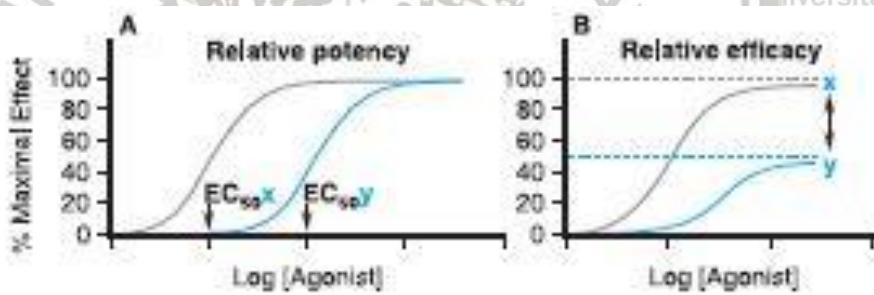
$$\text{Log } 1/KA = - \log KA = - \log (A_{50}) = PD_2$$

Istilah yang digunakan untuk afinitas dikenal sebagai PD_2 . (EC_{50} pada minus logaritma konsentrasi Agonis). Makin tinggi nilai PD_2 maka makin tinggi afinitasnya (Trevor et al., 2013).

2.6.4 Agonis

Suatu obat disebut agonis apabila dapat mengaktifasi reseptor ketika mereka menempatinya, atau disebut antagonis jika tidak menyebabkan aktivasi. Beberapa senyawa yang dikenal sebagai agonis penuh dapat menghasilkan respon maksimal (respon paling besar yang dapat diberikan jaringan), sementara agonis parsial hanya dapat menghasilkan respons submaksimal. Perbedaan antara agonis penuh dan parsial terletak pada hubungan antara okupasi reseptor dan respons. Agonis penuh merupakan obat yang mempunyai efikasi cukup untuk menghasilkan respon maksimal ketika kurang dari 100% reseptor terokupasi. Agonis parsial mempunyai efikasi lebih rendah, sedemikian dimana 100% okupasi hanya menghasilkan respon submaksimal (Rang, et al, 2016).

Bila potensi relatif dua agonis dengan efikasi yang sama diukur dalam sistem biologis yang sama, peristiwa sinyal hilir sama untuk kedua obat-obatan, dan perbandingan menghasilkan ukuran relatif dari afinitas dan efikasi dua agonis (Gambar 2.10). Mengukur potensi agonis dengan perbandingan nilai EC_{50} adalah salah satu metode pengukuran kemampuan agonis yang berbeda untuk menginduksi respon dalam sebuah tes sistem dan untuk memprediksi aktivitas yang sebanding di tempat lain. Metode lain untuk memperkirakan aktivitas agonis adalah membandingkan asimtot maksimal dalam sistem dimana agonis tidak menghasilkan respon maksimal (Gambar 2.10B). Keuntungan menggunakan respon maksimal adalah pengukuran ini semata-mata tergantung pada efikasi, sedangkan potensinya merupakan fungsi campuran afinitas dan efikasi (Brunton et al., 2006).



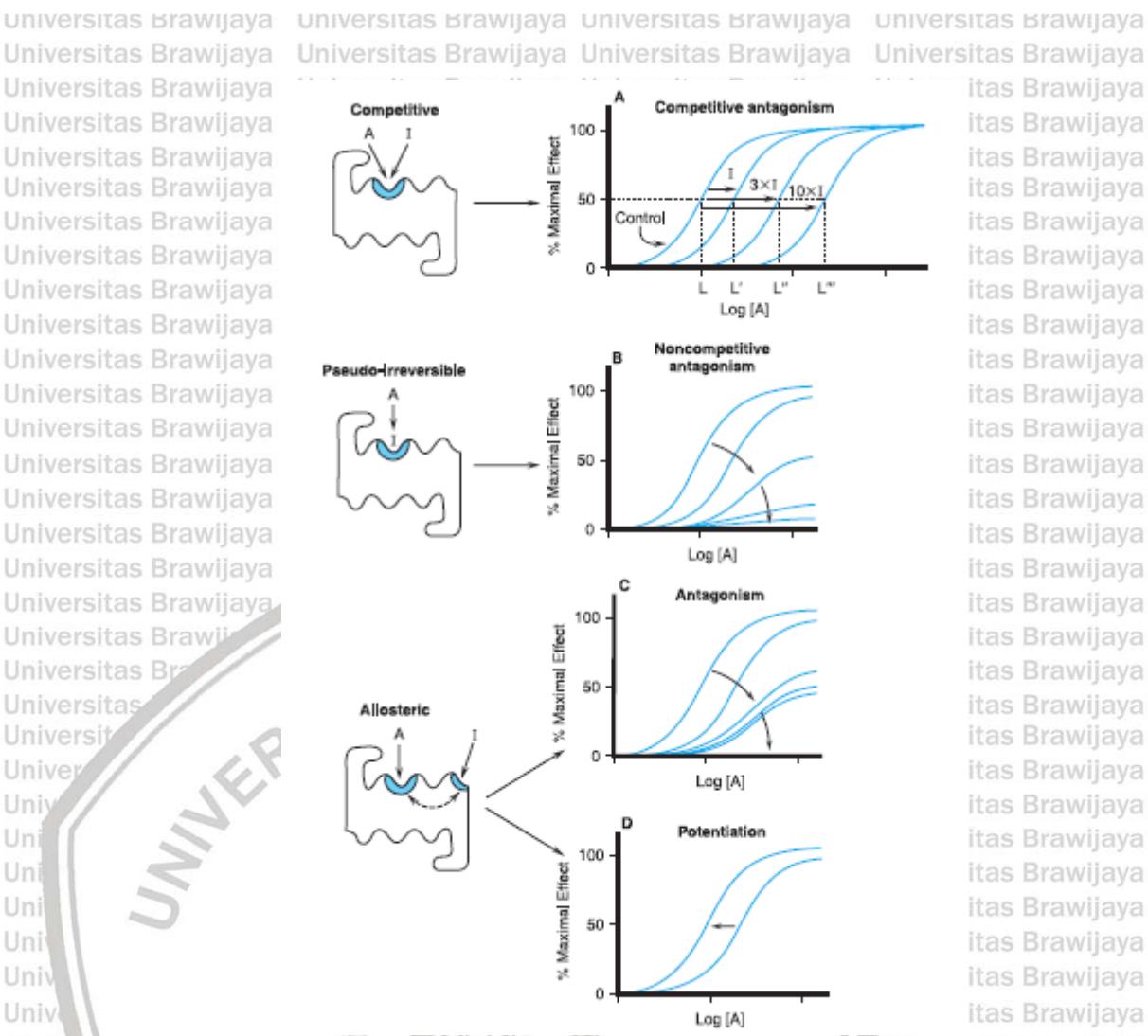
Gambar 2.10 Cara mengukur agonisme. A. Potensi relatif dua agonis (obat x, garis abu-abu; obat y, biru) yang diperoleh di jaringan yang sama merupakan fungsi dari afinitas relatif dan efikasi intrinsik. Efek setengah maksimal dari Obat x terjadi pada konsentrasi sepersepuluhnya setengah maksimal dari konsentrasi efektif obat y. Dengan demikian, obat x lebih ampuh dari obat y. B. Dalam sistem dimana kedua obat tidak menghasilkan karakteristik respon maksimal dari jaringan, respon maksimal yang diamati adalah fungsi nonlinear efikasi intrinsik relatif. Obat x lebih manjur dibanding obat y; Respon asimtotiknya adalah 100% (obat x) dan 50% (obat y) (Brunton et al., 2006).

2.6.5 Antagonis

Suatu obat disebut antagonis jika tidak menyebabkan aktivasi saat menempati reseptor. Antagonis dikelompokkan antagonis kompetitif dan nonkompetitif. Dengan adanya antagonis kompetitif, okupasi agonis (proporsi

reseptor dimana agonis terikat) pada konsentrasi agonis yang diberikan berkurang, karena reseptor hanya dapat mengakomodasi satu molekul pada satu waktu. Tetapi, karena dua molekul berkompetisi, dengan meningkatkan konsentrasi agonis dapat meningkatkan okupasi agonis (dan meningkatkan respon jaringan). Sehingga antagonis dikatakan *surmountable*, sebaliknya pada jenis antagonis lain, peningkatan konsentrasi agonis gagal melakukan efek bloking. Teori analisa sederhana memprediksi bahwa adanya konsentrasi tetap dari antagonis, kurva log konsentrasi-efek untuk agonis akan bergeser ke kanan, tanpa perubahan pada slope maksimum, ini menandakan antagonis kompetitif. Pergeseran diekspresikan sebagai dose-rasio (ratio dimana konsentrasi agonis harus ditingkatkan dengan adanya antagonis untuk mempertahankan tingkat respon yang diberikan). Dengan kata lain, antagonis kompetitif, adalah obat yang tidak memiliki khasiat intrinsik namun mempunyai afinitas bersaing dengan agonis untuk mengikat sisi reseptor, sehingga menghasilkan kurva parallel, yang bergantung pada konsentrasi, yang bergeser ke kanan kurva dosis-respon agonis tanpa merubah respon asimtotik maksimal. Antagonis kompetitif bisa diatasi dengan konsentrasi agonis cukup tinggi (Rang, et al, 2016).

Besarnya pergeseran kekanan kurva tergantung pada konsentrasi antagonis dan afinitasnya terhadap reseptor. Oleh karena itu afinitas antagonis kompetitif untuk reseptornya dapat ditentukan sesuai dengan kapasitas ketergantungan konsentrasiannya untuk menggeser kurva dosis-respon agonis ke kanan, seperti yang dianalisis oleh Schild (1957). *Surmountability* dari pemblokiran antagonist kompetitif penting dalam praktik, karena ia mengijinkan efek agonist terjadi dengan peningkatan konsentrasi, hal ini merupakan karakteristik antagonist kompetitif reversibel yang menggambarkan kenyataan bahwa molekul agonis dan antagonis kompetitif tidak diam terikat pada reseptor tetapi terdisosiasi dan terikat kembali secara terus menerus. Kecepatan disosiasi molekul antagonis cukup



Gambar 2.11 Mekanisme antagonisme reseptor. A. Antagonisme kompetitif terjadi saat agonis A dan antagonis I berkompetisi untuk mengikat tempat yang sama pada reseptor. Kurva respon untuk agonis bergeser ke kanan dengan cara yang berhubungan dengan konsentrasi oleh antagonis sedemikian rupa sehingga EC₅₀ agonis meningkat (misalnya, L versus L', L'', dan L''') dengan perubahan konsentrasi antagonis.

B. Jika antagonis mengikat di tempat yang sama dengan agonis tetapi secara ireversibel atau pseudo-ireversibel (disosiasi lambat tapi tidak ada ikatan kovalen), hal itu menyebabkan pergeseran kurva respons dosis ke kanan, dengan depresi lebih lanjut dari respons maksimal.

C. Efek alosterik terjadi ketika ligan I mengikat ke tempat yang berbeda pada reseptor untuk menghambat respon (lihat panel C) atau mempotensiasi respon (lihat panel D). Efek ini jenuh; Penghambatan mencapai nilai batas saat sisi alosterik terisi penuh (Brunton et al., 2006).

tinggi dimana keseimbangan baru secara cepat tercapai pada penambahan agonis. Dalam efek, molekul agonis dapat memindahkan molekul antagonis pada reseptor ketika antagonis tidak terikat, walaupun mereka tidak dapat mengusir.

molekul antagonis yang terikat. Perpindahan terjadi karena, dengan menempati bagian reseptor yang kosong, agonis secara efektif mengurangi kecepatan asosiasi molekul antagonis, akibatnya kecepatan disosiasi secara temporer melebihi asosiasi, dan secara overall penempatan antagonis gagal (Rang, et al., 2016).

Dengan tipe antagonis kompetitif irreversibel, pemblokiran biasanya *insurmountable*. Antagonis berikanan pada tempat yang sama dengan agonis tetapi disosiasi sangat lambat atau tidak sama sekali dari reseptor, dengan akibat tidak ada perubahan pada okupasi antagonis ketika agonis ditambahkan. Dalam keadaan seperti ini, respon maksimal terhadap agonis akan mengalami depresi pada beberapa konsentrasi antagonis (Gambar 2.11B). Antagonisme yang tidak kompetitif bisa dihasilkan oleh jenis obat lain, disebut sebagai antagonis alosterik. Jenis obat ini menghasilkan pengaruhnya dengan mengikat sisi lain reseptor dari agonis primer dan dengan demikian mengubah afinitas reseptor untuk agonis.

Dalam kasus antagonis alosterik, afinitas reseptor untuk agonis diturunkan oleh antagonis (Gambar 2-11C). Sebaliknya, beberapa efek alosterik bisa mempotensiasi efek agonis (Gambar 2-11D). Interaksi dari benzodiazepin (*anxiolytics*) dengan reseptor *gamma-aminobutyric acid A* (GABA_A) meningkatkan afinitas reseptor GABA adalah contoh potensiasi alosterik (Brunton et al., 2006).

2.7 Pengukuran Respon Kontraksi Relaksasi Otot Polos Saluran Napas

Pengukuran respon suatu obat atau bahan alam yang beraktivitas bronkodilator dapat dilakukan secara *in vitro* pada trachea atau bronkus terpisah *guinea pig* sesuai dengan protokol dari Albuquerque (2016) dimana cincin trachea/bronkus diuji dalam organ bath yang mengandung larutan garam fisiologis yang dialiri gas, pada suhu 37° C. Agen atau prosedur yang menyebabkan kontraksi (ACh atau metakolin) otot polos dibutuhkan sebelum menguji obat

relaksasi saluran nafas. Larutan yang banyak digunakan adalah larutan Krebs-Henseleit yang dimodifikasi, yang terdiri dari (mM): NaCl (113,0), KCl (4,8), CaCl₂ (2,5), KH₂PO₄ (1,2), MgSO₄ (1,2), NaHCO₃ (25,0), dan Glukosa (5,7), pH 7,4 (37°C); dialiri gas 95% O₂ + 5% CO₂. Suhu biasanya dijaga pada 37° C, namun hal ini dapat bervariasi, tergantung pada suhu tubuh hewan dari mana jaringan itu berasal, atau kebutuhan eksperimental lainnya. Membiarkan periode ekuilibrasi yang cukup pada suhu 37° C memungkinkan otot menghasilkan ATP (Albuquerque, et al., 2016).

2.8 Inflamasi

Inflamasi merupakan respon lokal dari jaringan hidup yang ditimbulkan oleh cedera atau kerusakan jaringan. Tujuan respon ini untuk menetralisir dan menghilangkan penyebab agen dan membatasi cedera jaringan, sehingga inflamasi merupakan respon protektif (pelindung) fisiologis terhadap cedera. Inflamasi (peradangan) merupakan reaksi kompleks pada jaringan yang bervaskularisasi akibat stimulus eksogen maupun endogen. Dengan kata lain, inflamasi adalah suatu respon protektif yang ditujukan untuk menghilangkan penyebab awal jejas sel serta membuang sel dan jaringan nekrotik yang diakibatkan oleh kerusakan sel (Agustina et al., 2015).

Inflamasi akut merupakan inflamasi yang *onset* nya cepat dalam hitungan detik hingga menit, proses berlangsung singkat, beberapa menit hingga beberapa hari, dengan gambaran utama adalah eksudasi cairan dan protein plasma. Sel lekosit yang beremigrasi terutama neutrofil. Agen yang dapat menyebabkan cedera pada jaringan, yang diikuti oleh inflamasi adalah kuman (mikroorganisme), benda (pisau, peluru, dsb.), suhu (panas atau dingin), berbagai jenis sinar (sinar X atau sinar ultraviolet), listrik, zat-zat kimia, dan lain-lain (Paramita et al., 2016).

Secara klinis inflamasi akut ditandai 5 tanda *cardinal* : **Rubor** (Redness) adalah

kemerahan yang terjadi karena pelebaran pembuluh darah pada jaringan yang mengalami cedera. sehingga terjadi peningkatan aliran darah ke tempat cedera. **Kalor (Heat)** adalah panas akibat bertambahnya pembuluh darah, sehingga aliran darah lebih banyak daripada di daerah lain di sekitar radang. Rasa panas dan warna kemerahan terjadi secara bersamaan. **Tumor (Swelling)** adalah bengkak, yang disebabkan oleh terjadinya peningkatan permeabilitas kapiler, adanya peningkatan aliran darah dan cairan ke jaringan yang mengalami cedera sehingga protein plasma keluar dari pembuluh darah ke ruang interstitial atau rongga tubuh; dapat berupa eksudat atau transudat. **Dolor (Pain)** adalah rasa sakit, yang dapat disebabkan beberapa hal: (1) adanya peregangan jaringan akibat edema sehingga terjadi peningkatan tekanan lokal yang dapat menimbulkan rasa nyeri, (2) adanya pengeluaran mediator kimia pada radang akut seperti bradikinin. **Fungsio Iaesa (Loss Of Function)** adalah Fungsi jaringan / organ yang terkena inflamasi dan sekitarnya terganggu akibat proses inflamasi (Medzhitov, 2010).

Patogenesis inflamasi terjadi secara progresif melalui beberapa tahap perubahan seluler yang menonjol. Awalnya, pembuluh darah di dalam dan di sekitar tempat cedera merespon dengan meningkatkan aliran darah dan meningkatkan permeabilitas pembuluh darah. Selanjutnya, sel-sel imun tubuh direkrut dari pembuluh darah ekstravasasi ke parenkim yang terluka. Sel imun yang mengalami ekstravasasi kemudian bermigrasi ke sel jaringan yang terluka dipandu oleh molekul inflamasi, yang disebut chemotaxis. Sel-sel imun yang mencapai tempat cedera melanjutkan proses fagositosis dan men degradasi sisa-sisa sel dan setiap mikroba yang mungkin ada (Medzhitov, 2010).

Sel imun yang beredar termasuk granulosit (leukosit polimorfonuklear, PMN), terdiri dari neutofil, eosinofil, dan basofil; limfosit; dan monosit. Respon imun di jaringan lebih jauh diperkuat oleh sel-sel ini setelah migrasi ekstravaskuler,

bersama makrofag jaringan dan sel mast. Bertindak secara bersama-sama, sel sel ini menyiapkan tubuh dalam pertahanan yang kuat melawan tumor dan infeksi virus, bakteri, dan parasit (Barrett *et al.*, 2012). Sehingga inflamasi dapat disebut juga sebagai proses rekrutmen leukosit dan protein plasma dari darah, akumulasi dalam jaringan, dan aktivasi untuk menghancurkan mikroba. Reaksi-reaksi ini melibatkan sitokin, yang diproduksi oleh sel dendritik, makrofag, dan jenis sel lain selama reaksi imun bawaan. Leukosit utama yang direkrut dalam inflamasi adalah fagosit, neutrofil (yang memiliki masa hidup yang pendek dalam jaringan), dan monosit (Abbas *et al.*, 2012). Fagosit ini mengekspresikan reseptor permukaannya yang mengikat dan menelan mikroba dan reseptor lain yang mengenali molekul mikroba yang berbeda dan mengaktifkan sel. Pada keterlibatan reseptor-reseptor ini, fagosit menghasilkan reaktif oksigen dan nitrogen spesies dan enzim lisosomal, yang menghancurkan mikroba yang telah dicerna (Barrett *et al.*, 2012).

2.8.1 Respon Inflamasi

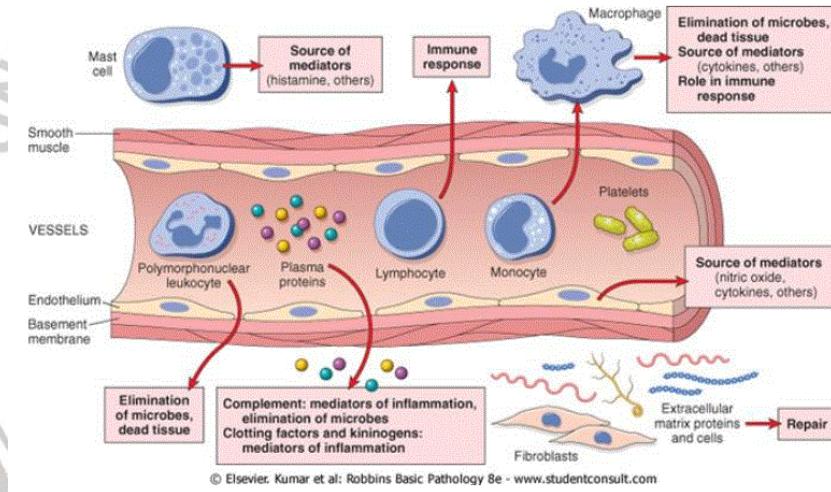
Cara utama yang digunakan oleh sistem imun bawaan terhadap infeksi dan cedera jaringan adalah menstimulasi inflamasi akut, yang merupakan akumulasi leukosit, protein plasma, dan cairan yang berasal dari darah pada tempat jaringan terinfeksi atau cedera di ekstravaskular (Medzhitov, 2010). Ada 2 komponen respons/reaksi inflamasi akut yaitu : 1). Perubahan/reaksi vaskuler, dan 2). Perubahan/Reaksi seluler (lihat gambar 2.12).

2.8.1.1 Perubahan/Reaksi Vaskuler

Pada awal inflamasi akut akan terjadi vasokonstriksi arteriole penyempitan pembuluh darah kecil yang berlangsung hanya beberapa detik sampai beberapa menit tergantung pada kerasnya jejas. Kemudian akan terjadi

vasodilatasi dimana aliran darah akan bertambah, pembuluh darah dipenuhi darah dan tekanan hidrostatiknya meningkat, yang selanjutnya dapat menyebabkan keluarnya cairan plasma berkadar protein tinggi keluar endotel yang hipermeabel menghasilkan pengeluaran cairan dalam jumlah banyak dan edema. Perlambatan sirkulasi/stasis terjadi karena permeabilitas juga bertambah, maka cairan darah dan protein akan keluar dari pembuluh darah dan mengakibatkan pengentalan darah. Pembuluh darah yang melebar itu tampak penuh dengan sel darah (hyperemia) (Doan *et al.*, 2008).

Inflammation & Repair



Gambar 2.12 Respon inflamasi dan sel imun yang terlibat
(Doan, et al., 2008)

2.8.1.2 Perubahan/Reaksi Seluler

Salah satu tanda terpenting inflamasi akut adalah terjadinya emigrasi sel inflamasi yang berasal dari darah. Leukosit dan protein plasma yang biasanya beredar di darah, direkrut ke tempat infeksi dan cedera, di mana mereka melakukan berbagai fungsi efektor yang melayani pembunuhan mikroba dan mulai

memperbaiki kerusakan jaringan. Di antara protein plasma penting yang masuk tempat inflamasi adalah protein *complement*, antibodi, dan reaktan fase akut. Pengiriman komponen yang berasal dari darah ini ke tempat inflamasi tergantung pada perubahan reversibel dalam pembuluh darah pada jaringan yang terinfeksi atau rusak, yang diinduksi oleh sitokin dan mediator molekul kecil yang awalnya berasal dari sel-sel yang diam dalam jaringan, seperti sel mast, makrofag, dan sel endotel. Proses dimulai dari marginasi lekosit, dimana lekosit bergerak mendekati dinding pembuluh darah dan melekat pada sel endotel, kemudian akan terjadi emigrasi yaitu leukosit keluar dari pembuluh darah (Murphy, 2012).

Pada fase awal yaitu dalam 24 jam pertama, sel yang paling banyak bereaksi ialah **neutrofil** atau lekosit polimorfonukleus (PMN). Sesudah fase awal yang bisa berlangsung sampai 48 jam, mulailah sel makrofag, sel limfosit dan sel plasma bereaksi. Lekosit PMN berfungsi menelan dan merusak bakteri, kompleks imun dan debris yang berasal dari jaringan yang nekrotik. Disamping itu lekosit juga dapat mengeluarkan enzim dan radikal beracun yang dapat menyebabkan makin meluasnya reaksi inflamasi atau makin banyaknya kerusakan jaringan.

Urutan kejadian yang dialami oleh lekosit ialah sebagai berikut: 1). *Margination / Penepian*, lekosit bergerak ke tepi pembuluh darah. 2). *Rolling / Bergulir*, leukosit berinteraksi dengan sel endotel dan bergulir disepanjang dinding pembuluh darah, dimediasi oleh selectin. 3). *Sticking / Perlekatan*, lekosit berinteraksi dengan Integrin dan *Intracellular Adhesion Molecule* (ICAM) endotelial. Interaksi ini sangat melekatkan sel-sel ke dinding pembuluh darah, menghentikan perjalanan mereka lebih jauh melalui aliran darah. 4). *Ekstravasasi*, leukosit yang terikat didinding pembuluh darah ekstravasi ke parenkim dengan menyusup antara sel-sel endotel. Leukosit yang bermigrasi harus melarutkan membran dasar dengan menggunakan berbagai protease (Murphy, 2012).

Peristiwa seluler selanjutnya adalah :

Chemotaxis, Leukosit yang baru ekstravasasi bermigrasi ke lokasi cedera dipengaruhi mediator kimia terlarut (faktor kemotaktik). Beberapa faktor kemotaktik ini disekresi oleh sel inang di atau dekat lokasi cedera sementara yang lain merupakan komponen mikroba (Barrett *et al.*, 2012).

Fagositosis, Setelah tiba di tempat cedera, sel-sel imun tubuh mulai memfagositosis dan mendegradasi sisa-sisa sel bersama dengan mikroba yang ada.

Pada akhirnya, pembersihan sel inang yang terluka dan penghapusan mikroba adalah tujuan utama dari seluruh proses inflamasi. Namun, beberapa sel imun yang direkrut seperti Makrofag dan Sel Dendritik juga melakukan perjalanan ke kelenjar getah bening lokal dengan sisa fagositosis terdegradasi dan bertindak sebagai Sel Presenting Antigen, sehingga memulai respon imun adaptif potensial terhadap mikroba. Pada reaksi seluler ini, jenis sel yang terlibat dalam inflamasi adalah : Netrofil, Basofil, Eosinofil, Sel Mast. Monosit / makrofag (Murphy, 2012)

2.8.2 Granulosit (leukosit polimorfonuklear, PMN)

Semua granulosit memiliki granul sitoplasma yang mengandung zat aktif yang secara biologis terlibat dalam reaksi inflamasi dan alergi.

2.8.2.1 Neutrofil

Neutrofil, juga disebut leukosit polimorfonuklear (PMN), merupakan populasi yang paling banyak dari sel darah putih yang beredar dan memediasi fase awal reaksi inflamasi (Abbas *et al.*, 2012). Waktu paruh rata-rata neutrofil dalam sirkulasi adalah 6 jam. Untuk mempertahankan tingkat sirkulasi darah normal, diperlukan lebih dari 100 miliar neutrofil per hari. Produksi neutrofil dirangsang oleh *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF). Banyak neutrofil memasuki jaringan, terutama jika dipicu oleh infeksi atau oleh sitokin inflamasi. Neutrofil tertarik

ke permukaan endotel oleh molekul adhesi sel yang dikenal sebagai selectin, kemudian mengikat integrin. Selanjutnya mereka menyusupkan diri melalui dinding-dinding kapiler antara sel-sel endotel dengan proses yang disebut diapedesis (Barrett *et al.*, 2012). Invasi tubuh oleh bakteri memicu respon inflamasi. Sumsum tulang dirangsang untuk menghasilkan dan melepaskan banyak neutrofil. Dengan eksositis, pelepasan isi granul neutrofil ke vakuola fagositik yang mengandung bakteri dan juga masuk ke ruang interstisial (degranulasi). Granul neutrofil dibedakan dua tipe : 1) Azurofil, granul besar dan padat, yang pertama kali muncul dalam pengembangan sel, merupakan lisosom yang mengandung enzim dan zat mikrobisida lainnya, termasuk defensins dan cathelicidin, *lysosomal hydrolase* (misalnya asam fosfatase), protein kationik, peroxidase (myeloperoxidase). 2) Spesifik, granul lebih kecil dan kurang padat, yang muncul kemudian dalam pengembangan sel, mengandung enzim seperti lisozim, kolagenase, dan elastase, tidak mengandung *lysosomal hydrolase* dan peroxidase (Murphy, 2012).

Enzim myeloperoxidase mengkatalisis konversi Cl⁻, Br⁻, I⁻, dan SCN⁻ ke asam yang sesuai (HOCl, HOBr, dll). Asam-asam ini merupakan oksidan kuat; Neutrofil juga mengeluarkan elastase, metalloproteinase yang menyerang kolagen, dan berbagai protease lain yang membantu menghancurkan invasi organisme. Pada penyakit tertentu (misalnya, rheumatoid arthritis) neutrofil juga dapat menyebabkan kerusakan lokal jaringan inang (Barrett *et al.*, 2012).

Defensin, peptida antimikroba endogen yang disimpan dalam granul neutrofil manusia, tikus, kelinci, telah dilaporkan semuanya memiliki aktivitas pelepasan histamin, mendegranulasi sel mast peritoneum tikus. Persen maksimum pelepasan histamin dicapai dalam waktu kurang dari 10 detik. Defensin neutrofil adalah *secretagogue* sel mast yang poten yang bertindak dengan cara yang mirip dengan substansi P dan 48/80, melalui respon cepat tergantung

protein G yang secara mekanis berbeda dari aktivasi sel mast yang bergantung pada antigen / IgE. Defensin dapat memberikan jalur penting untuk komunikasi antara neutrofil dan sel mast dalam pertahanan melawan agen mikroba dan respon inflamasi akut (Murphy, 2012).

2.8.2.2 Eosinofil

Eosinofil memiliki waktu paruh yang pendek dalam sirkulasi, tertarik ke permukaan sel-sel endotel oleh selectin, mengikat integrin yang menempelkannya ke dinding pembuluh darah, dan masuk ke jaringan dengan diapedesis. Seperti neutrofil, eosinofil juga melepaskan protein, sitokin, dan kemokin yang menghasilkan inflamasi tetapi mampu membunuh organisme penyerang. Namun demikian, eosinofil memiliki beberapa selektivitas dalam caranya merespon dan pada molekul pembunuh yang mereka keluarkan. Pematangan dan aktivasi nya dalam jaringan sangat dirangsang oleh IL-3, IL-5, dan GM-CSF. Terutama sekali melimpah di mukosa saluran pencernaan, di mana mereka bertahan melawan parasit, dan di mukosa pernafasan dan saluran kemih. Eosinofil yang beredar meningkat pada penyakit alergi seperti asma dan berbagai penyakit pernafasan lainnya dan penyakit gastrointestinal (Barrett *et al.*, 2012)

2.8.2.3 Basofil

Basofil juga masuk jaringan dan melepaskan protein dan sitokin. Mirip tetapi tidak identik dengan sel mast, dan seperti sel mast, basofil juga mengandung histamin. Basofil melepaskan histamin dan mediator inflamasi lainnya ketika diaktifkan dengan mengikat alergen spesifik ke molekul IgE dipermukaan sel, dan berpartisipasi dalam reaksi hipersensitivitas tipe-langsgung (alergi), dari urtikaria ringan dan rinitis sampai syok anafilaksis berat (Barrett *et al.*, 2012).

2.8.3 Sel Mast

Sel mast adalah sel-sel berserat yang sangat besar dari jaringan ikat yang berlimpah dalam jaringan yang bersentuhan dengan lingkungan eksternal, seperti di bawah permukaan epitel. Granulnya mengandung proteoglikan, histamin, dan protease. Seperti basofil, sel mast terdegranulasi ketika alergen terikat ke molekul IgE yang terikat di permukaan sel mast. Mereka terlibat dalam respon inflamasi yang diprakarsai oleh imunoglobulin IgE dan IgG. Inflamasi menyerang parasit.

Selain keterlibatan di sistem imun adaptif, mereka melepaskan TNF- α sebagai respons terhadap produk-produk bakteri oleh mekanisme antibodi-independen, sehingga berpartisipasi dalam imun bawaan nonspesifik yang memerangi infeksi sebelum pengembangan respon imun adaptif. Degranulasi sel mast menghasilkan manifestasi klinis alergi hingga anafilaksis (Murphy, 2012).

Sel mast (SM) tersebar luas di seluruh tubuh dan umumnya di permukaan mukosa. SM secara fungsional dan fenotip heterogen tergantung pada lingkungan mikro di mana mereka dewasa. Meskipun SM secara klasik sebagai sel efektor dari penyakit alergi yang dimediasi IgE, mereka juga diakui sebagai sel penting dalam pertahanan host, imun adaptif, respon homeostasis, dan imunoregulasi. Aktivasi SM dapat menginduksi pelepasan mediator yang sudah terbentuk seperti histamin dari granulnya, serta pelepasan mediator lipid, sitokin, dan kemokin yang memainkan peran beragam, tidak hanya dalam reaksi alergi tetapi juga dalam berbagai respon fisiologis dan patofisiologi (Murphy, 2012).

SM secara morfologis ditandai oleh banyak granul sitoplasma padat

elektron yang mengandung amina biogenik [histamin, serotonin]; beberapa serin dan protease lainnya {misalnya, tryptase-a, -bI, -bII, -bIII, -g [protease, serine S1 family member (PRSS)], -d, chymase-1, cathepsinG, granzyme B, dan carboxypeptidaseA3}; enzim lisosom [b-glucuronidase, b-hexosaminidase, arylsulfatase]; beberapa sitokin [TNF, bFGF, IL-4, dan SCF]; dan proteoglikan

[heparin, chondroitin sulfate]. Aktivasi SM biasanya diukur dengan memantau pelepasan mediator granul (degranulasi), dengan fokus khusus pada histamin, b-hexosaminidase, ortryptase. Pelepasan mediator yang sudah disimpan sebelumnya melalui degranulasi SM dapat menjadi kejadian awal dan cepat setelah stimulasi, yang menghasilkan pelepasan sebagian besar histamin yang disimpan dalam waktu 15–90 detik. Pelepasan mediator yang telah terbentuk ini memungkinkan tidak hanya reaksi anafilaktik cepat dan respon alergi tetapi juga memulai perekutan leukosit ke tempat invasi patogen, aktivasi proses imun bawaan, dan respon inflamasi. Respons jangka panjang lainnya yang terkait dengan mediator yang diturunkan dari granul termasuk penyembuhan luka dan proses remodeling jaringan melalui banyak komunikasi dengan sel lain (misalnya, proliferasi fibroblast dan produksi matriks ekstraselular oleh histamin dan protease SM) (Tae *et al.*, 2014).

2.8.4 Monosit / Makrofag

Monosit memasuki darah dari sumsum tulang dan bersirkulasi selama sekitar 72 jam. lalu masuk ke jaringan dan menjadi makrofag jaringan. Masa hidup mereka dalam jaringan tidak diketahui, tetapi data transplantasi sumsum tulang pada manusia menunjukkan bahwa mereka bertahan selama sekitar 3 bulan. Tampaknya monosit tidak masuk kembali ke sirkulasi. Beberapa mungkin berakhir sebagai sel raksasa berinti banyak pada penyakit inflamasi kronis. Makrofag diaktifkan oleh sitokin yang dilepas dari T limfosit. Makrofag yang diaktifkan bermigrasi dalam merespon rangsangan kemotaktik dan menelan serta membunuh bakteri dengan proses yang umumnya mirip dengan yang terjadi di neutrofil. Makrofag memainkan peran kunci dalam imun bawaan. Salah satu respon paling awal dari sistem imun tubuh bawaan untuk infeksi dan kerusakan jaringan adalah sekresi sitokin (TNF α , IL-1 dan IL-6) oleh sel-sel jaringan, yang

sangat penting untuk respon inflamasi akut. Makrofag jaringan dan sel mast merupakan sumber utama dari sitokin ini. Jenis sel lain seperti sel endotel dan sel epitel, juga dapat menghasilkan IL-1 dan IL-6. Makrofag juga mengeluarkan hingga 100 zat berbeda, termasuk faktor yang mempengaruhi limfosit dan sel lain, prostaglandin seri E, dan faktor pemicu *clotting* (Barrett *et al.*, 2012). Monosit juga mengandung butiran azurofil, mengandung asam hidrolase dan peroxidase. Makrofag, terutama makrofag alveolar, menunjukkan lebih banyak granul padat yang lebih heterogen; mengandung sejumlah besar asam hidrolase dan mungkin lisosom sekunder yang dihasilkan dari penggabungan lisosom primer Golgi dengan vakuola endositik (Murphy, 2012).

Tumor necrosis factor (TNF)

Adalah mediator respon inflamasi akut terhadap bakteri dan infeksi mikroba lainnya. TNF α diproduksi oleh makrofag, sel dendritik, dan jenis sel lainnya. Dalam makrofag TNF α disintesis sebagai protein membran tipe II yang *nonglycosylated* dan dinyatakan sebagai homotrimer, yang mampu mengikat salah satu bentuk TNF reseptor. Ada dua reseptor TNF yang berbeda yang disebut tipe I (TNF-RI) dan tipe II (TNF-RII). Reseptor TNF hadir pada sebagian besar tipe sel. Reseptor TNF adalah anggota dari keluarga besar protein yang disebut reseptor TNF superfamili, kebanyakan terlibat dalam respon imun dan inflamasi. Sitokin yang terikat kepada beberapa anggota keluarga reseptor TNF, seperti TNF-RI, TNF-RII, dan CD40, mengarah pada rekruitmen protein, yang disebut TNF receptor-associated factors (TRAFs), ke domain sitoplasma dari reseptor. TRAFs mengaktifkan faktor transkripsi, terutama NF- κ B dan AP-1 (Abbas *et al.*, 2012).

Interleukin-1 (IL-1)

Juga merupakan mediator respon inflamasi akut dan memiliki banyak aksi serupa seperti TNF. Sumber seluler utama IL-1, seperti TNF, adalah fagosit mononuklear yang teraktivasi. Tidak seperti TNF, IL-1 juga diproduksi oleh banyak tipe sel selain makrofag, seperti neutrofil, sel epitel (misalnya, keratinosit), dan sel-sel endotel. Ada dua bentuk IL-1, yang disebut IL-1 α dan IL-1 β , yang kurang dari 30% homolog satu sama lain, terikat ke reseptor permukaan sel yang sama dan memiliki aktivitas biologis yang sama. Bentuk utama secara biologis yang aktif disekresi adalah IL-1 β . IL-1 dewasa dirilis terutama ketika sel yang terinfeksi atau makrofag yang teraktivasi mati. Beberapa patogen bakteri menginduksi pengolahan IL-1 β dan IL-18 yang dimediasi inflamasome dalam makrofag dan kematian sel tergantung caspase-1, yang mengarah ke pelepasan sitokin inflamasi. TNF juga bisa menstimulasi fagosit dan jenis sel lain untuk menghasilkan IL-1. IL-1 memediasi efek biologisnya melalui membran reseptor yang disebut reseptor tipe I IL-1, yang diekspresikan pada banyak tipe sel, termasuk sel-sel endotel, sel epitel, dan leukosit. Reseptor ini adalah protein membran integral yang mengandung *ligandbinding* ekstraseluler domain Ig dan Toll/IL-1 receptor (TIR) signalling domain di wilayah sitoplasma. Peristiwa pensinyalan yang terjadi saat IL-1 berikatan dengan reseptor tipe I IL-1 menghasilkan aktivasi NF- κ B dan faktor transkripsi AP-1 (Abbas *et al.* 2012).

Interleukin-6

IL-6 adalah sitokin penting lainnya pada respon inflamasi akut yang memiliki efek lokal dan sistemik, termasuk induksi sintesis hati dari berbagai mediator inflamasi lainnya, stimulasi produksi neutrofil di sumsum tulang, dan diferensiasi sel T helper yang menghasilkan IL-17. IL-6 disintesis oleh fagosit

mononuklear, sel endotel vaskular, fibroblas, dan sel lain dalam menanggapi *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) dan terhadap respon IL-1 dan TNF. IL-6 adalah homodimer tipe I polipeptida keluarga sitokin. Reseptor untuk IL-6 terdiri dari rantai polipeptida yang mengikat sitokin dan subunit signal-transducing (gp130) yang juga merupakan signaling component reseptor untuk sitokin lain. Reseptor IL-6 mengaitkan jalur pensinyalan yang mengaktifasi faktor transkripsi *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) (Abbas et al., 2012).

2.8.5 Mediator Inflamasi

Mediator merupakan agen kimia yang banyak terlibat dalam proses inflamasi. Beberapa produk bakteri (mediator eksogen) dapat menyebabkan kebocoran vaskuler atau menarik leukosit dalam merespon infeksi bakteri. Sementara mediator endogen yang berasal dari cedera host lebih penting. Mediator endogen dikelompokkan dalam dua group : dari plasma dan dari jaringan

2.8.5.1 Faktor yang dilepas dari plasma

Ada tiga sistem didalam plasma yang terkait produksi mediator: a) sistem kinin, b) sistem complement dan c) sistem clotting

a. Sistem Kinin

Aktivasi sistem kinin menghasilkan bradikinin, yang merupakan efektor utama sistem kinin. Pada dosis sangat rendah menyebabkan a) kontraksi lambat dari beberapa jenis otot polos in vitro, b) dilatasi pembuluh darah sistemik in vivo, sehingga memicu hipotensi, c) nyeri saat dioleskan ke dasar lepuhan atau ketika disuntikkan ke kulit, dan d) peningkatan permeabilitas pembuluh darah setelah injeksi lokal. Juga memiliki aktivitas kemotaktik untuk neutrofil dan fagosit mononuklear ((Murphy, 2012)).

b. Sistem complement

Peran signifikan dari sistem *complement* adalah dalam pembentukan produk sampingan aktif biologis yang dapat bertindak sebagai mediator inflamasi. Produk sampingan tersebut diproduksi sebagai hasil dari aktivasi komplemen sistem atau dengan aksi langsung berbagai enzim "ekstracomplementer" pada C3 atau C5. Efek inflamasi utama dari produk sampingan sistem *complement* adalah sebagai berikut: Peningkatan Permeabilitas Vaskular, yang dikaitkan dengan pembentukan anafilatoksin, yang bertindak terutama sebagai pelepasan agen histamin, meskipun dalam beberapa keadaan (misalnya, dalam kontraksi otot polos) mereka juga dapat bertindak secara independen dari pelepasan histamin. Aktivasi kaskade *complement* mempromosikan beberapa proses. C3a dan C5a menginduksi degranulasi sel mast dan basofil yang melepaskan histamin dan dengan demikian menyebabkan vasodilataasi dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah. C5a juga dapat mempromosikan pembentukan beberapa lipid inflamasi dan menginduksi kemotaksis sel imun. Selain itu, opsonisasi mikroba oleh C3b mempromosikan fagositosis mereka (Murphy, 2012).

c. Sistem clotting

Aktivasi kaskade koagulasi menghasilkan mediator larut yang dapat meningkatkan inflamasi.

- Thrombin: Meningkatkan ekspresi selektin endotel yang meningkatkan rekrutmen leukosit.
- Fibrinopeptida: produk pemecahan fibrin. Meningkatkan permeabilitas pembuluh darah dan dapat bertindak sebagai agen kemotaktik.
- Bradikinin: Meningkatkan permeabilitas pembuluh darah, menyebabkan vasodilataasi, dan menginduksi sensasi nyeri yang berhubungan dengan peradangan akut (Barrett et al., 2012).

2.8.5.2 Faktor yang Dilepas dari Jaringan

Ada beberapa kelompok mediator inflamasi berbeda yang potensial yang mungkin dilepaskan dari sel. Mereka diklasifikasikan sebagai berikut: a) amina vasoaktif, b) asam lemak, c) Komponen lisosomal, d) produk limfosit, dan e) lainnya.

a. Amina vasoaktif (Histamin, 5-Hydroxytryptamine)

Histamin ditemukan dalam granula sel mast (dan basofil), di trombosit, dan di daerah parietal lambung; 5-hydroxytryptamine (5-HT atau serotonin) ditemukan di sel mast (hewan penggerat) dan trombosit, seperti juga di mukosa usus dan otak. Amina yang dilepas dari sel mast terjadi sebagai respons terhadap : 1) cedera fisik, misalnya, trauma mekanis, radiasi, panas; 2) berbagai bahan kimia, misalnya racun ular, mellitin dari racun lebah, tripsin, surfaktan (seperti Tween 80, garam empedu), dekstran, polivinilpirolidon, alkilamin, pembebas histamin (seperti 48/80), ATP, dan lisosom neutrofil protein kationik; dan 3) proses imunologi, misalnya, tantangan antigenik sel-sel tersensitisasi-antibodi homocytotropic, dan paparan anaphylatoxins (C3a dan C5a) (Murphy, 2012).

Para mediator yang dibebaskan dapat dikategorikan ke dalam dua kelompok: 1) mediator yang sudah terbentuk yaitu, sudah ada dalam sel mast, terkait dengan granul, dan dilepaskan dalam hitungan detik triger sel oleh antigen, termasuk histamin dan faktor chemotactic eosinofil anafilaksis (ECF-A), yang merupakan peptida asam dengan berat molekul 500; 2) mediator yang baru terbentuk (sedikit atau tidak terdeteksi sebelum terpapar antigenik, tetapi cepat disintesis, dan kemudian dirilis beberapa menit setelah dipicu oleh antigen) seperti

slow-reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) dan *platelet-activating factor* (PAF). Baik histamin dan 5-HT menginduksi kontraksi otot polos dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah. Tampaknya tidak ada chemotactic neutrofil. Baru-baru ini, telah dilaporkan bahwa histamin adalah chemotactic khusus untuk

eosinofil; Jadi, histamin dan ECF-A keduanya dibebaskan dari sel mast, mungkin menyebabkan masuknya dan lokalisasi eosinofil dalam reaksi hipersensititas segera (Murphy, 2012).

b. Asam lemak

SRS-A, adalah sebuah asam, lipid yang mengandung sulfur (perkiraan berat molekul 400) dihasilkan dan kemudian dirilis (bersama dengan histamin, ECF-A, PAF, dan prostaglandin) dari kepekaan yang tepat sel-sel ditantang dengan antigen. SRS-A dapat menginduksi kebocoran vaskular, tetapi tidak ada daya tarik kemotaktik untuk leukosit. Kebetulan, eosinofil manusia (tetapi bukan neutrofil) mengandung sejumlah besar aril sulfatase B, satu-satunya enzim yang sejauh ini diketahui merusak SRS-A; ini menunjukkan bahwa eosinofil infiltrasi dalam lesi anafilaksis bertindak sebagai mekanisme kontrol untuk SRS-A. (Abbas et al, 2012)

Prostaglandin, adalah senyawa C20 rantai panjang yang disintesis sel-sel dari asam lemak tak jenuh ganda. Mereka dapat diklasifikasikan menjadi berbagai kelompok (misalnya, E, F, A, dan B) atas dasar struktur. Mereka hadir di hampir setiap jaringan tubuh, tetapi faktor-faktornya terlibat dalam pelepasan mereka dan signifikansi penuh mereka sebagai agen farmakologis belum didefinisikan dengan jelas. Informasi tentang peran prostaglandin dalam peradangan adalah fragmentaris dan kadang-kadang bertentangan. Aktivitas Prostaglandin telah terdeteksi pada eksudat inflamasi, dan PG dilepaskan dari neutrofil selama fagositosis (Abbas et al, 2012)

c. Komponen Lysosome

Lysosom merupakan bagian dalam suatu struktur besar yang ada di sitoplasma; struktur besar tersebut agak tidak teratur dikelilingi oleh membran.

Material eksternal seperti bakteri *endocytosed*, serta komponen sel yang usang, dicerna di dalamnya. Bagian interior dipertahankan asam oleh aksi pompa proton, atau H⁺ ATPase, mendekati pH 5,0. Lysosom dapat mengandung lebih dari 40 jenis enzim hidrolitik, enzim-enzim ini semua adalah hidrolase asam, karena berfungsi paling baik pada pH asam kompartemen lysosom, dan menjadi fitur keamanan untuk sel. Jika lysosom pecah dan melepaskan isinya, enzim tidak akan efisien di dekat pH netral sitosol (7,2), dengan demikian tidak akan mampu mencerna enzym sitosol yang mungkin mereka temui (Barrett *et al.*, 2012)

Komponen lisosom neutrofil yang dilepas dalam respon inflamasi adalah :

a) protein kationik, b) protease asam dan c) protein netral

Protein kationik

Protein kationik nonenzimatik menginduksi kebocoran vaskular secara tidak langsung dengan menyebabkan degranulasi sel mast dalam beberapa spesies. Empat agen pemicu permeabilitas secara terpisah telah diidentifikasi dalam fraksi protein kationik dari lisosom neutrofil kelinci dan tikus; salah satu (band 2 protein) menginduksi degranulasi sel mast, tetapi yang lain bertindak independen dari pelepasan histamin. Faktor kemotaktik untuk mononuklear fagosit yang telah diekstrak dari neutrofil; juga merupakan protein kationik (Barrett *et al.*, 2012).

Protease asam

Protease asam dalam lisosom neutrofil dilaporkan mendegradasi membran basal dan protein lainnya pada pH asam secara *in vitro*. Melepas leukokinins dari leukokininogen plasma (Barrett *et al.*, 2012).

Protease netral

Efek utama dari enzim ini termasuk degradasi kolagen, elastin, membran basal ginjal, kartilago, dan fibrin; menghasilkan fragmen aktif secara kemotaktik dari faktor *complement C5* dan *C3*; mampu melepaskan zat seperti kinin dari

kininogen plasma. SH-dependent protease netral dapat meningkatkan permeabilitas pembuluh darah, atau dapat bertindak berdasarkan IgG untuk menghasilkan leukoegresin, faktor yang diklaim memiliki aktivitas kemotaktik neutrofil (Barrett *et al.*, 2012).

2.8.6 Rekrutmen Leukosit ke Tempat Inflamasi

Rekrutmen sejumlah besar neutrofil, diikuti oleh monosit, dari darah ke jaringan merupakan bagian dari respon inflamasi akut terhadap infeksi dan cedera jaringan. Sitokin TNF, IL-1, dan IL-6 serta kemokinin, yang disekresi di tempat infeksi lokal atau cedera jaringan, memiliki beberapa efek pada sel endotel jaskular, leukosit, dan sumsum tulang, yang bersama-sama meningkatkan pengiriman sel lokal yang dapat melawan infeksi dan memperbaiki jaringan. Efek TNF dan IL-1 pada inflamasi akut adalah : 1) menginduksi sel endotel venula postkapiler untuk mengekspresikan E-selectin dan meningkatkan ekspresi *Intercellular Adhesion Molecule* (ICAM-1) dan *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1), ligan untuk integrin leukosit. 2) merangsang berbagai sel untuk mensekresi kemokin, seperti CXCL1 dan CCL2, yang mengikat reseptor pada neutrofil dan monosit, meningkatkan afinitas integrin leukosit ke ligan mereka, dan merangsang gerakan leukosit (Abbas *et al*, 2012)

2.8.7 Fagositosis

Fagositosis merupakan proses aktif, bergantung energi dari menelan partikel besar ($> 0,5 \mu\text{m}$ diameter) ke dalam vesikel. Vesikula fagositik bergabung dengan lisosom, di mana partikel yang tertelan dihancurkan. Dengan cara ini, mekanisme pembunuhan, yang berpotensi melukai fagosit, diisolasi dari sel.

Mekanisme fagositosis dikelompokkan dalam dua tahap :

- a. Neutrofil dan makrofag mengekspresikan reseptor yang secara khusus mengenali mikroba, dan mengikat mikroba ke reseptor ini. Reseptor-reseptor ini adalah reseptor pengenalan pola, termasuk lektin tipe-C dan reseptor *scavenger*. Reseptor pengenalan pola dapat berkontribusi untuk fagositosis hanya dari organisme yang mengekspresikan pola molekul tertentu, seperti mannose untuk reseptor mannose. Fagosit juga memiliki reseptor ber afinitas tinggi untuk opsonin tertentu, termasuk molekul antibodi, protein *complement*, dan lektin plasma; reseptor ini sangat penting untuk fagositosis kebanyakan mikroba yang berbeda yang dilapisi dengan opsonin. Satu sistem yang paling efisien untuk mikroba opsonisasi adalah melapisi mereka dengan antibodi. Molekul antibodi memiliki tempat pengikatan antigen pada satu ujung dan ujung lainnya, wilayah Fc, berinteraksi dengan sel efektor dan molekul sistem imun bawaan. Fagosit mengekspresikan Fc reseptor afinitas tinggi yang disebut Fc RI khusus untuk satu jenis antibodi disebut IgG. jika seorang individu merespon infeksi dengan membuat antibodi IgG melawan antigen mikroba, molekul IgG mengikat antigen-antigen ini, ujung Fc dari antibodi yang terikat dapat berinteraksi dengan Fc γ RI pada fagosit, dan hasil akhirnya fagositosis mikroba yang efisien. Karena banyak antibodi berbeda dapat diproduksi dan mengikat banyak produk mikroba berbeda, oponiasi yang dimediasi antibodi berkontribusi terhadap fagositosis berbagai mikroba yang lebih luas dari pada reseptor pengenalan pola (Murphy, 2012).
- b. Neutrofil aktif dan makrofag membunuh mikroba yang difagositosis dengan aksi molekul mikrobisida di *phagolysosome*. Beberapa reseptor yang mengenali mikroba, termasuk TLR, G *protein-coupled* reseptor, antibodi Fc dan reseptor *complement* C3, dan reseptor untuk

sitokin, terutama IFN- γ , berfungsi secara kooperatif untuk mengaktifkan fagosit untuk membunuh mikroba yang dicerna. Perpaduan vakuola fagositik (*phagosomes*) dengan lisosom menghasilkan pembentukan fagolisoma, di mana sebagian besar mekanisme mikrobisida terpusat. Ada tiga jenis mekanisme mikrobisida yang paling penting, yakni : *Reactive oxygen species*, *Nitric oxide* dan Enzim proteolitik (Murphy, 2012).

Reactive oxygen species

Makrofag dan neutrofil aktif mengubah oksigen molekuler menjadi *reactive oxygen species* (ROS), yang sangat reaktif mengoksidasi agen yang menghancurkan mikroba (dan sel lainnya). Sistem penghasil radikal bebas primer adalah sistem oksidase fagosit. Oksidase fagosit adalah enzim multisubunit yang dirakit dalam fagosit yang diaktifkan terutama di membran phagolysosomal. Oxidase fagosit diinduksi dan diaktifkan oleh banyak rangsangan, termasuk IFN- γ dan sinyal dari TLR. Fungsi enzim ini adalah mengurangi molekul oksigen menjadi ROS seperti radikal superoksida, dengan pengurangan bentuk nikotinamida adenin dinukleotida fosfat (NADPH) yang bertindak sebagai kofaktor. Superoksida secara enzimatik dipecah menjadi hidrogen peroksida, yang digunakan oleh enzim myeloperoxidase untuk mengkonversi secara normal ion halida yang tidak reaktif menjadi asam hypohalous rektif yang beracun bagi bakteri. Proses dimana ROS diproduksi disebut *respiratory burst* karena terjadi selama konsumsi oksigen.

Fungsi lain dari enzim Oxidase fagosit adalah untuk menghasilkan kondisi dalam vakuola fagositik yang diperlukan untuk aktivitas enzim proteolitik. Oksidase bertindak sebagai pompa elektron, menghasilkan gradien elektrokimia di seluruh membran vacuole, yang dikompensasi oleh pergerakan ion ke dalam vakuola. Hasilnya adalah peningkatan pH dan osmolaritas di dalam vakuola, yang diperlukan untuk aktivitas elastase dan cathepsin G (Murphy, 2012).

Nitric oxide

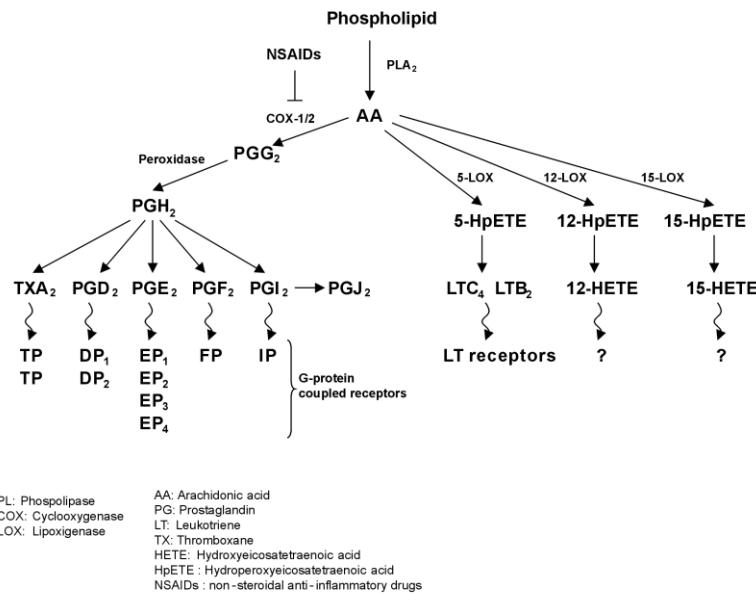
Selain ROS, makrofag menghasilkan reaktif nitrogen spesies, terutama nitrit oksida, dengan aksi enzim yang disebut *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). iNOS adalah enzim sitosol yang tidak ada dalam makrofag istirahat tetapi dapat diinduksi sebagai respons terhadap produk mikroba yang mengaktifkan TLR, terutama dalam kombinasi dengan IFN- γ . iNOS mengkatalisis konversi arginin menjadi citrulline, dan dengan bebas gas nitrit oksida difusibel dilepaskan. Dalam phagolysosomes, nitrit oksida dapat bergabung dengan hidrogen peroksida atau superokksida, yang dihasilkan oleh oksidase fagosit, untuk menghasilkan peroksinitrit radikal yang sangat reaktif yang bisa membunuh mikroba (Abbas *et al*, 2012)

Enzim proteolitik

Neutrofil aktif dan makrofag menghasilkan beberapa enzim proteolitik di phagolysosome yang berfungsi menghancurkan mikroba. Salah satu enzim penting dalam neutrofil adalah elastase, protease serine spektrum luas yang diketahui diperlukan untuk membunuh banyak jenis bakteri. Enzim penting lain adalah cathepsin G. (Abbas *et al*, 2012)

Neutrofil dan makrofag yang sangat aktif, dapat melukai jaringan normal host dengan pelepasan enzim lisosomal, ROS, dan nitrit oksida. Produk Mikrobisida sel-sel ini tidak membedakan antara jaringan sendiri dan mikroba. Akibatnya, jika produk ini masuk lingkungan ekstraseluler, mereka mampu menyebabkan cedera jaringan (Abbas *et al*, 2012)

2.8.8 Mekanisme Reaksi Penghambatan Mediator Inflamasi



Gambar 2.13 Mekanisme Antiinflamasi melalui Jalur Asam Arakidonat. (Yoon and Baek, 2005).

Keterangan : AA dikonversi menjadi prostaglandin atau leukotrien, tergantung enzim yang ada

Reaksi penghambatan terbentuknya mediator inflamasi dibagi dua jalur :

Jalur tergantung Asam Arakidonat dan jalur tidak tergantung Asam Arakidonat.

Yang tergantung jalur asam Arakidonat adalah penghambatan COX, LOX, PLA₂,

sementara yang tidak tergantung asam Arakidonat adalah melalui *Peroxisome*

proliferator activated receptors (PPARs), *Nitric oxide synthase* (NOS), NF- κ B

(*Nuclear transcription factor κ B*) (Yoon and Baek, 2005).

2.8.8.1 Penghambatan COX

Efek anti-inflamasi diyakini merupakan hasil dari penghambatan pembentukan prostaglandin oleh prostaglandin H sintase yang disebut juga cyclooxygenase (COX), yang mengubah asam arakidonat (AA) yang dilepas oleh

membran fosfolipid, menjadi prostaglandin. Ada dua isoform prostaglandin H sintase, yakni COX-1 dan COX-2. COX-1 diekspresikan secara konstitutif di banyak jaringan, sementara ekspresi COX-2 diatur oleh mitogen, promotor tumor, dan faktor pertumbuhan. NSAID konvensional memblok COX-1 dan COX-2, menginduksi ulserasi lambung dan gagal ginjal karena penghambatan COX-1. COX-1 diperlukan untuk perlindungan mukosa lambung, sehingga penghambatan COX-1 mengganggu aktivitasnya dan menyebabkan gangguan gastrointestinal mulai dari ketidaknyamanan sederhana sampai pendarahan ulkus. COX-2 terbukti memiliki tingkat perdarahan gastrointestinal yang lebih rendah bila dibandingkan dengan NSAID konvensional, COX-2 terbukti mengganggu efek fisiologis normal, termasuk regulasi aliran darah vaskular dan ginjal. Celebrex dan Vioxx ditarik dari pasar pada tahun 2005 karena peningkatan risiko kardiovaskular, kemungkinan disebabkan oleh pembentukan thromboxane melalui jalur COX-1 (Yoon and Baek, 2005).

2.8.8.2 Penghambatan LOX

Lipoxygenase (LOX) adalah enzim yang bertanggung jawab untuk menghasilkan asam hidroksil dan leukotrien (LTs) dari AA (Gambar 2.13). Ada tiga isozim LOX yang berbeda dalam mempengaruhi sel dan jaringan yang berbeda, yakni 15-LOX mensintesis anti-inflamasi 15-HETE; 12-LOX terlibat dalam memprovokasi inflamasi /gangguan alergi, 12-LOX mensintesis 12-HETE, yang mengumpulkan trombosit dan menginduksi respon inflamasi; dan 5-LOX menghasilkan 5-HETE dan LT, yang kemoatraktan kuat dan mengarah ke perkembangan asma. Efek dari polifenol pada 5- dan 12-LOXs telah banyak diteliti untuk menjelaskan sifat anti-inflamasi. Flavonol, termasuk kaempferol, quercetin, morin dan myricetin ditemukan mempunyai aktivitas 5-LOX inhibitor (Yoon and Baek, 2005).

2.8.8.3 Penghambatan COX dan LOX

Jalur LOX menghasilkan leukotrien. Bila hanya COX-2 yang diblok, jalur LOX masih menghasilkan mediator inflamasi yang poten. Kondisi ini bahkan dapat diperparah oleh hanya memblokir kaskade inflamasi COX-2, yang memungkinkan jalur LOX mempercepat pembentukan leukotrien. Penghambatan ganda LOX /COX telah disarankan untuk pendekatan pengembangan obat baru untuk anti-inflamasi. Ini penting karena beberapa peneliti telah menemukan bahwa penghambatan COX-2 saja akan memperburuk produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α dan IL-1 β , yang keduanya menyebabkan kerusakan di tempat peradangan. Banyak polifenol ditemukan merupakan inhibitor keduanya COX dan LOX (Yoon and Baek, 2005).

2.8.8.4 Penghambatan PLA2

Phospholipase A2 (PLA2), merupakan enzim yang memotong fosfolipid menghasilkan lysophospholipid dan asam lemak bebas, asam arakidonat. PLA2 ber peran penting dalam proses inflamasi. Penghambatan PLA2 bisa menjadi agen terapeutik yang poten untuk menyembuhkan penyakit inflamasi manusia. Fosfolipase diklasifikasikan menjadi tiga kelompok besar: sekretorik PLA2 (sPLA2), cytosolic PLA2 (cPLA2), dan kalsium-independen PLA2 (iPLA2). sPLA2-V dan sPLA2-X secara selektif diekspresikan dalam epitelium saluran nafas manusia. sPLA2-IIA sangat diekspresikan selama terjadi inflamasi dan sepsis akibat induksi LPS, sitokin dan NF- κ B. Enzim ini sekarang terkait dengan rinitis alergi, rheumatoid arthritis, dan septik syok. Keluarga PLA2 merupakan target terapi dengan potensi yang terus meningkat. Kemungkinan PLA2 merupakan mediator inflamasi intra-dan ekstraseluler yang penting. Modulasi dari Aktivitas sPLA2 dan / atau cPLA2 penting dalam mengontrol proses inflamasi.

Quercetin ditemukan menjadi inhibitor PLA2 yang efektif pada leukosit manusia dan rabbit (Yoon and Baek, 2005).

2.8.8.5 Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs)

Banyak sitokin inflamasi yang diproduksi dan diatur pada tingkat transkripsi, dapat meningkatkan atau menghambat proses inflamasi. Salah satu hubungan molekuler antara proinflamasi sitokin dan faktor transkripsi adalah *Peroxisome proliferator activated receptors* (PPARs). PPARs adalah reseptor hormon inti yang diaktifkan oleh endogen spesifik dan eksogen ligan. Ada tiga isoform (α , β / δ , dan γ) telah diidentifikasi dan dikodekan oleh gen yang terpisah. Aktivasi PPAR α bertanggung jawab atas efek pleiotropik dari proliferator peroksisom, seperti induksi enzim, peroksisom proliferasi, pembesaran hati dan anti-inflamasi. PPAR γ juga ber peran penting dalam regulasi *uptake* seluler dan β -oksidasi asam lemak. PPAR δ (juga dikenal sebagai PPAR β) diekspresikan secara luas dengan kadar relatif lebih tinggi di otak, usus besar, dan kulit, namun sangat sedikit yang diketahui tentang efek PPAR δ pada inflamasi. PPAR γ dibagi lagi menjadi tiga subtipen: PPAR γ 1, γ 2, dan γ 3. Semua isotipe PPAR membentuk komplek heterodimerik dengan retinoid X reseptor (RXR), dan kompleks terikat pada PPAR Respon Element (PPRE), yang berfungsi sebagai pengatur sentral diferensiasi seluler, apoptosis, respons inflamasi, metabolisme lipid dan penyakit metabolismik. Studi pertama menunjukkan peran potensial PPARs dalam respon inflamasi, yang menunjukkan bahwa durasi respon inflamasi berkepanjangan pada tikus yang di KO PPAR α sebagai respons terhadap LTB4. Sejak itu, semakin banyak bukti menunjukkan bahwa ligan PPARs menghambat sitokin pro-inflamasi dalam monosit. Dengan demikian, aktivasi PPARs mengakibatkan aktivitas anti-inflamasi. Sangat penting pula bahwa jalur PPARs terhubung erat dengan jalur inflamasi lain termasuk NF- κ B, ekspresi COX-2, dan sitokin pro-inflamasi. Hasil

ini menunjukkan bahwa aktivasi PPARs oleh polifenol tertentu merupakan kemungkinan lain untuk pengobatan penyakit inflamasi kronis (Puhl *et al.*, 2015)

2.8.8.6 Nitric Oxide Synthase (NOS)

Nitrat oksida (NO) yakni gas radikal bebas dilepas oleh sekelompok enzim,

termasuk endothelia NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS) dan inducible NOS

(iNOS), dengan pembentukan secara stoikiometri sejumlah L-sitrulin dari L-

arginine. NO yang dihasilkan iNOS berkepanjangan berkaitan dengan inflamasi.

Karena NO adalah salah satu dari mediator inflamasi, penghambatan NO oleh

ekstrak tanaman yang dapat dimakan telah dilaporkan. Dengan menggunakan

makrofag yang diberi LPS / sitokin atau macrophage- like cell lines, quercetin

ditemukan menghambat produksi NO. Namun, studi mekanisme telah

menunjukkan bahwa senyawa yang meng downregulasi Ekspresi iNOS,

menghasilkan pengurangan jumlah produksi NO. Beberapa turunan flavonoid,

termasuk apigenin, quercetin, dan morin, juga telah menghambat produksi NO

dari C6 astrocytes yang mengaktifkan LPS / interferon γ. Quercetin jelas

menghambat produksi TNF-α dan NO oleh makrofag yang diaktifkan LPS, dan

penghambatan TNF-α dapat terjadi pasca transcriptional, sedangkan inhibisi iNOS

biasanya terjadi pada tingkat transkripsi (Yoon and Baek, 2005).

2.8.8.7 NF-κB (*Nuclear transcription factor κB*)

Nuclear transcription factor κB (NF-κB), yang ditemukan oleh David

Baltimore pada tahun 1986, adalah suatu faktor ubiquitos yang berada di

sitoplasma. Ketika sudah diaktifkan, ditranslokasi ke nukleus, dan menginduksi

transkripsi gen. NF-κB diaktifkan oleh radikal bebas, stimulasi inflamasi,

karsinogen, promotor tumor, endotoksin, γ-radiasi, sinar ultraviolet (UV), dan sinar-

X. Setelah aktivasi, NF-κB menginduksi ekspresi lebih dari 200 gen yang telah

terbukti menekan apoptosis dan menginduksi transformasi seluler, proliferasi, invasi, metastasis, *chemoresistance*, *radio-resistance*, dan inflamasi. bentuk aktif NF- κ B telah ditemukan memediasi kanker, atherosklerosis, infark miokard, diabetes, alergi, asma, radang sendi, dan penyakit inflamasi lainnya. Oleh sebab itu, NF- κ B dikaitkan dengan berbagai macam penyakit ini, karena sebagian besar penyakit disebabkan oleh regulasi inflamasi yang buruk. Karena itu, agen yang bisa menekan aktivasi NF- κ B, pada prinsipnya, memiliki potensi untuk mencegah, menunda timbulnya, atau mengobati penyakit inflamasi. Penghambatan NF- κ B oleh beberapa polifenol dapat menjelaskan efek antiinflamasi dari senyawa ini (Limtrakul *et al.*, 2015).

2.9 Patogenesis Inflamasi pada Asma

Proses inflamasi pada asma dimulai dari inflamasi akut yang terjadi berulang-ulang, sehingga menyebabkan inflamasi kronis. Dalam proses inflamasi saluran napas asma, berbagai sel, seperti eosinofil, limfosit T, sel mast, neutrofil, dan sel dendritik (DC) terlibat (Nakagome and Nagata, 2011).

2.9.1 Inflamasi Akut Pada Asma

Respon inflamasi akut pada serangan asma dipicu oleh paparan allergen atau iritan pada individu yang rentan alergi. Mekanisme awal sama dengan mekanisme hipersensitivitas tipe 1. *Early phase reaction* (EPR) dimulai setelah pengaktifan sel mast yang membawa IgE alergen tertentu pada permukaannya, sel mast yang diaktifkan melepaskan mediator proinflamasi seperti histamin, eikosanoid, dan spesies oksigen reaktif yang menginduksi kontraksi otot polos saluran napas, sekresi lendir, dan vasodilatasi. Efek ini memberikan kontribusi terhadap obstruksi saluran napas. Inflamasi pada *Late-phase reaction* (LPR) terjadi antara 6 sampai 9 jam setelah terpapar alergen dan melibatkan perekruitan

dan aktivasi eosinofil, sel T CD4+, basofil, neutrofil, dan makrofag. Aktivasi sel T CD4+ menyebabkan pelepasan sitokin IL-4 dari sel T helper tipe 2 (Th2) yang dapat menjadi mekanisme kunci dari LPR. Dua puluh empat jam setelah terpapar alergen, terjadi peningkatan sel T interleukin-2 (IL-2) yang diaktifkan dan interleukin-5 (IL-5) serta ekspresi *messenger RNA* (mRNA) *granulosit-makrophag colony-stimulating factor* (GM-CSF) pada bronkus yang dibiopsi. Sitokin seperti IL-5 dan GM-CSF berperan meningkatkan rekrutmen eosinofil ke dinding saluran napas yang mengalami inflamasi. Peningkatan hyperresponsif saluran napas atau *airway hyperresponsiveness* (AHR) biasanya dapat ditunjukkan setelah LPR (Bousquet *et al.*, 2000).

2.9.2 Inflamasi Kronis pada Asma

Inflamasi pada asma kronis jauh lebih kompleks. Semua sel dari saluran napas, termasuk sel T, eosinofil, sel mast, makrofag, sel epitel, fibroblas, dan sel-sel otot polos bronkial terlibat dalam asma dan menjadi aktif. Namun, eosinofil berperan sebagai efektor dengan melepaskan mediator proinflamasi, mediator sitotoksik, dan sitokin, sehingga menyebabkan kebocoran pembuluh darah, hipersekresi lendir, kontraksi otot polos, penumpahan epitel dan bronkial *hyperresponsiveness*. Sel-sel ini juga terlibat dalam regulasi inflamasi saluran napas dan memulai proses *remodeling* oleh pelepasan sitokin dan faktor pertumbuhan (Bousquet *et al.*, 2000).

2.9.3 Aktivasi Eosinofil, Sel T CD4+, Sel Mast, Epitel dan Sitokin pada Asma

Eosinofil secara istimewa menumpuk di tempat inflamasi alergi dan diyakini memainkan peran penting dalam patofisiologi asma melalui pelepasan berbagai mediator inflamasi, termasuk *major basic protein* (MBP), cysteinyl leukotrien (CysLTs), radikal oksigen spesies, dan sitokin. IL-5 memiliki peran terbatas dalam

pengembangan infiltrasi eosinophilic dan tidak bertanggung jawab atas pelepasan granul protein tertentu dari eosinofil pada asma ringan. Eosinofil sebagian besar berkontribusi pada pengembangan remodeling saluran napas asma. Mekanisme lain dimana eosinofil berkontribusi pada penyakit saluran napas asma dapat melalui terbentuknya CysLTs. Ada bukti dimana besarnya inflamasi eosinophilic berkorelasi positif dengan konsentrasi CysLTs di sputum (Nakagome and Nagata, 2011).

Inflamasi alergi saluran napas umumnya dianggap sebagai proses yang dimediasi respon type **sel Th2**, aktivasi sel CD4+ Th2 menghasilkan sejumlah besar sitokin seperti IL-4, IL-5, dan IL-13, yang menginduksi produksi IgE, inflamasi eosinophilic, sekresi lendir, dan AHR. Pada pasien dengan asma, sel T yang diaktifkan, terutama sel CD4 + Th2, menyusup ke dalam saluran napas, yang berhubungan dengan keparahan penyakit. Sel-sel CD4+ Th2 penting untuk induksi asma (Bradding, 2007).

Peran **sel mast** penting pada asma parah, infiltrasi sel-sel mast kedalam otot polos saluran napas adalah salah satu karakteristik asma parah yang mekanismenya melibatkan CXCL10 / CXCR3 axis. Sel mast melepaskan amphiregulin, yang menginduksi sekresi lendir dan remodeling jaringan setelah agregasi Fc ϵ RI, dan ekspresi molekul ini tidak dihambat oleh kortikosteroid, sehingga menunjukkan bahwa sel-sel mast memainkan peran dalam resistensi kortikosteroid asma. IgE mengaktifkan sel mast melalui agregasi Fc ϵ RI. Anti-IgE

Ab menetralkan IgE yang beredar dan mengurangi ekspresi Fc ϵ RI pada sel mast, sehingga menekan fungsi sel mast (Bradding, 2007)

Pada asma parah, bukan hanya inflamasi eosinofilik tetapi juga inflamasi **neutrofilik** berperan, dimana didapatkan neutrofil sputum pada pasien asma parah lebih besar dan adanya pelepasan mediator yang berasal dari eosinofil dibandingkan dengan asma ringan sampai sedang. IL-8 memainkan peran penting

dalam akumulasi neutrofil di tempat peradangan, dan ekspresi IL-8 dalam saluran napas di upregulasi pada pasien asma berat. Neutrofil yang dirangsang IL-8 menyebabkan eosinofil menumpuk dalam saluran napas penderita asma. Peningkatan migrasi eosinofil oleh neutrofil yang dirangsang IL-8 dihambat oleh matriks *metalloproteinase-9 inhibitor* atau LTB4 reseptor antagonis (Nakagome and Nagata, 2011).

2.10 Membran Sel

Membran yang mengelilingi sel merupakan struktur yang terdiri dari lipid dan protein dan bersifat semipermeabel. Meskipun struktur kimia membran dan sifatnya bervariasi dari satu lokasi ke yang lain, mereka memiliki fitur umum tertentu, yakni: pada umumnya mempunyai tebal sekitar 7,5 nm (75 Å). Lipid utama adalah fosfolipid seperti phosphatidylcholine, phosphatidylserine, dan phosphatidylethanolamine. Bentuk molekul fosfolipid merefleksikan sifat kelarutannya: ujung "kepala" dari molekul mengandung bagian fosfat dan relatif larut dalam air (polar, hidrofilik) dan ujung "ekor" relatif tidak larut (nonpolar, hidrofobik). Dengan memiliki kedua sifat hidrofilik dan hidrofobik membuat lipid sebuah molekul amphipathic. Di dalam membran, ujung molekul hidrofilik terpapar ke lingkungan berair di bagian luar sel dan sitoplasma berair; ujung hidrofobik bertemu di bagian interior membran yang miskin air. Pada eukariota (sel yang mengandung nukleus), membran sel mengandung berbagai glycosphingolipids, sphingomyelin, dan kolesterol selain fosfolipid dan fosfatidilkolin (Barrett *et al.*, 2012).

Banyak protein yang berbeda tertanam di dalam membran. Protein tersebut ada yang sebagai protein integral, yang tertanam dalam lembaran membran, ada juga sebagai protein perifer, yang terkait dengan bagian dalam atau luar membran. Jumlah protein bervariasi secara signifikan dengan fungsi

membran, tetapi membentuk rata-rata 50% dari massa membran; yaitu, ada sekitar satu molekul protein per 50 molekul fosfolipid. Protein dalam membran menjalankan banyak fungsi, seperti: 1) molekul adhesi sel (CAM) yang menjangkar sel tetangganya atau pada laminasi basal; 2) sebagai pompa, aktif mengangkut ion melintasi membran; 3) sebagai pembawa, mengangkut zat elektrokimia dengan difusi. 4) sebagai saluran ion, yang ketika diaktifkan, mengizinkan bagian ion masuk atau keluar dari sel; 5) sebagai reseptor yang mengikat ligan atau molekul pembawa pesan, memulai perubahan fisiologis di dalam sel. 6) sebagai enzim, mengkatalisis reaksi pada permukaan membran (Barrett *et al.*, 2012).

2.11 Pengukuran Aktivitas Antiinflamasi

Ada beberapa metode uji aktivitas antiinflamasi baik secara *invivo* maupun *invitro*, diantaranya, *invitro*: Stabilisasi membrane eritrosit, Stabilisasi membrane lisosom (Chippada, *et al.*, 2011), Cox2 dan LOX inhibitor Assay Kit (George, *et al.*, 2014). *Invivo*: induksi edema dengan *carrageenan* pada telapak kaki tikus (Paramita *et al.*, 2016), induksi edema dengan *xylene* pada telinga mencit (Paramita *et al.*, 2016). Sementara uji aktivitas antiinflamasi pada asma secara *invivo* menggunakan model hewan coba asma guinea pig atau tikus (rat) yang diinduksi ovalbumin (Evan *et al.*, 2012; Lowe *et al.*, 2014).

2.11.1 Induksi Edema dengan Carrageenan pada Telapak Kaki Tikus

Model ini berdasarkan pada prinsip pelepasan mediator inflamasi oleh *carrageenan*. Pembentukan edema oleh *carrageenan* pada telapak kaki tikus bersifat bifasik, dimana pada fase pertama adalah pelepasan histamin dan serotonin. Selanjutnya pada fase kedua adalah pelepasan prostaglandin, protease dan lisosom. Injeksi *carrageenan* secara subkutan pada telapak kaki tikus

menimbulkan inflamasi akibat ekstravasasi plasma, peningkatan kadar cairan dalam jaringan dan eksudasi protein plasma, bersama dengan ekstravasasi netrofil, akibat metabolisme asam arakidonat. Fase pertama dimulai segera setelah injeksi *carrageenan* dan menghilang dalam 2 jam, sementara itu fase kedua dimulai pada akhir fase pertama dan bertahan hingga 3-5 jam ke depan (Paramita *et al.*, 2016).

Prosedur Kerja

Sebelum perlakuan tikus dipuaskan makan selama 18 jam, akses minum tetap diberi. Volume telapak kaki diukur, diberi bahan uji ekstrak 3 dosis, Indometasin (kontrol positif) dan CMC 0,5% (kontrol negatif). Satu jam kemudian diinjeksi 0,1 ml carageenan 1% secara subplantar. Selanjutnya setiap jam dilakukan pengukuran volume edema telapak kaki hingga jam ke enam setelah induksi radang. Pada tiap kelompok dihitung persen peningkatan volume edema dengan rumus berikut: $100 \times (V_1 - V_0)/V_0$, dimana V_1 adalah volume edema telapak kaki tikus setelah induksi *carrageenan*, V_0 adalah volume edema telapak kaki tikus sebelum induksi *carrageenan* (George *et al.*, 2014; Shaikh *et al.*, 2016).

2.11.2 Stabilisasi Membran Sel

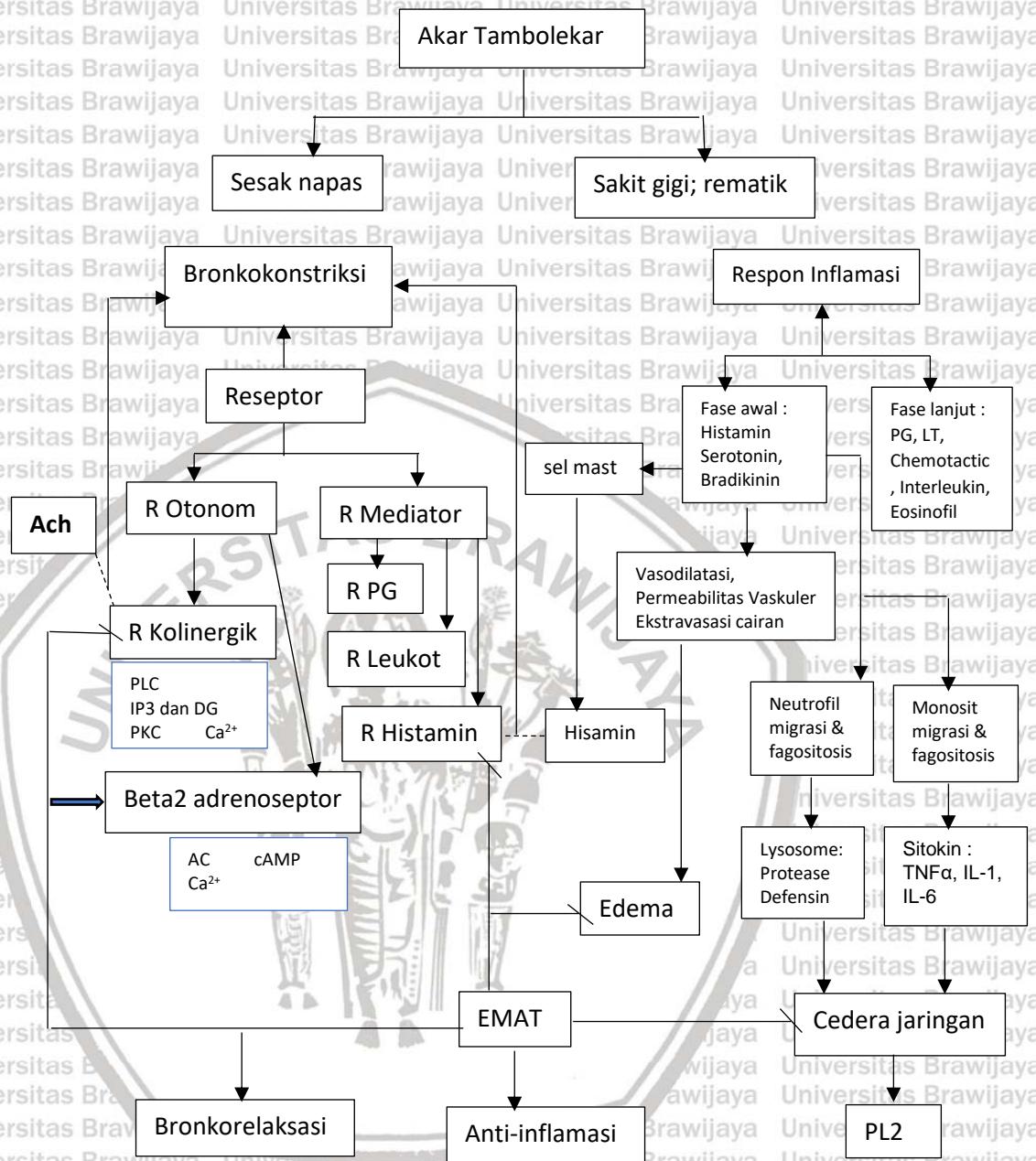
Integritas membran sel sangat penting untuk pertumbuhan normal, perkembangan, dan fungsi sel. Paparan eritrosit ke media yang merugikan, seperti larutan hiposalin, metil salisilat atau fenil hidralazin, menyebabkan pecahnya membran sel diikuti oleh hemolisis dan oksidasi hemoglobin (Anosike *et al.*, 2012).

Efek hemolitik hipotonik berkaitan dengan akumulasi cairan yang berlebihan di dalam sel mengakibatkan pecahnya membran sel darah merah. Cedera pada membran sel darah merah akan membuat sel lebih rentan terhadap kerusakan sekunder melalui radikal bebas yang menginduksi peroksidasi lipid yang akan melepaskan PLA₂. Stabilisasi membran mengarah pada pencegahan kebocoran

serum protein dan cairan ke dalam jaringan selama periode peningkatan permeabilitas yang disebabkan oleh mediator inflamasi (Anosike *et al.*, 2012). Stabilisasi Membran lisosom penting dalam membatasi respon inflamasi dengan mencegah pelepasan konstituen lisosom dari neutrofil yang teraktivasi seperti enzim dan protease bakterisida, yang menyebabkan inflamasi jaringan lebih lanjut dan kerusakan pada ekstra seluler. Karena membran sel darah merah mirip dengan komponen membran lisosomal, penghambatan lisis membran sel darah merah yang diinduksi hipotonitas dan panas digunakan sebagai pengukuran mekanisme aktivitas antiinflamasi bahan obat atau ekstrak tanaman. Jadi, senyawa dengan sifat menstabilkan membran dapat menjadi pelindung signifikan membran sel dari bahan toksik dan gangguan reaksi inflamasi fase awal melalui penghambatan pembentukan mediator inflamasi (Kumar *et al.*, 2011).

Pelepasan mediator yang telah terbentuk (Histamin, serotonin) dari sel mast tidak hanya dari reaksi anafilaktik cepat dan respon alergi, tetapi juga karena dimulainya perekutan leukosit (neutrofil) ke situs invasi patogen, aktivasi proses imun bawaan, dan respon inflamasi, yang dimediasi oleh influx Ca^{2+} kedalam sitoplasma sel mast, hal ini menyebabkan membran sel mast tidak stabil dan mediator inflamasi seperti histamin, serotonin mudah keluar (Barrett *et al.*, 2012). Maka bahan atau ekstrak yang beraktivitas menstabilkan membran RBC yang analog dengan membran lisosom dapat juga menghambat degranulasi sel mast sehingga mencegah pelepasan histamin, serotonin pada fase awal inflamasi (Kumar *et al.*, 2011).

2.12 Kerangka Teori



Gambar 2.14 Kerangka teori Kajian Aktivitas Ekstrak Metanol Akar Tambolekar (*Coptosapelta flavescent* Korth) sebagai Bronkdilator dan antiinflamasi

Keterangan Gambar 3.1: → = menstimulasi

→ = menghambat

= berinteraksi

Akar Tambolek ar digunakan secara tradisional untuk mengobati sesak napas, sakit gigi maupun rematik. Sesak napas merupakan gejala bronkokonstriksi; sakit gigi maupun rematik merupakan respon inflamasi. Pada fase awal inflamasi akut, histamin yang dilepas sel mast berikatan dengan reseptor histamin di saluran napas, terjadi serangkaian reaksi molekuler yang mengaktifkan phospholipase C_e(PLC), terbentuk IP₃ dan DG yang meningkatkan konsentrasi Ca²⁺ sitosol dan aktivasi protein kinase C sehingga terjadi bronkokonstriksi. Adanya respon inflamasi akut juga menyebabkan acetylcholin (ACh) dilepas oleh saraf kolinergik dan sel2 inflamasi, ACh yang berikatan dengan reseptor M₃ kolinergik di saluran napas menimbulkan serangkaian reaksi molekuler sehingga konsentrasi Ca²⁺ sitosol meningkat dan terjadi bronkokonstriksi. Ekstrak metanol akar tambolek (EMAT) diharapkan menduduki reseptor histamin maupun reseptor kolinergik, sehingga histamin dan ACh tidak dapat berikatan dengan reseptor histamin dan kolinergik masing-masing, akibatnya tidak terjadi bronkokonstriksi. EMAT juga diharapkan beraktivitas di reseptor beta₂ adrenergik, menstimulasi Adenyl cyclase (AC) sehingga meningkatkan kadar cAMP, dan mengurangi konsentrasi Ca²⁺ di sitosol yang berakibat bronkorelaksasi.

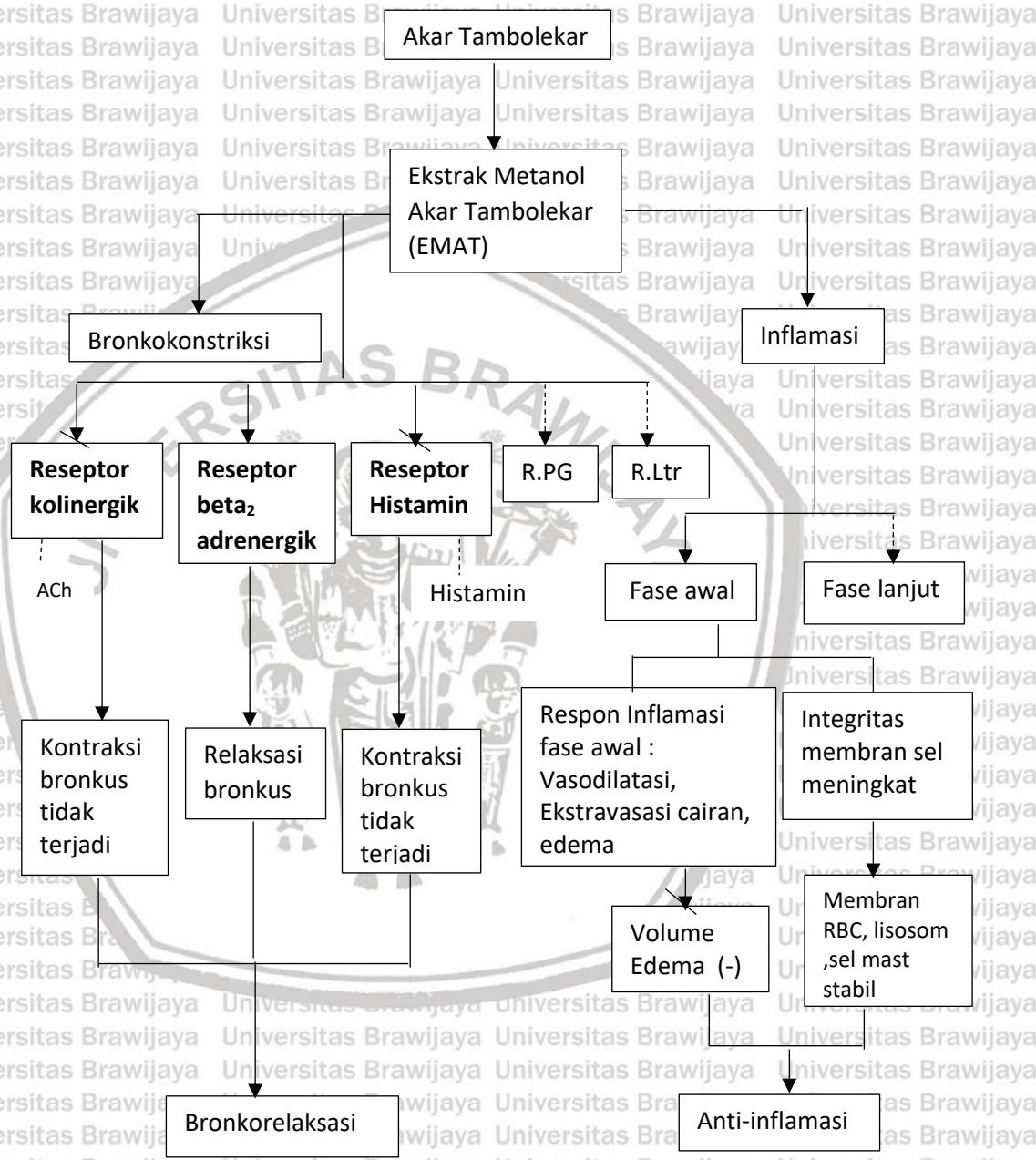
Pada fase awal inflamasi akut, histamin serotonin akan menimbulkan vasodilatasi, meningkatkan permeabilitas vaskuler, sehingga terjadi ekstravasasi cairan dan menimbulkan edema. EMAT diduga beraktivitas antiinflamasi dengan menghambat reaksi pembentukan edema dengan menghambat respon awal inflamasi.

Pada fase awal inflamasi akut, selain sel mast yang mengalami degranulasi, sel neutrofil dan monosit juga menjalankan fungsinya melakukan migrasi ketempat inflamasi dan memfagositosis sisa-sisa sel yang rusak, dengan melepaskan isi lysosome berupa antara lain protease, defensin pada neutrofil, sedangkan monosit melepaskan sitokin berupa TNF- α , IL-1 dan IL-6, menimbulkan cedera jaringan lebih lanjut, dan melepaskan phospholipase A₂ (PLA₂) yang merupakan prekursor inflamasi. EMAT diduga beraktivitas antiinflamasi dengan menstabilkan membran sel-sel tersebut sehingga dapat menghambat pelepasan histamin dan PLA₂.

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka konsep



Gambar 3.1 Kerangka konsep Penelitian

Keterangan gambar

→ = dilakukan penelitian

→ = tidak dilakukan

= menghambat

Ekstrak metanol Akar Tambolekar (*Coptosapelta flavescens* Korth) (EMAT) bila terbukti beraktivitas meng antagonis reseptor kolinergik, maka ACh yang dilepas baik oleh saraf parasimpatis maupun oleh sel-sel epitel dan sel inflamasi tidak dapat mengaktifkan reseptor kolinergik, akibatnya tidak terjadi kontraksi. Bila EMAT beraktivitas mengantagonis reseptor histamin, maka mediator inflamasi awal histamin yang dilepas sel mast tidak dapat berinteraksi dengan reseptor histamin, akibatnya tidak terjadi kontraksi. Bila EMAT beraktivitas menstimulasi reseptor beta₂ adrenergik, maka akan terjadi relaksasi.

EMAT sebagai antiinflamasi fase awal, menghambat respon inflamasi akut seperti vasodilatasi, ekstravasasi cairan serta pembentukan edema, akibatnya volume edema yang terbentuk berkurang dan mencegah inflamasi selanjutnya.

EMAT sebagai antiinflamasi fase awal, juga meningkatkan integritas membran sel, yang diwakili oleh sel darah merah yang analog dengan sel mast, dan lisosom, menstabilkan membran sel, sehingga tidak terjadi lisis pada eritrosit, menghambat influx Ca²⁺ pada sel mast atau lisosom, akibatnya pelepasan histamin dan isi lisosom dihambat dan mencegah inflamasi selanjutnya.

3.2 Hipotesis

3.2.1 Hipotesis Umum

Hipotesis dalam penelitian ini adalah terdapat aktivitas bronkorelaksasi dan antiinflamasi pada ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescens* Korth)

3.2.2 Hipotesis Khusus

1. Terdapat aktivitas bronkorelaksasi ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescens* Korth) melalui:

- a. antagonis reseptor kolinergik
- b. antagonis reseptor histamin
- c. agonis reseptor beta₂ adrenergik

2. Terdapat aktivitas anti-inflamasi ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescens* Korth) melalui hambatan volume edema kaki tikus yang diinduksi carrageenan dengan mekanisme menghambat



3. Terdapat aktivitas anti-inflamasi ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavesrens* Korth) melalui stabilisasi membran Red Blood Cell (RBC) tikus

mediator inflamasi fase awal (histamin, serotonin, bradikinin) dan fase lanjut (Prostaglandin)

Universitas Brawijaya

PENELITIAN TAHAP 1:**UJI AKTIVITAS BRONKORELAKSASI EKSTRAK METANOL AKAR TAMBOLEKAR (*Coptosapelta flavescens* Korth) SECARA IN VITRO MELALUI RESEPTOR KOLINERGIK, RESEPTOR HISTAMIN DAN BETA₂ ADRENOSEPTOR****4.1 Pendahuluan Tahap 1**

Akar Tambolekar (*Coptosapelta flavescens* Korth) yang digunakan masyarakat Kaltim untuk mengatasi sesak napas, belum ada data ilmiah yang membuktikan penggunaannya sebagai bronkodilator. Mekanisme kerja bronkodilator dapat melalui beberapa reseptor diantaranya agonis beta₂ adrenoseptor, antagonis reseptor kolinergik (muskarinik), antagonis reseptor histamin.

Uji mekanisme aktivitas bronkorelaksasi ini dilakukan dengan menggunakan otot polos bronkus guinea pig secara *invitro* (Albuquerque et al., 2016). Model uji mekanisme aksi bronkorelaksasi secara *invitro* pada umumnya menggunakan organ terpisah hewan guinea pig atau tikus. Namun untuk menguji efek antagonis pada reseptor histamin dan reseptor kolinergik digunakan guinea pig karena reseptor histamin dan kolinergik terdapat di otot polos saluran napas guinea pig, dan respon farmakologi pada guinea pig mirip dengan manusia. Sementara pada hewan tikus tidak ada reseptor histamin. Disamping itu reseptor pada bronkus sama dengan reseptor di otot polos seluruh saluran napas, sehingga otot polos bronkus dapat mewakili otot polos saluran napas yang lain (Zosky and Sly, 2007).

Tujuan penelitian tahap 1 ini menguji mekanisme aktivitas bronkorelaksasi ekstrak metanol akar Tambolekar (*Coptosapelta flavescens* Korth) melalui antagonis reseptor kolinergik dan reseptor histamin serta agonis reseptor beta₂ adrenergik.

4.2 Metode Penelitian Tahap 1

4.2.1 Rancangan Penelitian Tahap 1

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium, dengan rancangan *Post Test Control Group*. Percobaan dengan menggunakan organ cincin bronkus terpisah *guinea pig* yang satu sisinya dikaitkan pada alat *Transducer isometrik* pada *isolated organ bath*, sisi lainnya dihubungkan dengan *recorder* di komputer (Albuquerque et al., 2016). Uji bronkorelaksasi ini dikelompokkan menjadi 3 eksperimen:

1. Mengkaji efek bronkorelaksasi melalui antagonis reseptor kolinergik.

Cincin bronkus dalam *organ bath* diinkubasi dengan larutan ekstrak metanol akar tambolekar (EMAT) 3 konsentrasi selama 10 menit, dikontraksi dengan metakolin dosis kumulatif. Atropin sulfat (AS) sebagai kontrol positif dan pelarut ekstrak sebagai kontrol negatif.

2. Mengkaji efek bronkorelaksasi melalui antagonis reseptor histamin

Cincin bronkus dalam *organ bath* diinkubasi dengan larutan EMAT 3 konsentrasi selama 10 menit, dikontraksi dengan histamin dosis kumulatif. Chlorpheniramine Maleate (CTM) sebagai kontrol positif dan pelarut ekstrak sebagai kontrol negatif.

3. Mengkaji efek bronkorelaksasi melalui agonis reseptor beta₂ adrenergik

Cincin bronkus dalam *organ bath* diinkubasi dengan larutan propranolol 30 μM dengan konsentrasi selama 10 menit, diprekontraksi dengan Metakolin dosis tunggal lalu diberi dosis kumulatif EMAT. Pelarut ekstrak sebagai kontrol negatif.

4.2.2 Tempat dan Waktu Penelitian Tahap 1

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman pada bulan Juli 2017. *Ethical Clearance* diperoleh dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman.

4.2.3 Populasi dan Sampel Penelitian Tahap 1

4.2.3.1 Populasi

Guinea pig yang berasal dari laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman, dengan kriteria: Kelamin jantan, usia 6 – 8 minggu dengan berat badan 300 – 400 gram, sehat yang ditandai dengan bulu bersih dan tampak aktif.

4.2.3.2 Jumlah Sampel

Besar sampel ditentukan dengan rumus Federer:

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

dimana n = jumlah pengulangan

t = jumlah perlakuan

Jumlah perlakuan = 5,

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

$$n \geq 4,75$$

Jadi setiap perlakuan pada masing-masing kondisi dibutuhkan guinea pig paling sedikit 5 ekor, pada penelitian ini dilakukan pengulangan 6 ekor. Jadi jumlah seluruh guinea pig 90 ekor.

4.2.4 Alat dan Bahan Penelitian Tahap 1

4.2.4.1 Alat dan Bahan untuk Ekstraksi Simplicia Akar Tambolekar

Alat: Timbangan digital, botol 2 liter, gelas ukur, rotary evaporator, penyedot vakum, stoples kecil, oven dengan suhu 50⁰ C.

Bahan: Akar Tambolekar diameter 1 – 4 cm, dari kabupaten Paser yang dibuat serbuk simplicia (bahan utama), Metanol pa, Heksan pa, Etil asetat pa, DMSO, Etanol pa.

4.2.4.2 Alat dan Bahan untuk Preparasi Bronkus Guinea pig

Alat: Gunting jaringan, pinset, sputit 3 ml, 20 ml, cawan pitri, pipet mikro 10, 20, 100 µl, Timbangan digital, pH meter, beker gelas, labu ukur 2 liter, pengaduk termometer, seperangkat bejana bioassay dengan pemanas, alat pencatat Power Lab/16SP (*AD Instruments*), *Isolated organ bath* (Ugo Basile), *Transducer Isometrik*, *PC Window* dengan program *Microsoft Office 2007*, *AD Instrument Chart5 for Window* serta *Sigmastat*.

Bahan: Ketamin injeksi 50 mg/ml, NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄, KH₂PO₄, NaHCO₃, Glukosa (Merck), aquadest, aquabidest, Histamin, Metakolin, Atropin, CTM, propranolol. Ekstrak metanol akar tambolekar.

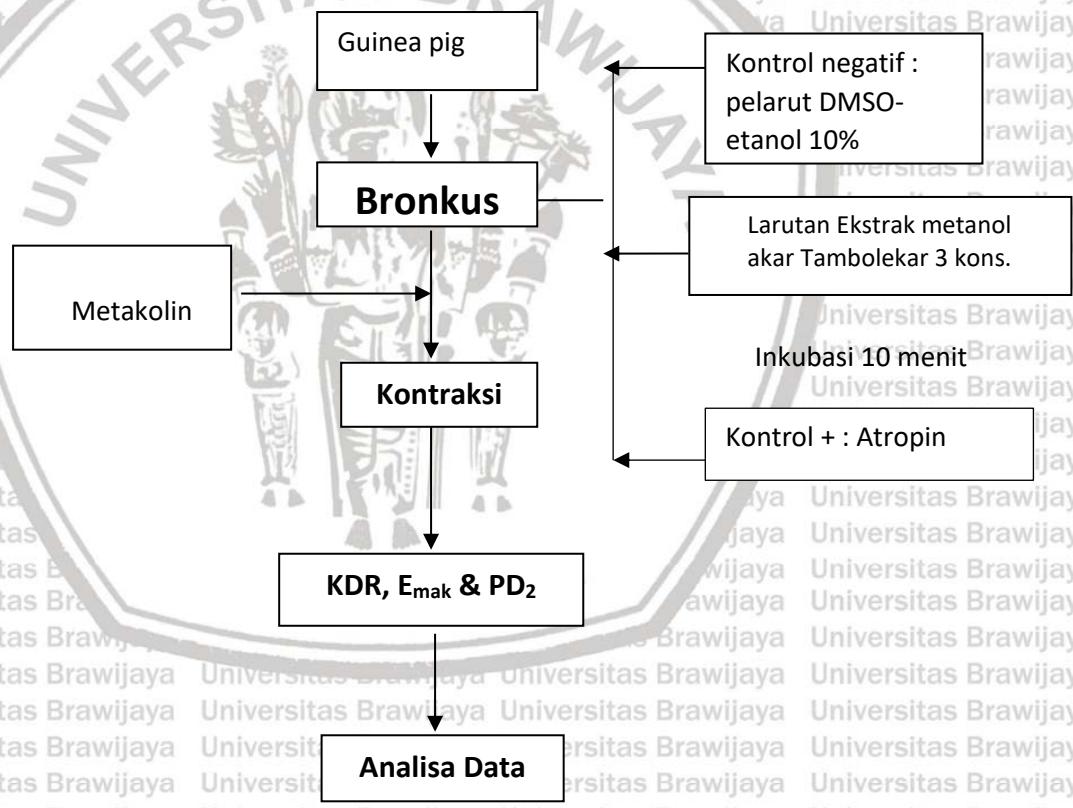
4.2.5 Variabel Penelitian Tahap 1

Variabel Bebas

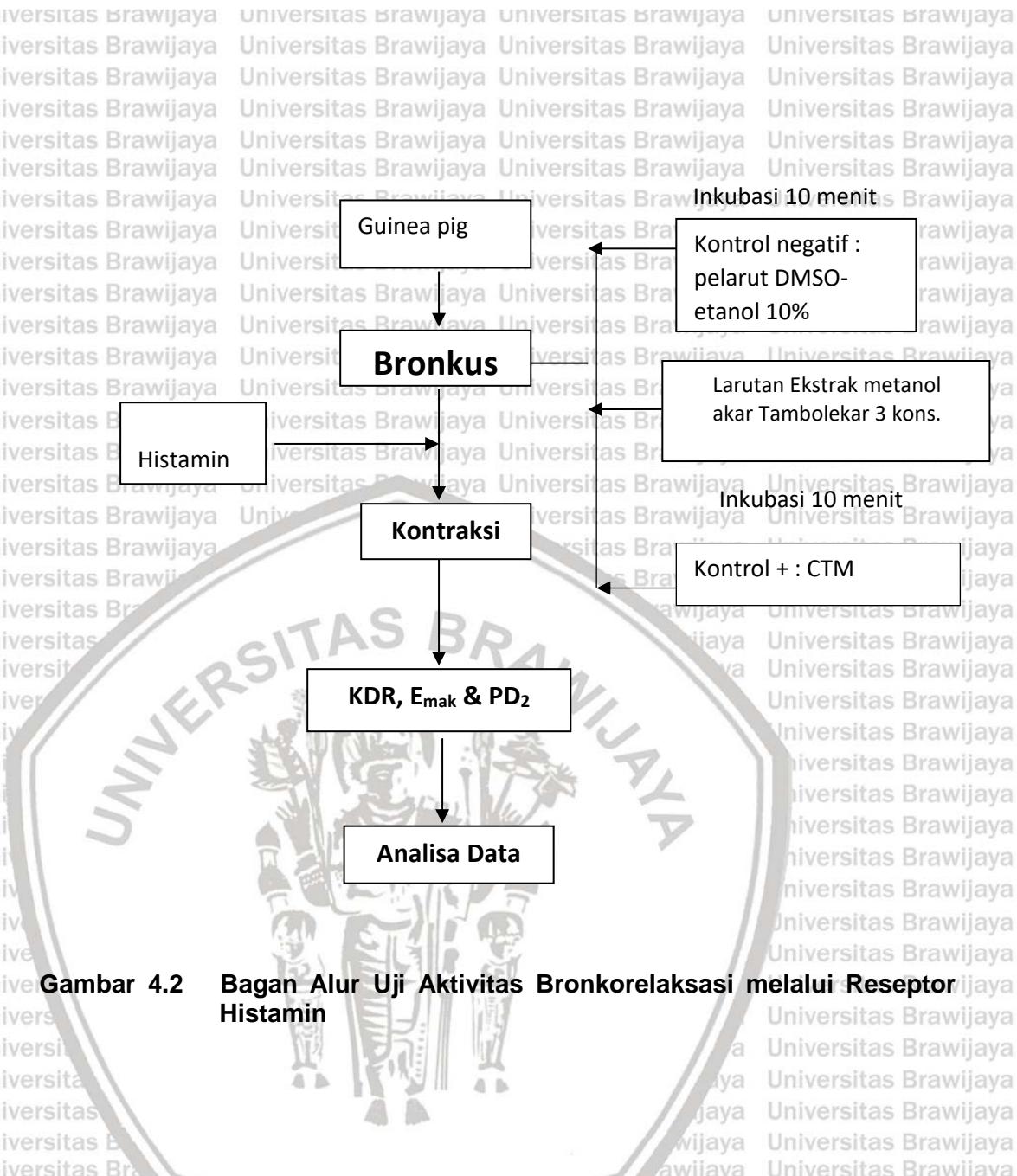
Konsentrasi larutan ekstrak metanol akar Tambolekar, konsentrasi pelarut ekstrak (kontrol negatif), konsentrasi larutan Atropin sulfat (AS), larutan CTM

sebagai kontrol positif, konsentrasi larutan Propranolol, konsentrasi larutan metakolin, konsentrasi larutan histamin. Respon relaksasi atau kontraksi cincin bronkus terpisah *guinea pig*, E_{maks} dan pD_2 dari ekstrak metanol akar tambolekar pada ketiga kondisi eksperimen

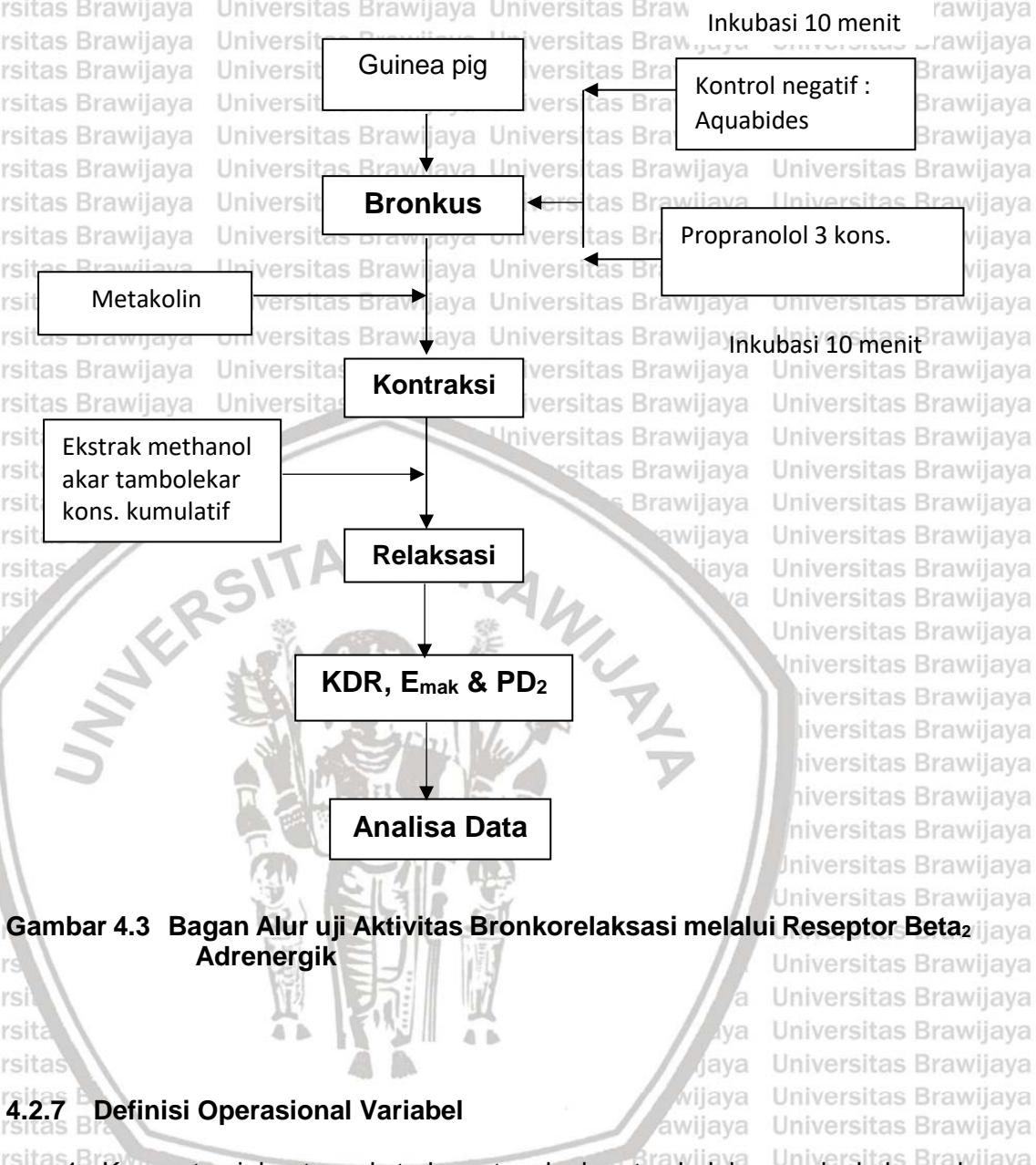
4.2.6 Alur Penelitian Tahap 1



Gambar 4.1 Bagan Alur Uji Aktivitas Bronkorelaksasi melalui Reseptor Kolinergik



Gambar 4.2 Bagan Alur Uji Aktivitas Bronkorelaksasi melalui Reseptor Histamin



Gambar 4.3 Bagan Alur uji Aktivitas Bronkorelaksasi melalui Reseptor Beta₂ Adrenergik

4.2.7 Definisi Operasional Variabel

1. Konsentrasi larutan ekstrak metanol akar tambolekar pada kelompok eksperimen a) merupakan 3 konsentrasi 10%, 20% dan 30% dari ekstrak metanol akar Tambolekar dalam pelarut dimetil-sulfoksida (DMSO)-etanol 10% yang ditambahkan dalam organ *bath*, sehingga diperoleh konsentrasi akhir 2, 4 dan 6 mg/ml.

2. Konsentrasi larutan ekstrak metanol akar tambolekar pada kelompok eksperimen b) merupakan 3 konsentrasi 10%, 15% dan 20% dari ekstrak

metanol akar Tambolekar dalam pelarut DMSO-etanol 10% yang ditambahkan dalam *organ bath*, sehingga diperoleh konsentrasi akhir 2, 3 dan 4 mg/ml.

3. Konsentrasi kumulatif larutan ekstrak metanol akar tambolekar pada kelompok eksperimen c) merupakan 7 konsentrasi kumulatif 0,32; 0,56; 1; 1,78; 3,2; 5,6 dan 10 mg/ml dari ekstrak metanol akar Tambolekar dalam pelarut DMSO-etanol 10% yang ditambahkan dalam *organ bath*.

4. Kontrol negatif berupa pelarut DMSO-etanol 10%.

5. Konsentrasi metakolin merupakan larutan metakolin dalam aquabidest dengan konsentrasi dari 10^{-7} sampai 10^{-1} M.

6. Konsentrasi Histamin merupakan larutan histamin dalam aquabidest dengan konsentrasi 10^{-7} sampai 10^{-1} M.

7. Konsentrasi Propranolol merupakan larutan propranolol dengan 3 konsentrasi $0,5 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, dan $1,5 \mu\text{M}$ yang dilarutkan dalam aquabidest

8. Konsentrasi atropine $2 \mu\text{M}$ merupakan larutan atropin sulfat dengan konsentrasi $2 \mu\text{M}$ yang dilarutkan dalam aquabidest

9. Konsentrasi CTM $1 \mu\text{M}$ merupakan larutan CTM konsentrasi $1 \mu\text{M}$ yang dilarutkan dalam aquabidest

10. Respon kontraksi atau relaksasi cincin bronkus merupakan peningkatan atau penurunan tonus otot polos bronkus yang terukam pada komputer dan tercatat sebagai Δg . Besarnya respon dinyatakan dalam persen (%) kontraktilitas otot polos bronkus yang merupakan hasil bagi dari besarnya respon tonus otot polos (Δg) dengan besarnya respon kontraksi maksimum dikali 100.

$$\% \text{ Kontraktilitas} = \frac{\Delta g}{\text{Kontraksi maksimal pemberian histamin atau metakolin}} \times 100$$

11. Nilai E_{maks} merupakan nilai tonus maksimum bronkus dalam persen yang dicapai setelah pemberian metakolin atau histamin atau ekstrak dengan dosis kumulatif.

12. Nilai pD_2 merupakan minus logaritma konsentrasi ekstrak yang menimbulkan 50% efek dari nilai E_{maks} .

4.2.8 Prosedur Kerja

4.2.8.1 Pembuatan Larutan Ekstrak metanol akar Tambolekar dan bahan obat

Ekstrak metanol akar Tambolekar dibuat dengan melakukan maserasi 300 g sebuk akar Tambolekar kering dalam pelarut metanol pada selama 5 hari sambil dikocok, setelah disaring, residu ditambah metanol pada selama 3 hari sambil diaduk-aduk, hal serupa dilakukan sampai filtrat jernih. Semua filtrat dikumpulkan dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai tersisa massa kental, lalu di masukkan dalam oven 50° C sampai terbentuk ekstrak kental dengan kadar air < 10%, dan disimpan dalam kulkas suhu 4° C sampai siap digunakan.

Pembuatan larutan ekstrak metanol akar tambolekar (EMAT) dalam pelarut DMSO-etanol 10% : EMAT dilarutkan dalam pelarut DMSO-etanol 10% dalam aquabidest sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 10, 15, 20 dan 30% (lihat lampiran 3)

Atropin sulfat dilarutkan dalam aquabidest sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 10^{-4} M (lihat lampiran 4)

Propranolol dilarutkan dalam aquabidest sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 5×10^{-5} M, 10^{-4} M dan 15×10^{-5} M (lihat lampiran 5)

CTM dilarutkan dalam aquabidest sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 10^{-4} M (lihat lampiran 6)

Metakolin dilarutkan dalam aquabidest sehingga diperoleh larutan stok Metakolin dengan konsentrasi 10^{-1} M. Dari larutan stok Metakolin diencerkan

sampai diperoleh konsentrasi mulai 10^{-2} sampai 10^{-7} M. Cara pembuatan larutan stok Metakolin dan konsentrasi lain dapat dilihat pada lampiran 7.

Histamin dilarutkan dalam aquabidest sehingga diperoleh larutan stok Histamin dengan konsentrasi 10^{-1} M. Dari larutan stok Histamin disencerkan sampai diperoleh konsentrasi 10^{-2} sampai 10^{-7} M. Cara pembuatan larutan stok Histamin dan konsentrasi lain dapat dilihat pada lampiran 8.

4.2.8.2 Pembuatan Larutan Kreb's-Henseleit

Larutan Kreb's-Henseleit merupakan cairan fisiologi yang dipergunakan dalam *isolated organ bath*. Komposisi Larutan Kreb's-Henseleit mengandung (mM): NaCl 118, KCl 4,7, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 24, Glukosa 11, (Ismail, 2003). Aquabidest digunakan untuk melarutkan. Cara pembuatan larutan Kreb's-Henseleit dapat dilihat pada lampiran 9. Larutan kemudian diaerasi dengan gas carbogen (O₂ 95% dan CO₂ 5%), pH larutan dibuat 7,4.

4.2.8.3 Preparasi Organ Terpisah Cincin Bronkus

Guinea pig yang akan diambil bronkusnya di puaskan selama 12 jam, dianestesi dengan menyuntikkan ketamin, kemudian didislokasi lehernya. Pembedahan dilakukan dengan membuka abdomen dan thorak hingga terlihat paru-parunya. Setelah paru-paru beserta trachea diseksi, diletakkan dalam cawan pitri yang berisi larutan Kreb's-Henseleit dan dibersihkan dari jaringan sekitarnya.

Lalu paru-paru dipotong sampai terlihat cabang bronkus, setelah bronkus diambil, dipotong sepanjang 4 mm dan di masukkan dalam organ bath 10 ml yang berisi larutan Kreb's-Henseleit dengan pH 7,4 dan suhu 37°C serta dialiri gas carbogen. Salah satu ujung cincin bronkus dihubungkan dengan *tissue holder* dari kawat stainless dan ujung lainnya dipasang pada *transducer isometrik* dengan tonus 1

gram yang dihubungkan pada alat pencatat *Power Lab, AD Instrument Program*

Chart v.5. Perubahan tonus kontraktilitas cincin bronkus pada komputer tercatat dalam gram.

4.2.8.4 Perlakuan terhadap Organ Terpisah Cincin Bronkus

1. Uji aktivitas bronkorelaksasi melalui antagonis reseptor kolinergik

Sebelum perlakuan, cincin bronkus dibiarkan dalam larutan Kreb's-Henseleit selama 60 menit untuk ekuilibrasi, sambil setiap 15 menit sekali larutan diganti dengan larutan Kreb's-Henseleit yang baru. Setelah tercapai ekuilibrasi masukkan larutan EMAT 200 μ l 10%, 200 μ l 20% dan 200 μ l 30% selama 10 menit, dikontraksikan dengan metakolin dosis kumulatif (lihat lampiran 10). Sebagai kontrol positif digunakan atropine 200 μ l 10^{-4} M (konsentrasi 2 μ M) dan kontrol negative pelarut DMSO-etanol 10% 100 μ l dan aquabidest 100 μ l.

2. Uji aktivitas bronkorelaksasi melalui antagonis reseptor histamin

Perlakuan sama dengan no 1. Setelah tercapai ekuilibrasi larutan EMAT yang diberikan 200 μ l 10%, 200 μ l 15% dan 200 μ l 20%, dikontraksi dengan menggunakan histamin dosis kumulatif (lihat lampiran 11). Sebagai kontrol positif menggunakan CTM 100 μ l 10^{-4} M (konsentrasi 1 μ M).

3. Uji aktivitas bronkorelaksasi melalui reseptor beta₂ adrenergik

Prosedur kerja sama dengan nomor 1 diatas dengan menginkubasi bronkus dengan Propranolol 3 konsentrasi 0,5 μ M (100 μ l 5×10^{-5} M), 1 μ M (100 μ l 10^{-4} M) dan 1,5 μ M (100 μ l 15×10^{-5} M) selama 10 menit, dikontraksikan dengan metakolin 10^{-3} dosis tunggal, diberi konsentrasi kumulatif EMAT (lihat lampiran 12).

Sebagai kontrol negative aquabides 100 μ l dan pelarut DMSO-etanol 10%.

4.2.8.5 Perhitungan persen kontraksi atau relaksasi

Untuk menghitung persen kontraksi atau relaksasi cincin bronkus ditentukan dari besarnya respon tonus dibagi dengan besarnya respon kontraksi maksimal lalu dikali 100. Tanda positif menunjukkan kontraksi, tanda negatif menunjukkan relaksasi. Selanjutnya dibuat kurva dosis-respon (KDR) yakni kurva dari log konsentrasi terhadap persen kontraksi/relaksasi cincin bronkus untuk setiap perlakuan.

4.2.9 Analisa Data

Data disajikan dalam bentuk mean \pm s.e.m. Respon kontraksi / relaksasi cincin bronkus dan konsentrasi disajikan dalam bentuk kurva dosis-respon (KDR).

Dari kurva ($20\text{-}80\% E_{\max}$) dibuat persamaan regresi linear sehingga diperoleh EC50 (Range, et al, 2016), serta pD₂ (-log EC50) masing-masing perlakuan. Semua data dianalisis dengan menggunakan *oneway analysis of variance* (ANOVA), dimana terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik bila ($P<0,05$).

PENELITIAN TAHAP 2:**UJI AKTIVITAS ANTI-INFLAMASI EKSTRAK METANOL AKAR TAMBOLEKAR
(*Coptosapelta Flavescens* KORTH) MELALUI HAMBATAN VOLUME EDEMA
KAKI TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI CARRAGEENAN****4.3 Pendahuluan Tahap 2**

Secara tradisional akar tambolekar digunakan oleh masyarakat selain untuk mengobati sesak, juga digunakan untuk mengobati sakit gigi (Mulyoutami, et al, 2009), rematik (Tran and Tran, 2010). Sel mast pada keadaan inflamasi apapun seperti sakit gigi dan rematik, merupakan sel yang melepaskan berbagai mediator inflamasi setelah teraktivasi. Contoh mediator kimia termasuk amina vasoaktif (histamin, serotonin), yang dilepas pada fase awal proses inflamasi, asam arakidonat (prostaglandin, leukotrien) dan sitokin (tumor nekrosis factor dan interleukin-1) yang dilepas pada fase inflamasi selanjutnya (Abd-Allah et al, 2018).

Dengan induksi *carrageenan* dapat diketahui bahan uji beraktivitas menghambat pelepasan histamin, serotonin dan bradikinin di fase awal, dan menghambat terbentuknya prostaglandin difase lambat (Zhang, et al, 2013). Oleh sebab itu model induksi *carrageenan* pada kaki tikus umum digunakan untuk menguji aktivitas antiinflamasi bahan obat maupun ekstrak tanaman (Paramita, et al, 2017).

Untuk mengevaluasi lebih jauh mekanisme antiinflamasi EMAT, maka pada penelitian tahap 2 ini dilakukan kajian aktivitas antiinflamasi EMAT pada fase awal respon inflamasi akut akibat pelepasan histamin oleh sel mast, dengan menghambat edema yang terjadi. Oleh sebab itu dipilih model induksi *carrageenan* pada kaki tikus. Bila aktivitas antiinflamasi EMAT yang diuji terjadi pada fase awal setelah injeksi *carrageenan* bisa dianalogkan EMAT berefek menghambat reaksi inflamasi awal (edema) yang disebabkan oleh mediator inflamasi histamin dan serotonin yang dilepas oleh sel mast. Bila aktivitas antiinflamasi EMAT yang diuji

terjadi pada fase selanjutnya setelah induksi carrageenan, dapat diindikasikan EMAT berefek menghambat pembentukan prostaglandin. Pada tahap 2 ini sekaligus ingin mengetahui EMAT berefek profilaksis atau terapeutik. Oleh sebab itu pemberian EMAT pada tikus dilakukan satu jam sebelum, saat dan satu jam setelah induksi *carrageenan*. Tujuan penelitian tahap 3 adalah :

- Menguji hambatan volume edema telapak kaki tikus Wistar pada pemberian ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescens* Korth) satu jam sebelum induksi *carrageenan*
- Menguji hambatan volume edema telapak kaki tikus pada pemberian ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescens* Korth) saat induksi *carrageenan*
- Menguji hambatan volume edema telapak kaki tikus pada pemberian ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescens* Korth) satu jam setelah induksi *carrageenan*

4.4 Metode Penelitian Tahap 2

4.4.1 Rancangan Penelitian Tahap 2

Penelitian tahap 2 ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan *pre dan post-test control group design*. Penelitian di kelompokkan menjadi 3 eksperimen yakni:

- Pemberian EMAT dilakukan satu jam sebelum induksi *carrageenan*
- Pemberian EMAT dilakukan saat induksi *carrageenan*
- Pemberian EMAT dilakukan satu jam sesudah induksi *carrageenan*

Sampel dibagi 5 kelompok yang terdiri dari masing-masing 5 tikus jantan Wistar seperti pada table 4.1 dibawah ini.

Tabel 4.1 Pembagian kelompok perlakuan

No.	Kelompok	Perlakuan
1	K- = kontrol negatif	Beri CMC 0,5% 1 ml po
2	K+ = kontrol positif	Beri Indometasin 20 mg/kg BB po
3	EMAT1 = EMAT dosis1	Beri Ekstrak Metanol Akar Tambolekar 300 mg/KgBB po
4	EMAT2 = EMAT dosis2	Beri Ekstrak Metanol Akar Tambolekar 600 mg/KgBB po
5	EMAT3 = EMAT dosis3	Beri Ekstrak Metanol Akar Tambolekar 1200 mg/KgBB po

4.4.2 Tempat dan Waktu Penelitian Tahap 2

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman pada bulan Agustus 2017 *Ethical Clearance* diperoleh dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman.

4.4.3 Populasi dan Sampel Penelitian Tahap 2

4.4.3.1 Populasi

Tikus Wistar yang berasal dari laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman, dengan kriteria: Kelamin jantan, usia 6 – 8 minggu dengan berat badan 200 – 300 gram, sehat yang ditandai dengan bulu bersih dan tampak aktif.

4.4.3.2 Jumlah Sampel Tahap 2

Besar sampel ditentukan dengan rumus Federer: $(n - 1) (t - 1) \geq 15$

dimana $n =$ jumlah pengulangan

$t =$ jumlah perlakuan

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

$$n \geq 4,75$$

Setiap perlakuan dibutuhkan tikus paling sedikit 5 ekor, Jadi jumlah seluruh tikus 75 ekor.

4.4.4 Alat dan Bahan Tahap 2

Alat : Kandang tikus, Spuit 3 ml dengan ujung tumpul, *Plethysmometer* (Ugo Basile)

Bahan : Ekstrak metanol akar tambolekar, Indometasin, CMC, *carrageenan*,

4.4.5 Variabel Penelitian Tahap 2

Variabel Bebas

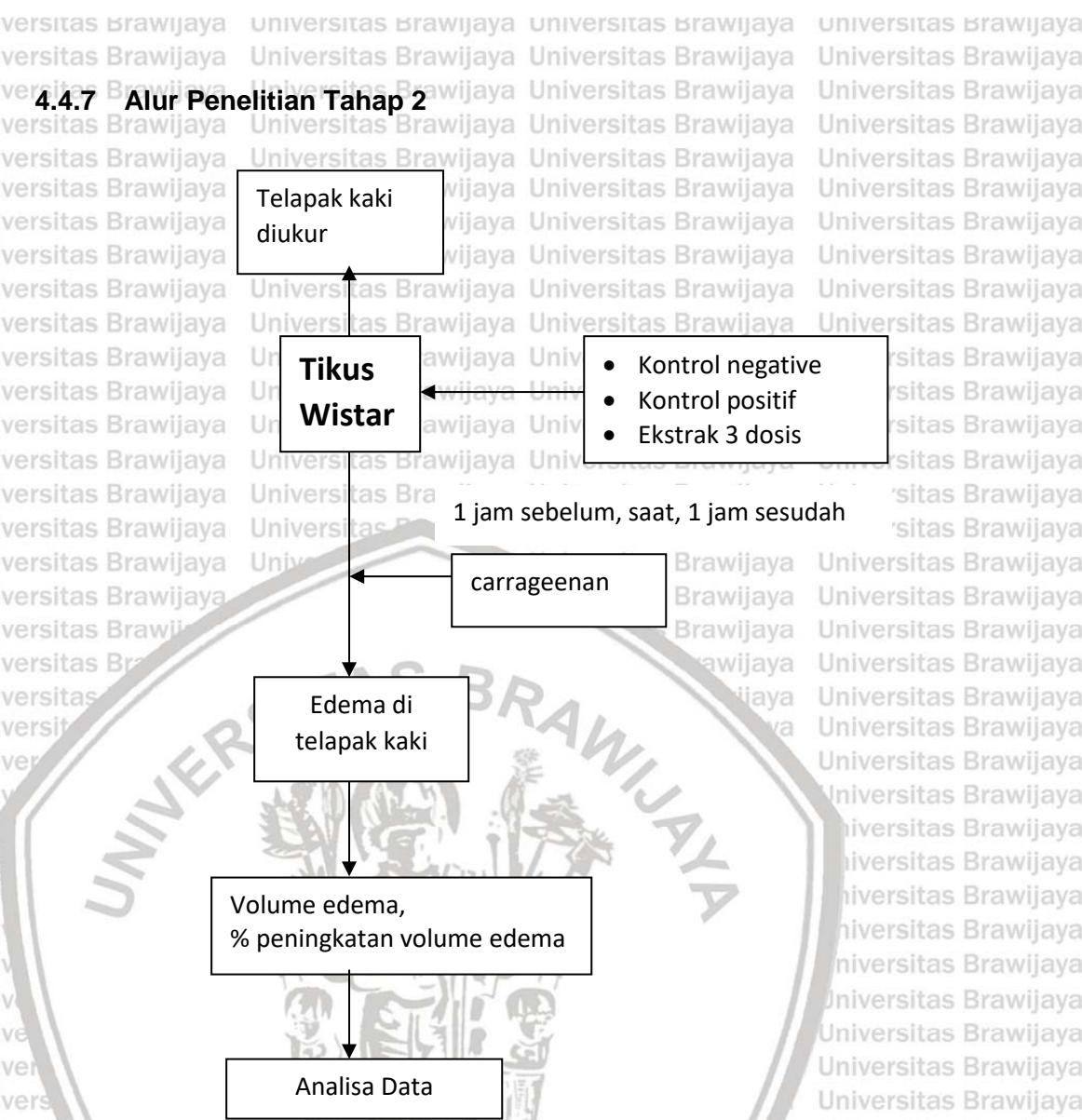
Dosis ekstrak metanol akar tambolekar, dosis kontrol positif dan control negatif.

Variabel Tergantung

Volume telapak kaki tikus yang dinyatakan dalam persen peningkatan edema

4.4.6 Definisi Operasional Variabel

1. Dosis ekstrak metanol akar tambolekar merupakan dosis yang diberikan pada tikus per oral terdiri dari dosis1 300 mg/kg BB, dosis2 600 mg/kg BB dan dosis3 1200 mg/kg BB.
2. Dosis kontrol positif merupakan dosis indometasin 20 mg/kg BB yang diberikan pada tikus secara oral.
3. Dosis kontrol negative merupakan dosis pelarut ekstrak CMC 0,5% sebanyak 1 ml yang diberikan pada tikus per oral.
4. Volume telapak kaki tikus merupakan volume edema telapak kaki tikus yang diukur dengan menggunakan alat *Plethysmometer*.



Gambar 4.4 Bagan Alur Uji Aktifitas Antiinflamasi melalui Hambatan Volume Edema Kaki Tikus yang Diinduksi Carrageenan

4.4.8 Prosedur Kerja Tahap 2

4.4.8.1 Pembuatan Larutan Ektrak metanol akar Tambolekar dan bahan obat

Pembuatan larutan EMAT dalam pelarut CMC 0,5% : EMAT yang sudah ditimbang sesuai berat badan tikus dilarutkan dengan tween 20 beberapa tetes, lalu ditambah CMC 0,5% 1 ml aduk sampai homogen.

Indometasin yang sudah ditimbang sesuai berat badan tikus dilarutkan dengan tween 20 beberapa tetes, lalu ditambah CMC 0,5% 1 ml aduk sampai homogen.

Carrageenan 100 mg dilarutkan dalam 10 ml normal salin, aduk sampai homogen.

4.4.8.2 Perlakuan pada Tikus

Sebelum perlakuan tikus dipuaskan makan selama 18 jam, akses minum tetap diberi. Volume telapak kaki kiri diukur.

1. Pada eksperimen a tikus diberi bahan uji ekstrak 3 dosis, Indometasin dan CMC 0,5% peroral. Satu jam kemudian telapak kaki kiri diinjeksi 0,1 ml *carrageenan* 1% secara subkutan, lalu diukur volume kaki kiri tikus.
2. Pada eksperimen b tikus diberi bahan uji ekstrak 3 dosis, Indometasin dan CMC 0,5% peroral, lalu telapak kaki tikus segera diinjeksi 0,1 ml *carrageenan* 1% secara subkutan, dan diukur volume kaki kiri tikus.
3. Pada eksperimen c telapak kaki tikus diinjeksi 0,1 ml *carrageenan* 1% secara subkutan, diukur volume kaki kiri tikus, 1 jam kemudian tikus diberi bahan uji ekstrak 3 dosis, Indometasin dan CMC 0,5% peroral, diukur volume edema kaki tikus.

Selanjutnya setiap jam dilakukan pengukuran volume edema telapak kaki hingga jam ke enam, dan diukur lagi setelah jam ke 24.

Pada tiap kelompok dihitung persen peningkatan volume edema dengan rumus berikut: $100 \times (V_1 - V_0)/V_0$, dimana V_1 adalah volume edema telapak kaki tikus setelah induksi *carrageenan*, V_0 adalah volume edema telapak kaki tikus sebelum induksi *carrageenan* (George et al., 2014; Shaikh et al., 2016).

4.4.9 Analisa Data

Data disajikan sebagai mean \pm s.e.m. Persen peningkatan volume edema yang diperoleh dari masing-masing kelompok perlakuan dianalisis dengan menggunakan one-way ANOVA dan Tukey test, dimana terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik bila ($P < 0,05$).



PENELITIAN TAHAP 3:**UJI AKTIVITAS ANTI-INFLAMASI EKSTRAK METANOL AKAR TAMBOLEKAR
(*Coptosapelta Flavescens* Korth) MELALUI STABILISASI MEMBRAN RED
BLOOD CELL (RBC) TIKUS YANG DI INDUKSI HIPOTONISAS****4.5 Pendahuluan Tahap 3**

Dari hasil penelitian tahap 1 diketahui ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescens* Korth) mempunyai efek bronkorelaksasi melalui reseptor kolinergik, reseptor histamin dan beta₂ adrenoseptor. Pelepasan mediator inflamasi oleh sel mast pada asma alergi diinisiasi oleh terikatnya antigen pada 2 molekul IgE yang terikat pada reseptor FcεRI di permukaan sel mast. Karena terjadi influx Ca²⁺ dari ekstraseluler masuk ke sel mast, menyebabkan membran sel mast tidak stabil, sehingga memudahkan pelepasan mediator inflamasi yang tersimpan dalam granul sel mast. Sifat ini juga merupakan sifat lisosom yang melepaskan isinya dengan adanya influx Ca²⁺, yang mengakibatkan membran lisosom tidak stabil (Krystel-Whittemore, et al., 2016). Untuk menghambat influx Ca²⁺, diperlukan agen yang bersifat menstabilkan membran sel (Sano, et al., 2006).

Pada kondisi inflamasi lain, seperti invasi bakteri, infiltrasi leukosit terjadi selama respon inflamasi karena perannya sebagai bagian dari pertahanan tubuh terhadap inflamasi. Sel-sel ini melepaskan isi lisosomnya, seperti enzim bakterisida dan protease, yang menyebabkan kerusakan jaringan dan inflamasi lebih lanjut. Cedera pada membran sel meningkatkan kerentanan sel terhadap kerusakan sekunder oleh radikal bebas yang dihasilkan oleh peroksidasi lipid dan memicu pelepasan fosfolipase A2 (PLA2) (Umaphathy, et al., 2010). PLA2 merupakan enzim yang memotong fosfolipid menghasilkan *lysophospholipid* dan asam lemak bebas, Asam Arakidonat (AA). PLA2 berperan penting dalam proses inflamasi. Dengan menghambat pelepasan PLA2 maka inflamasi baik melalui jalur

asam arakidonat (AA) maupun melalui jalur nonAA dapat dihambat. Penghambatan PLA2 bisa menjadi agen terapeutik yang poten untuk menyembuhkan penyakit inflamasi manusia (Yoon and Baek, 2005). Akar Tambolekar yang berefek anti-inflamasi diduga melaksanakan aktivitas antiinflamasinya juga melalui stabilisasi membran sel, baik membran lisosom maupun sel mast. Untuk membuktikan dugaan tersebut, pada penelitian tahap 3 dilakukan uji stabilisasi membran sel pada EMAT. Bila terbukti EMAT berefek menstabilkan membran sel, maka akar Tambolekar berpotensi sebagai anti-inflamasi baik pada asma alergi, maupun inflamasi lain dengan mekanisme menghambat influx Ca^{2+} dan menghambat PLA2.

Model untuk menguji stabilisasi membran sel pada umumnya menggunakan model stabilisasi membran sel darah merah atau *red blood cell* (RBC). Membran RBC memiliki karakteristik yang mirip dengan komposisi membran lisosom. Meskipun struktur kimia membran sel dan sifatnya bervariasi dari satu lokasi ke yang lain, mereka memiliki fitur umum tertentu yakni terdiri dari fosfolipid seperti phosphatidylcholine, phosphotidylserine, dan phosphatidylethanolamine; protein seperti protein integral dan protein perifer; serta skelton membran seperti spektrin pada eritrosit dan Dystrophin pada membran sel otot polos (Barret, et al, 2012). Penghambatan hemolis RBC digunakan untuk mengukur aktivitas anti-inflamasi dari bahan obat, termasuk ekstrak tanaman (Umapathy et al., 2010). Senyawa dengan sifat menstabilkan membran dapat menjadi pelindung signifikan membran sel dari bahan toksik dan gangguan reaksi inflamasi fase awal melalui penghambatan pembentukan mediators inflamasi (Kumar et al, 2011).

Pada penelitian tahap 3 ini dipilih model stabilisasi membran RBC tikus. Bila terbukti EMAT beraktivitas menstabilkan membran RBC yang analog dengan

lisosom, maka dapat dianalog pula EMAT dapat menghambat degranulasi sel mast dan mencegah pelepasan histamin, dan sekaligus dapat menghambat PLA₂ sehingga proses inflamasi dapat dihambat.

4.6 Metode Penelitian Tahap 3

4.6.1 Rancangan Penelitian Tahap 3

Penelitian tahap 3 ini merupakan penelitian eksperimental yang mengukur nilai absorbansi hasil hemolisis membran *Red Blood Cell* (RBC) tikus Wistar yang diberi berbagai konsentrasi larutan ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescens* Korth) (EMAT) dengan kontrol positif menggunakan Indometasin dan kontrol negatif buffer fosfat. Persen proteksi Stabilitas membran sel dihitung sebagai berikut:

$$\% \text{ Hemolisis} = (\text{kerapatan optik sampel uji} / \text{kerapatan optik Control}) \times 100$$

$$\% \text{ proteksi} = 100 - [(\text{kerapatan Optik sampel uji} / \text{kerapatan optik Control}) \times 100]$$

4.6.2 Tempat dan Waktu Penelitian Tahap 2

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman pada bulan September 2017. *Ethical Clearance* diperoleh dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman.

4.6.3 Jumlah Sampel Tahap 3

Besar sampel sesuai dengan jumlah konsentrasi larutan ekstrak metanol akar tambolekar dengan pengulangan 3 kali.

4.6.4 Alat dan Bahan Penelitian Tahap 3

Alat : tabung reaksi, oven inkubasi, penangas air dengan suhu 56°C, alat fortex.

Bahan : Ekstrak metanol akar tambolekar, Indometasin, Na sitrat, NaCl 0,9%, Na₂HPO₄, KH₂PO₄

4.6.5 Variabel Penelitian

Variabel Bebas

Konsentrasi larutan ekstrak metanol akar tambolekar, dosis kontrol positif

dan kontrol negatif.

Variabel Tergantung

Nilai absorbansi yang dibaca pada panjang gelombang 560 nm pada ijaya

spektrofotometer

4.6.6 Definisi Operasional Variabel

1. Konsentrasi larutan ekstrak metanol akar tambolekar merupakan ekstrak

metanol akar tambolekar yang dilarutkan dalam pelarut DMSO 10% dan bufer

fosfat, yang kemudian diencerkan menjadi 6 konsentrasi.

2. Dosis Indometasin merupakan dosis larutan Indometasin yang dilarutkan

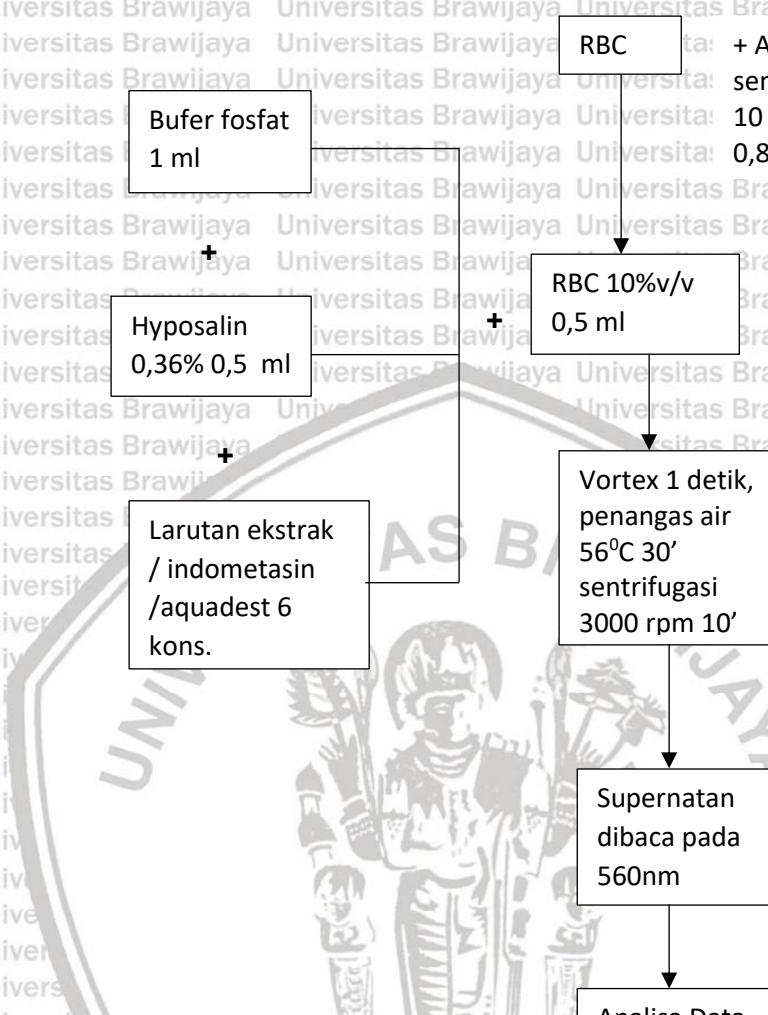
dalam pelarut DMSO 10% dan bufer fosfat, yang kemudian diencerkan menjadi 6 ijaya

konsentrasi.

3. Nilai absorbansi merupakan nilai absorbansi yang terbaca pada ijaya

spektrofotometer 560 nm setelah terjadi hemolis.

4.6.7 Alur Penelitian Tahap 3



Gambar 4.5 Bagan Alur Uji Aktivitas Antiinflamasi Melalui Stabilisasi Membran RBC

4.6.8 Prosedur Kerja

4.6.8.1 Pembuatan Larutan Ektrak metanol akar Tambolekar dan bahan obat

Pembuatan larutan EMAT dalam pelarut buffer fosfat : EMAT yang sudah ditimbang dilarutkan dalam pelarut DMSO 10% kemudian ditambah larutan buffer fosfat sehingga diperoleh konsentrasi stok 10 mg/ml, lencarkan sehingga diperoleh konsentrasi 67,5, 135, 270, 540, 1080 dan 2160 µg/ml (lihat lampiran 13).

Indometasin yang sudah ditimbang dilarutkan dalam pelarut DMSO 10% kemudian ditambahkan larutan fosfat sehingga diperoleh konsentrasi stok 50 mg/ml, encerkan sehingga diperoleh konsentrasi 0,338, 0,675, 1,35, 2,7, 5,4 dan 10,8 mg/ml (lihat lampiran 13).

Hiposalin 0,36% diperoleh dengan melarutkan NaCl 0,9% 40 ml dengan aquabides steril sampai 100 ml.

Larutan buffer fosfat 0,15 M pH 7,4 dibuat dengan mencampurkan 76 ml 0,15 M Na₂HPO₄ (2,1294 g dalam 100 ml aquabides steril) dengan 24 ml 0,15 M KH₂PO₄ (2,0413 g dalam 100 ml aquabides steril), dengan mengatur pH 7,4.

4.6.8.2 Persiapan Suspensi Red Blood Cell (RBC)

Darah segar tikus Wistar dikumpulkan dan dicampur dengan volume yang sama Alsever solution steril (2% dextrose, 0,8% sodium sitrat, 0,05% asam sitrat dan 0,42% natrium klorida dalam air). Darah disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit dan sel-sel dicuci tiga kali dengan isosaline (0,85%, pH 7,2). Volume darah dibuat kembali menjadi 10% v/v suspensi dengan isosaline.

Hemolisis yang diinduksi cairan hipotonis

Campuran bahan uji yang berisi 1 ml buffer fosfat [pH 7,4, 0,15 M], 0,5 ml hiposaline [0,36%], 0,5 ml RBC suspensi [10% v/v] dengan 0,5 ml ekstrak berbagai konsentrasi dan obat standar indometasin berbagai konsentrasi dan kontrol (aquabides menggantikan hiposaline untuk menghasilkan 100% hemolisis) diinkubasi pada suhu 56° C selama 30 menit dalam penangas air dan disentrifugasi masing-masing pada 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 560 nm.

Menghitung persen proteksi stabilitas membran:

$$\% \text{ proteksi} = 100 - [(\text{kerapatan Optik sampel uji} / \text{kepadatan optik Control}) \times 100]$$

4.6.9 Analisa Data

Data disajikan sebagai mean \pm s.e.m. Persen proteksi stabilitas membran RBC yang diperoleh dari masing-masing kelompok perlakuan dianalisis dengan t-test, dimana terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik bila ($P<0,05$).



universitas brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
BAB 5

HASIL PENELITIAN

PENELITIAN TAHAP 1:

UJI AKTIVITAS BRONKORELAKSASI EKSTRAK METANOL AKAR TAMBOLEKAR (*Coptosapelta flavesrens* Korth) SECARA IN VITRO MELALUI RESEPTOR KOLINERGIK, RESEPTOR HISTAMIN DAN BETA₂ ADRENOSEPTOR

5.1. Hasil Penelitian Tahap 1

5.1.1 Hasil Rendemen Ekstrak Metanol Akar Tambolekar

Rendemen ekstrak metanol akar tambolekar yang diperoleh dari 300 g

simplisia akar Tambolekar adalah 65,84 g sama dengan 21,94%

5.1.2 Hasil Uji Aktivitas Bronkorelaksasi EMAT Melalui antagonis

Reseptor Kolinergik

Penelitian tahap ini mengkaji efek EMAT (*C. flavesrens* Korth) terhadap

kontraksi cincin bronkus yang diinduksi metakolin. Tabel 5.1 menunjukkan E_{maks}

dan pD_2 yang dihasilkan dari persen kontraksi cincin bonkus guinea pig yang

diinkubasi pelarut ekstrak (DMSO-etanol 10%) sebagai kontrol negatif (KN),

Ekstrak Metanol Akar Tambolekar 10% (EMAT10), 20%(EMAT20), 30%(EMAT30)

dan Atropin Sulfat 2 μ M (AS) sebagai kontrol positif, lalu diberi dosis kumulatif

metakolin (Met) (Lampiran 13). Kurva Dosis Respon (KDR) yang dihasilkan seperti

pada gambar 5.1, terlihat KDR Met-EMAT10, KDR Met-EMAT20 dan KDR Met-

EMAT30 bergeser kekanan dibandingkan KDR Met-KN. Hal ini menunjukkan

EMAT mempunyai aktivitas menghambat kontraksi cincin bronkus yang diinduksi

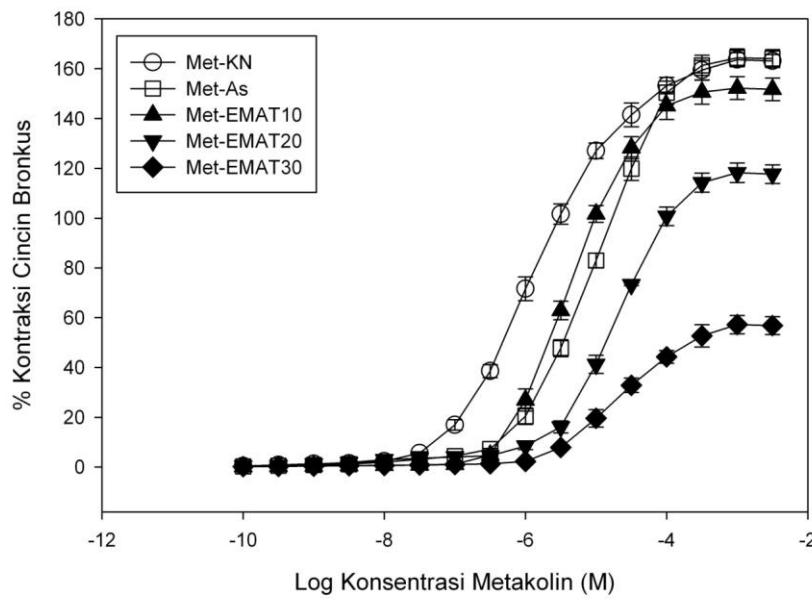
metakolin, mengindikasikan EMAT berefek mengantagonis reseptor kolinergik.

Pada tabel 5.1 E_{maks} pada Met-EMAT10 dengan konsentrasi dalam

chamber 2 mg/ml ($152,220\% \pm 2,310$; $p=0,002$) , E_{maks} pada Met-EMAT20 dengan

konsentrasi dalam chamber 4 mg/ml ($118,230\% \pm 1,935$; $p < 0,001$) dan E_{max} pada Met-EMAT30 dengan konsentrasi dalam chamber 6 mg/ml ($57,186\% \pm 1,829$; $p < 0,001$) lebih kecil dan berbeda bermakna dibandingkan E_{max} pada Met-KN ($163,614\% \pm 1,422$), E_{max} pada Met-AS sebagai kontrol positif ($164,359\% \pm 1,722$; $p = 0,999$) tidak berbeda bermakna dibandingkan E_{max} pada Met-KN (Gambar 5.2). Hal ini menunjukkan aktivitas EMAT10, EMAT20 dan EMAT30 mengantagonis reseptor kolinergik bersifat nonkompetitif, sementara AS mengantagonis reseptor kolinergik bersifat kompetitif.

Cincin bronkus diinkubasi dengan 3 konsentrasi EMAT

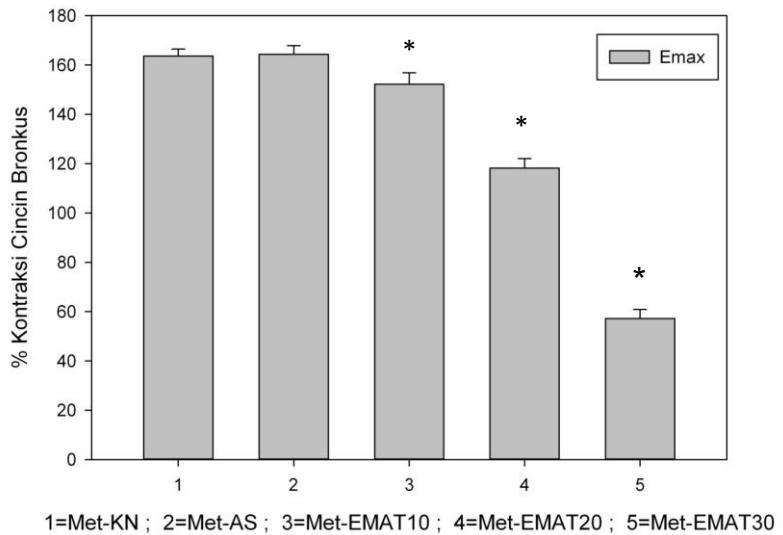


Gambar 5.1 Kurva Dosis Respon Cincin Bronkus guinea pig yang di inkubasi EMAT 3 konsentrasi dan diberi Metakolin dosis kumulatif.
Met-KN = metakolin-Kontrol negatif, cincin bronkus diinkubasi pelarut Ekstrak ; Met-EMAT10 = cincin bronkus diinkubasi EMAT 10%; Met-EMAT20 = cincin bronkus diinkubasi dengan EMAT 20%; Met-EMAT30 = cincin bronkus diinkubasi EMAT 30%; met-AS = cincin bronkus diinkubasi Atropin sulfat 2 μ M n = 6 ekor guinea pig; dianalisa dengan ANOVA dan Tukey test dengan $p < 0,05$ berbeda bermakna

Tabel 5.1 E_{maks} dan pD_2 Cincin Bronkus yang di Inkubasi EMAT 3 Konsentrasi dan diberi Metakolin Dosis Kumulatif

Log Kons	Persen Kontraksi Cincin Bronkus yang diberi metakolin																		
	Met-KN (%)			Met-AS 2 μ M (%)			Met-EMAT10 (%)			Met-EMAT 20 (%)									
	Mean	SEM	Mean	SEM	P	Mean	SEM	P	Mean	SEM	P	Mean							
Emak	163,614	\pm	1,422	164,359	\pm	1,772	0,999	152,220*	\pm	2,310	0,002	118,230*	\pm	1,935	<0,001	57,186*	\pm	1,829	<0,001
EC50	1,7E-06	\pm	8E-08	0,00000934*	\pm	3E-07	<0,001	0,00000495*	\pm	1E-07	0,004	0,0000187*	\pm	3E-07	<0,001	0,000024*	\pm	1E-06	<0,001
pD_2	5,772	\pm	0,022	5,031*	\pm	0,016	<0,001	5,307*	\pm	0,012	<0,001	4,728*	\pm	0,007	<0,001	4,622*	\pm	0,020	<0,001

Keterangan : Met-KN = Cincin bronkus diinkubasi pelarut ekstrak ; Met-EMAT10 = Cincin bronkus diinkubasi Ekstrak Metanol Akar Tambolekar 10% konsentrasi akhir 2 mg/ml; Met-EMAT20 = cincin bronkus inkubasi EMAT 20% konsentrasi akhir 4 mg/ml ; Met-EMAT30 = cincin bronkus dilinkubasi EMAT 30% konsentrasi akhir 6 mg/ml Met-AS = cincin bronkus diinkubasi Atropin Sulfat 2 μ M ; n = 6 ekor guinea pig, data dianalisa dengan ANOVA dan Tukey Test dengan p<0,05, yang bertanda * berbeda bermakna terhadap met-KN



Gambar 5.2 E_{\max} Cincin Bronkus Guinea pig yang di Inkubasi EMAT 3 Konsentrasi dan diberi Metakolin Dosis Kumulatif.

Met-KN = Kontrol negatif, cincin bronkus diinkubasi Pelarut Ekstrak; Met-EMAT10 = cincin bronkus diinkubasi EMAT 10%; Met-EMAT20 = cincin bronkus diinkubasi dengan EMAT 20%; Met-EMAT30 = cincin bronkus diinkubasi EMAT 30%; Met-AS = cincin bronkus diinkubasi Atropin sulfat 2 μ M

n = 6 ekor guinea pig; dianalisa dengan ANOVA dan Tukey test dengan $p < 0,05$

Yang bertanda * berbeda bermakna terhadap Met-KN

Potensi reseptor kolinergik terhadap EMAT diindikasikan oleh nilai pD_2 , pD_2

pada Met-AS ($5,031 \pm 0,016$; $P < 0,001$), Met-EMAT10 ($5,307 \pm 0,012$; $P < 0,001$), Met-EMAT20 ($4,728 \pm 0,007$; $P < 0,001$) dan Met-EMAT30 ($4,622 \pm 0,020$; $P < 0,001$), lebih kecil dan berbeda bermakna dibandingkan pD_2 Met-KN ($5,772 \pm 0,022$) (Tabel 5.1), hal ini menunjukkan adanya potensi reseptor kolinergik

terhadap EMAT sebagai antagonis kolinergik. Makin besar konsentrasi EMAT makin kecil nilai pD_2 , ini menjelaskan bahwa makin besar konsentrasi EMAT yang

menduduki reseptor kolinergik, makin lemah potensi reseptor terhadap agonis

metakolin yang menimbulkan kontraksi, karena dihambat EMAT.

5.1.3 Hasil Uji Aktivitas Bronkorelaksasi EMAT Melalui antagonis Reseptor Histamin (H_1)

Hasil uji ini mengkaji efek EMAT (*C. flavesrens* Korth) terhadap kontraksi cincin bronkus yang diinduksi histamin. Tabel 5.2 menunjukkan E_{maks} dan pD_2 yang dihasilkan dari persen kontraksi cincin bonkus guinea pig yang diinkubasi pelarut ekstrak DMSO-etanol 10% sebagai kontrol negatif (KN), EMAT 10%(EMAT10), 15%(EMAT15), 20%(EMAT20) dan Chlorpheniramin Maleat (CTM) 1 μ M sebagai kontrol positif, lalu diberi dosis kumulatif histamin (Lampiran 20). KDR yang dihasilkan seperti pada gambar 5.3, terlihat KDR His-EMAT10, KDR His-EMAT15 dan KDR His-EMAT20 bergeser kekanan dibandingkan KDR His-KN. Hal ini menunjukkan EMAT mempunyai aktivitas menghambat kontraksi cincin bronkus yang diinduksi histamin, dan mengindikasikan efek EMAT mengantagonis reseptor histamin.

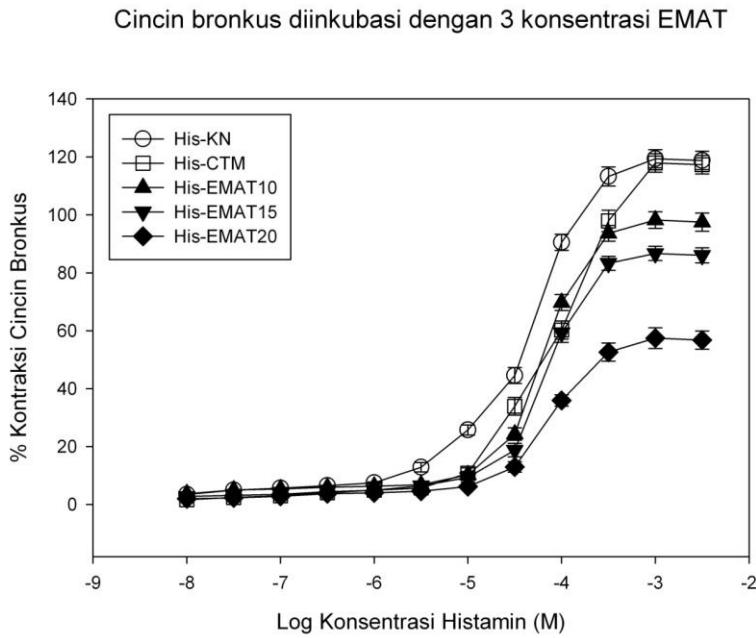
Pada tabel 5.2 E_{maks} pada His-EMAT10 ($98,223\% \pm 1,429$; $P<0,001$), His-EMAT15 ($86,684\% \pm 1,239$; $p<0,001$) dan His-EMAT20 ($57,445\% \pm 1,792$; $p<0,001$) lebih kecil dan berbeda bermakna ($P<0,05$) dibandingkan E_{maks} pada His-KN ($119,356\% \pm 1,567$). E_{maks} pada His-CTM ($117,924\% \pm 1,622$; $P=0,964$) tidak berbeda bermakna ($P>0,05$) dibandingkan E_{maks} pada His-KN (Gambar 5.4). Hal ini menunjukkan EMAT10, 15 dan 20% (konsentrasi dalam chamber 2, 3 dan 4 mg/ml) memiliki aktivitas mengantagonis reseptor histamin secara nonkompetitif, sementara CTM beraktivitas mengantagonis reseptor histamin secara kompetitif.

pD_2 pada His-CTM ($4,079 \pm 0,0131$; $p<0,001$), His-EMAT10 ($4,194 \pm 0,0076$; $p<0,001$), His-EMAT15 ($4,162 \pm 0,0118$; $P<0,001$) dan His-EMAT20 ($4,129 \pm 0,00867$; $P<0,001$) lebih kecil dan berbeda bermakna dibandingkan pD_2 pada His-KN ($4,393 \pm 0,0106$), hal ini menunjukkan potensi reseptor histamin terhadap agonis histamin yang menimbulkan kontraksi berkurang, karena adanya EMAT dan CTM yang menduduki reseptor histamin.

Tabel 5.2 E_{maks} dan pD_2 Cincin Bronkus yang di Inkubasi EMAT 3 Konsentrasi dan diberi Histamin Dosis Kumulatif

Log Kons	Persen Kontraksi Cincin Bronkus yang diinkubasi 3 konsentrasi EMAT dan diberi histamin dosis kumulatif														
	His-KN (%)			His-CTM 1 μ M (%)			His-EMAT10 (%)			His-EMAT 15 (%)			His-EMAT 20 (%)		
	Mean	\pm	SEM	Mean	\pm	SEM	P	Mean	\pm	SEM	P	Mean	\pm	SEM	P
Emak	119,356	\pm	1,567	117,924	\pm	1,622	0,964	98,223*	\pm	1,429	<0,001	86,684*	\pm	1,239	<0,001
EC50	4,1E-05	\pm	1E-06	0,0000836*	\pm	3E-06	<0,001	0,0000641*	\pm	1E-06	<0,001	0,0000641*	\pm	2E-06	<0,001
pD_2	4,393	\pm	0,0106	4,079*	\pm	0,0131	<0,001	4,194*	\pm	0,0076	<0,001	4,162*	\pm	0,0118	<0,001

Keterangan : His-KN = Histamin-Kontrol Negatif = Cincin bronkus diinkubasi pelarut ekstrak ; His-EMAT10 = Cincin bronkus diinkubasi Ekstrak Metanol Akar Tambolekar 10% konsentrasi akhir 2 mg/ml; His-EMAT15 = cincin bronkus diinkubasi EMAT 15% konsentrasi akhir 3 mg/ml ; His-EMAT20 = Cincin bronkus diinkubasi EMAT 20% konsentrasi akhir 4 mg/ml His-CTM = Cincin bronkus diinkubasi Chlorpheniramin Maleat 1 μ M (Kontrol Positif) ; n = 6 ekor guinea pig, data dianalisa dengan ANOVA dan Tukey Test dengan $p<0,05$, yang bertanda bintang berbeda bermakna terhadap His-KN

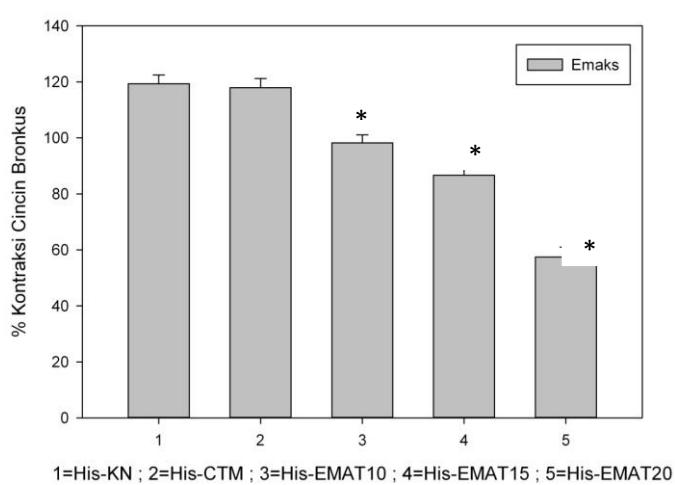


Gambar 5.3 Kurva Dosis Respon Cincin Bronkus Guinea pig yang di Inkubasi EMAT 3 Konsentrasi dan diberi Histamin Dosis Kumulatif.

His-KN = Histamin-Kontrol negatif, cincin bronkus diinkubasi pelarut Ekstrak ; His-EMAT10 = cincin bronkus diinkubasi EMAT 10% sehingga konsentrasi akhir 2 mg/ml; His-EMAT15 = cincin bronkus diinkubasi dengan EMAT 15%, konsentrasi akhir 3 mg/ml ; His-EMAT20 = Cincin bronkus diinkubasi EMAT 20%, konsentrasi akhir 4 mg/ml ; His-CTM = Cincin bronkus diinkubasi Chlorpheniramin Maleat 1 μ M

n = 6 ekor guinea pig; dianalisa dengan ANOVA dan Tukey test dengan p< 0,05

Makin besar konsentrasi EMAT yang menginkubasi cincin bronkus makin kecil nilai pD_2 , yang berarti makin besar konsentrasi EMAT yang menduduki reseptor histamin, makin kecil potensi reseptor histamin terhadap agonis histamin yang menginduksi kontraksi karena dihambat oleh EMAT.



Gambar 5.4 E_{maks} Cincin Bronkus Guinea pig yang di Inkubasi EMAT 3 Konsentrasi dan di beri Histamin Dosis Kumulatif.

Keterangan: His-KN = Histamin-Kontrol negatif, cincin bronkus diinkubasi pelarut Ekstrak; His-EMAT10 = cincin bronkus diinkubasi EMAT 10%; His-EMAT15 = cincin bronkus diinkubasi dengan EMAT 15%; His-EMAT20 = Cincin bronkus diinkubasi EMAT 20%; His-CTM = Cincin bronkus diinkubasi Chlorpheniramin Maleat 1 μM

$n = 6$ ekor guinea pig; dianalisa dengan ANOVA dan Tukey test dengan $p < 0,05$
Yang bertanda * berbeda bermakna terhadap His-KN

5.1.4 Hasil Uji Aktivitas Bronkorelaksasi EMAT melalui Agonis Reseptor β_2 Adrenergik

Beta₂ Adrenergik

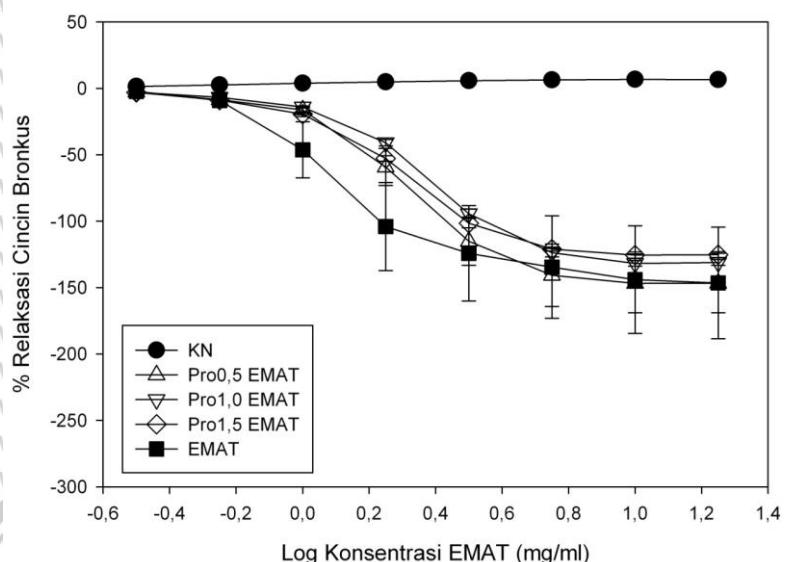
Uji ini mengevaluasi efek EMAT (*C. flavescens* Korth) terhadap bronkorelaksasi cincin bronkus yang dihambat oleh propranolol. Tabel 5.3 menunjukkan E_{maks} dan pD_2 yang dihasilkan dari persen relaksasi cincin bronkus guinea pig yang diinkubasi Propranolol (beta adrenergik bloker) konsentrasi 0,5 μM , 1,0 μM dan 1,5 μM , dan yang tidak diinkubasi propranolol, diprekontraksi dengan metakolin 2 μM lalu diberi EMAT dosis kumulatif (Lampiran 27). KDR yang dihasilkan terlihat pada gambar 5.5. Makin besar konsentrasi EMAT yang diberikan makin besar relaksasi cincin bronkus yang ditandai dengan tanda negatif, berarti terjadi bronkorelaksasi.

Tabel 5.3 E_{maks} dan pD₂ Cincin Bronkus yang di Inkubasi Propanolol 3 Konsentrasi, Prekontraksi Metakolin lalu diberi EMAT dibandingkan Terhadap Persen Relaksasi Cincin Bronkus tanpa Inkubasi Propranolol

Log Kons (mg/ml)	Persen relaksasi cincin bronkus sebelum dan sesudah diinkubasi Propranolol										
	EMAT (%)		Pro 0,5 EMAT (%)		Pro 1,0 EMAT (%)		Pro 1,5 EMAT (%)				
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	P	Mean	SEM	P	
Emak	-146,482	± 21,033	-146,792	± 11,135	-131,763	± 1,059	0,919	-125,414	± 1,172	0,717	
EC50	1,388*	± 0,104	2,008*	± 0,034	< 0,001	2,246*	± 0,0343	< 0,001	1,906*	± 0,023	< 0,001
pD ₂	-0,136*	± 0,0335	-0,302*	± 0,00734	< 0,001	-0,351*	± 0,0066	< 0,001	-0,280*	± 0,005	< 0,001

Keterangan: Pro0,5EMAT = Cincin bronkus diinkubasi Propanolol 0,5 μ M lalu diberi EMAT; Pro1,0EMAT = Cincin bronkus diinkubasi Propranolol 1,0 μ M lalu diberi EMAT; Pro1,5EMAT = Cincin bronkus diinkubasi propranolol 1,5 μ M lalu diberi EMAT; n = 6 ekor guinea pig; Setelah dianalisa dengan Anova dan tukey test dengan p< 0,05, yang bertanda * berbeda bermakna

Cincin bronkus diinkubasi dengan 3 konsentrasi Propranolol

**Gambar 5.5 Kurva Dosis-Respons Cincin Bronkus Guinea pig yang Tidak dan di Inkubasi dengan 3 Konsentrasi Propranolol**

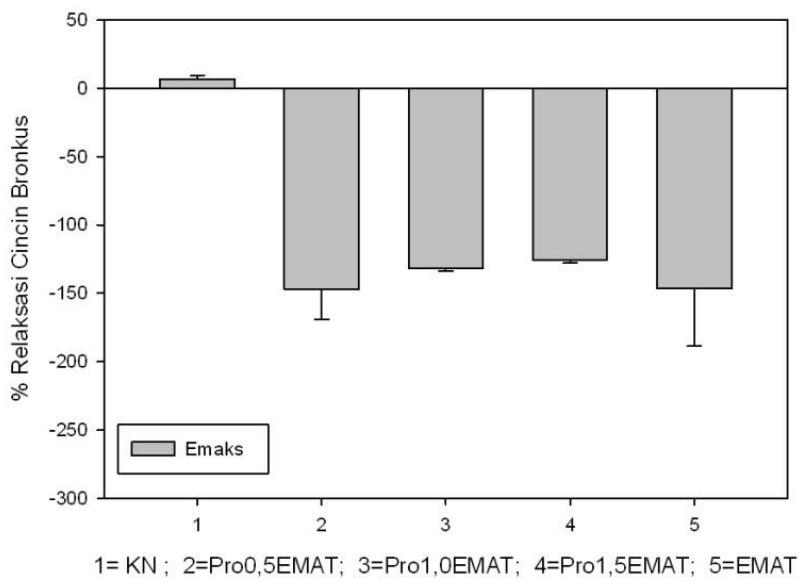
KN=kontrol negatif = Pelarut ekstrak; Pro 0,5 EMAT = Cincin bronkus diinkubasi Propranolol 0,5 μ M 30 menit lalu diberi EMAT; Pro 1 EMAT = cincin bronkus diinkubasi propranolol 1 μ M lalu diberi EMAT; Pro 1,5 EMAT = Cincin bronkus diinkubasi propranolol 1,5 μ M lalu diberi EMAT; EMAT= Cincin bronkus tidak diinkubasi propranolol, diberi EMAT
 $n=6$ ekor guinea pig, analisa data menggunakan ANOVA, $p<0,05$ tanda * dinyatakan berbeda bermakna



Ke tiga KDR pada Pro0,5EMAT, Pro1,0EMAT dan Pro1,5EMAT bergeser ke kanan dibandingkan dengan KDR EMAT (Gambar 5.5). Tabel 5.3 memperlihatkan pD_2 pada EMAT ($-0,136 \pm 0,0335$) lebih besar dan berbeda bermakna dibandingkan pD_2 pada EMAT yang diblok propranolol 0,5, 1,0 dan 1,5 μ M ($-0,302 \pm 0,00734$; $-0,351 \pm 0,0066$ dan $-0,280 \pm 0,0054$), dengan nilai p masing-masing $< 0,001$ ($P<0,05$), hal ini menunjukkan potensi reseptor beta₂-adrenergik terhadap EMAT makin kecil karena dihambat oleh propranolol.

Mengindikasikan EMAT beraktivitas di beta2 adrenoseptor.

E_{maks} pada Pro0,5EMAT ($-146,792\% \pm 11,135$; $P=1$), E_{maks} pada Pro1,0EMAT ($-131,763\% \pm 1,059$; $P=0,919$) dan E_{maks} pada Pro1,5EMAT ($-125,414\% \pm 1,172$; $P=0,717$) tidak berbeda bermakna ($P>0,05$) bila dibandingkan dengan E_{maks} pada EMAT ($-146,482\% \pm 21,033$) (Tabel 5.3 dan gambar 5.6). Hal ini menunjukkan terjadi kompetisi antara propranolol dan EMAT untuk menempati reseptor beta2 adrenergik, EMAT dapat menggeser propranolol sehingga mencapai respon maksimal seperti pada respon reseptor beta2 adrenergik yang tidak diblok propranolol. Ini mengindikasikan EMAT meng agonis beta2 adrenoseptor, dan sekaligus membenarkan propranolol sebagai antagonis kompetitif beta2 adrenoseptor.



Gambar 5.6 E_{maks} Cincin Bronkus Guinea pig yang Tidak dan di Inkubasi dengan 3 Konsentrasi Propranolol dan diberi Metakolin Dosis Tunggal diikuti EMAT Dosis Kumulatif.

KN = Kontrol negatif, cincin bronkus diinkubasi pelarut Ekstrak; Pro0,5EMAT=cincin bronkus diinkubasi propranolol 0,5 μM , diberi EMAT; Prop1,0EMAT = cincin bronkus diinkubasi dengan propranolol 1,0 μM , diberi EMAT; Prop1,5EMAT = Cincin bronkus diinkubasi propranolol 1,5 μM , diberi EMAT; EMAT = Cincin bronkus tidak diinkubasi propranolol, diberi EMAT

$n = 6$ ekor guinea pig; dianalisa dengan ANOVA dan Tukey test dengan $p<0,05$

PENELITIAN TAHAP 2:**UJI AKTIVITAS ANTI-INFLAMASI EKSTRAK METANOL AKAR TAMBOLEKAR
(*Coptosapelta Flavescens* KORTH) MELALUI HAMBATAN VOLUME EDEMA
KAKI TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI CARRAGEENAN****5.2 Hasil Penelitian Tahap 2****5.2.1 Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus dengan Pemberian****EMAT Satu Jam Sebelum Induksi Carrageenan**

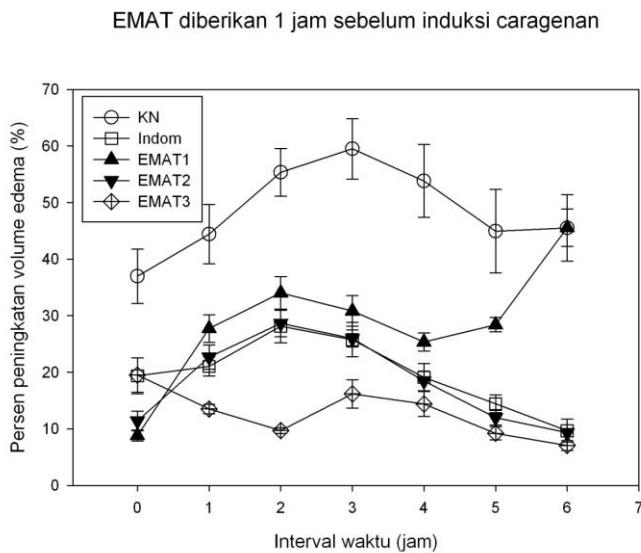
Tabel 5.4 menunjukkan persen peningkatan volume edema kaki tikus dengan pemberian EMAT dilakukan satu jam sebelum induksi Carrageenan, kurva yang dihasilkan seperti pada gambar 5.7.

Pada tabel 5.4 maupun gambar 5.7 terlihat persen peningkatan volume edema kaki tikus pada jam ke 0 sampai jam ke 5 baik EMAT1, EMAT2, EMAT3

dan Indom lebih kecil dan berbeda bermakna terhadap KN dengan $p<0,05$; pada jam ke 6 sesudah induksi carrageenan, persen peningkatan edema pada EMAT1

meningkat dan tidak berbeda terhadap KN ($P1 =1$), sementara pada EMAT2 dan EMAT3 lebih kecil dan berbeda bermakna terhadap KN ($P1<0,001$). Hal ini menunjukkan adanya aktivitas antiinflamasi pada EMAT1, EMAT2 dan EMAT3

yang diberikan satu jam sebelum induksi Carrageenan. Pada EMAT1 dengan dosis terkecil 300 mg/Kg BB setelah jam ke 6 tidak mempunyai aktivitas antiinflamasi, sedang EMAT2 dan EMAT3 dengan dosis 600 dan 1200 mg/Kg BB setelah jam ke 6 masih memiliki aktivitas antiinflamasi.



Gambar 5.7 Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus yang diinduksi Carrageenan, pemberian EMAT 1 jam Sebelum Induksi.

KN = Kontrol Negatif = CMC 5%; Indom= Indometasin 10 mg/Kg BB sebagai Kontrol Positif; EMAT1 = EMAT dosis 300 mg/KgBB; EMAT2 = EMAT dosis 600 mg/KgBB; EMAT3 = EMAT dosis 1200 mg/KgBB.

n = 5 ekor tikus, Analisa data menggunakan ANOVA dan Tukey test, dengan $p<0,05$ berbeda bermakna

Bila dibandingkan dengan kontrol positif Indometasin (Indom), diperoleh hasil pada jam ke 0 – 1, persen peningkatan volume edema pada EMAT1, EMAT2 dan EMAT3 tidak berbeda bermakna terhadap Indometasin dengan $P>0,05$, pada interval waktu jam ke 2 EMAT3 lebih kecil ($P = 0,002$) dan berbeda bermakna terhadap Indom, pada interval waktu jam ke 3 - 4 EMAT1, EMAT2 dan EMAT3 tidak berbeda bermakna terhadap Indom dengan $P>0,05$, pada interval waktu jam ke 5 - 6 EMAT1 lebih besar ($P<0,05$) dan berbeda bermakna terhadap Indom, EMAT2 dan EMAT3 ($P>0,05$) tidak berbeda bermakna terhadap Indom.

Tabel 5.4 Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus dengan Pemberian EMAT satu Jam Sebelum Induksi Carrageenan

Interval waktu	Persen peningkatan volume edema kaki tikus 1 jam sebelum induksi carrageenan diberi EMAT																					
	KN (%)			Indom (%)			EMAT1 (%)			EMAT2 (%)			EMAT3 (%)									
	Mean	±	SEM	Mean	±	SEM	P1	Mean	±	SEM	P1	P2	Mean	±	SEM	P1	P2					
0 jam	36,984	±	2,392	19,372*	±	1,579	<0,001	8,815*	±	0,502	<0,001	<0,001	11,399**	±	0,868	<0,001	0,011	19,512*	±	1,518	<0,001	1
1 jam	44,438	±	2,622	21,036*	±	0,845	<0,001	27,721*	±	1,234	<0,001	0,028	22,673*	±	1,071	<0,001	0,927	13,500**	±	0,421	<0,001	0,011
2 jam	55,367	±	2,100	28,138*	±	1,477	<0,001	34,050*	±	1,423	<0,001	0,055	28,641*	±	1,186	<0,001	0,999	9,684**	±	0,260	<0,001	<0,001
3 jam	59,523	±	2,662	25,752*	±	1,521	<0,001	30,852*	±	1,355	<0,001	0,218	25,974*	±	0,750	<0,001	1	16,167**	±	1,250	<0,001	0,004
4 jam	53,838	±	3,225	19,096*	±	1,225	<0,001	25,360*	±	0,807	<0,001	0,108	18,457*	±	0,859	<0,001	0,999	14,395*	±	1,088	<0,001	0,323
5 jam	44,959	±	3,685	14,438*	±	0,787	<0,001	28,400*	±	0,636	<0,001	<0,001	11,977*	±	0,650	<0,001	0,856	9,196*	±	0,576	<0,001	0,253
6 jam	45,529	±	2,940	9,657*	±	1,016	<0,001	45,585	±	1,657	1	<0,001	9,333*	±	0,703	<0,001	1	7,055*	±	0,438	<0,001	0,786
24 jam	22,974	±	2,681	3,873*	±	0,535	<0,001	11,763	±	1,038	<0,001	0,004	2,665*	±	0,384	<0,001	0,966	3,475*	±	0,427	<0,001	1

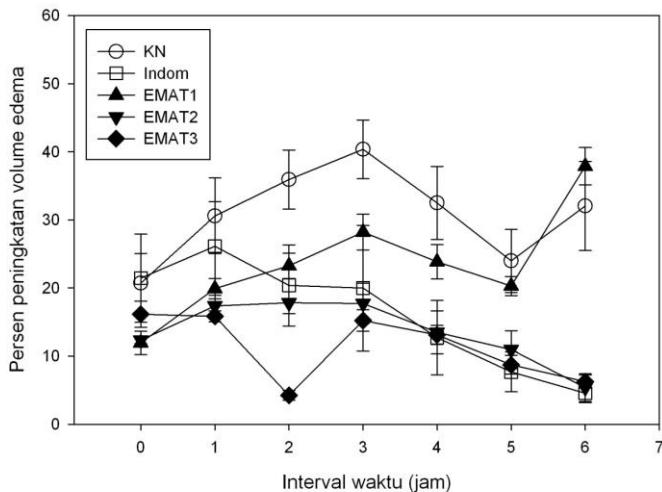
Keterangan: KN = Kontrol Negatif = CMC 0,5%; Indom = Indometasin 10mg/kg BB; EMAT1 = Ekstrak Metanol akar Tambolekar dosis 300 mg/KgBB; EMAT2 = dosis 600 mg/kgBB; EMAT3 = dosis 1200 mg/kgBB; n= 5 ekor tikus, dianalisa dengan ANOVA dan Tukey Test p<0,05, P1 analisa terhadap KN yang bertanda bintang * berbeda bermakna terhadap KN; P2 = analisa terhadap Indom, yang bertanda ° berbeda bermakna terhadap Indom

Hal ini menunjukkan kekuatan aktivitas antiinflamasi EMAT1 mulai interval jam ke 0 – 4 tidak berbeda dengan Indometasin, namun setelah jam ke 5 – 6 kekuatan antiinflamasi nya melemah dibandingkan Indometasin; Kekuatan aktivitas antiinflamasi EMAT2 tidak berbeda dengan Indometasin mulai interval jam ke 0 - 6 setelah induksi Carrageenan. Kekuatan aktivitas antiinflamasi EMAT3 pada interval jam ke 2 lebih besar dibandingkan Indometasin, namun setelah jam ke 3 - 6 mirip atau tidak berbeda dengan Indometasin.

5.2.2 Persen Peningkatan Volume Edema kaki Tikus dengan Pemberian

EMAT Pada Saat Induksi Carrageenan

EMAT diberi saat induksi caragenan



Gambar 5.8 Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus yang diinduksi Carrageenan, Pemberian EMAT pada Saat Induksi.

Keterangan: KN = Kontrol Negatif = CMC 5%; Indom= Indometasin 10 mg/Kg BB sebagai Kontrol Positif; EMAT1 = EMAT dosis 300 mg/KgBB; EMAT2 = EMAT dosis 600 mg/KgBB; EMAT3 = EMAT dosis 1200 mg/KgBB
n = 5 ekor tikus, Analisa data menggunakan ANOVA dengan p<0,05

Tabel 5.5 Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus, Saat Induksi Carrageenan diberi EMAT

Interval waktu	Persen peningkatan volume edema kaki tikus saat induksi carrageenan diberi EMAT																					
	KN (%)				Indom (%)				EMAT1 (%)				EMAT2 (%)				EMAT3 (%)					
	Mean	±	SEM	Mean	±	SEM	P1	Mean	±	SEM	P1	P2	Mean	±	SEM	P1	P2	Mean	±	SEM	P1	P2
0 jam	20,706	±	2,171	21,435	±	3,244	0,999	11,932 ^{**}	±	0,856	0,023	0,012	12,334 ^{**}	±	0,267	0,032	0,017	16,146	±	0,959	0,428	0,288
1 jam	30,583	±	2,777	26,134	±	3,276	0,525	19,896*	±	0,752	0,009	0,214	17,355 ^{**}	±	0,775	0,001	0,038	15,839 ^{**}	±	0,407	<0,001	0,012
2 jam	35,931	±	2,164	20,371*	±	2,979	<0,001	23,261*	±	0,927	<0,001	0,766	17,823*	±	0,793	<0,001	0,837	4,218 ^{**}	±	0,356	<0,001	<0,001
3 jam	40,357	±	2,154	19,979*	±	4,612	<0,001	28,208*	±	1,31	0,018	0,169	17,714*	±	1,491	<0,001	0,965	15,217*	±	0,791	<0,001	0,656
4 jam	32,489	±	2,674	12,720*	±	2,733	<0,001	23,834*	±	1,266	0,038	0,006	13,476*	±	1,579	<0,001	0,999	13,107*	±	0,692	<0,001	1
5 jam	23,971	±	2,327	7,674*	±	1,463	<0,001	20,290°	±	0,7	0,4	<0,001	10,943*	±	1,391	<0,001	0,515	8,712*	±	0,684	<0,001	0,986
6 jam	32,045	±	3,274	4,547*	±	0,699	<0,001	37,885°	±	1,365	0,146	<0,001	5,366*	±	1,018	<0,001	0,997	6,254*	±	0,475	<0,001	0,951
24 jam	12,019	±	1,63	4,733*	±	1,398	0,004	14,221°	±	1,348	0,711	<0,001	-0,436*	±	0,964	<0,001	0,051	5,256*	±	0,369	0,007	0,998

Keterangan: KN = Kontrol Negatif = CMC 0,5%; Indom = Indometasin 10mg/kg BB; EMAT1 = Ekstrak Metanol akar Tambolekar dosis 300 mg/KgBB; EMAT2 = dosis 600 mg/kgBB ; EMAT3 = dosis 1200 mg/kgBB; n= 5 ekor tikus, dianalisa dengan ANOVA dan Tukey Test p<0,05, P1 analisa terhadap KN yang bertanda bintang * berbeda bermakna terhadap KN; P2 = analisa terhadap Indom, yang bertanda ° berbeda bermakna terhadap Indom

Tabel 5.5 menunjukkan persen peningkatan volume edema kaki tikus dengan pemberian EMAT dilakukan pada saat induksi *Carrageenan*. Kurva yang dihasilkan seperti pada gambar 5.8. Persen peningkatan volume edema kaki tikus pada jam ke 0 EMAT1 dan EMAT2 berbeda bermakna ($P<0,05$), EMAT3 dan Indom tidak berbeda bermakna ($P>0,05$) dibandingkan KN. Pada interval waktu jam ke 1 - 6 persen peningkatan volume edema pada EMAT2 dan EMAT3 lebih kecil dan berbeda bermakna ($P<0,05$) dibandingkan KN. Untuk EMAT1 pada interval waktu jam ke 1 persen peningkatan volume edema lebih kecil namun tidak berbeda bermakna terhadap KN, pada interval waktu jam ke 2 - 3 persen peningkatan volume edema lebih kecil dan berbeda bermakna ($P<0,05$) terhadap KN, pada interval jam ke 4 - 6, persen peningkatan volume edema tidak berbeda bermakna ($P>0,05$) terhadap KN. Hal ini menunjukkan EMAT1 dengan konsentrasi 300 mg/KgBB yang diberikan saat diinduksi *Carrageenan*, menunjukkan adanya aktivitas antiinflamasi setelah interval jam ke 2 - 3, namun interval jam ke 4 - 6 EMAT1 tidak beraktivitas antiinflamasi. Beda dengan EMAT2 dan EMAT3 yang diberikan saat induksi *Carrageenan*, menunjukkan aktivitas antiinflamasi mulai interval waktu ke 1 - 6.

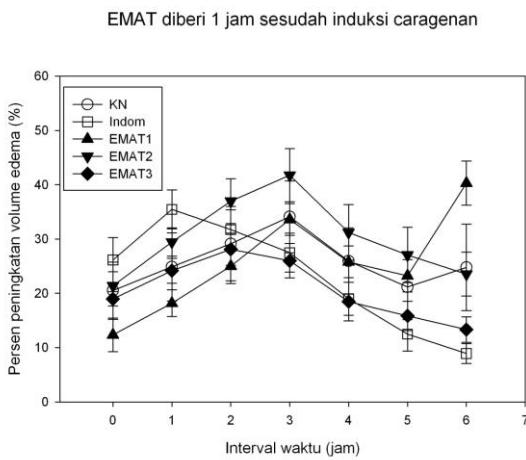
Perbandingan dengan kontrol positif Indometasin (Indom) menghasilkan

EMAT1 pada interval jam ke 0 - 4 ($P>0,05$) tidak berbeda bermakna terhadap Indom, pada interval jam ke 5 - 6 persen peningkatan volume edema lebih besar ($P<0,05$) dan berbeda bermakna terhadap Indom; EMAT2 pada interval jam ke 0 - 6 $P>0,05$ tidak ada perbedaan yang bermakna terhadap Indom; EMAT3 pada interval jam ke 0 - 1 $P>0,05$ tidak ada perbedaan yang bermakna terhadap Indom, pada interval jam ke 2 - 3 persen peningkatan volume edema lebih kecil ($P<0,05$) dan berbeda bermakna terhadap Indom, pada interval jam ke 4 - 6 $P>0,05$ tidak berbeda bermakna terhadap Indom. Hal ini menunjukkan aktivitas antiinflamasi EMAT1 yang diberikan saat induksi *Carrageenan* tidak berbeda dengan aktivitas

antiinflamasi Indometasin, namun setelah jam ke 5 aktivitas antiinflamasi melemah dibandingkan Indometasin. Aktivitas antiinflamasi EMAT2 yang diberikan saat induksi Carrageenan sama dengan kekuatan antiinflamasi Indometasin. Aktivitas antiinflamasi EMAT3 lebih kuat setelah interval jam ke 2 - 3 dibandingkan Indometasin, namun setelah jam ke 4 - 6 aktivitas antiinflamasi tidak berbeda dengan kekuatan antiinflamasi Indometasin.

5.2.3 Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus Dengan Pemberian EMAT Satu Jam Setelah Induksi Carrageenan

Tabel 5.6 menunjukkan persen peningkatan volume edema kaki tikus dengan pemberian EMAT dilakukan satu jam setelah induksi Carrageenan. Kurva yang dihasilkan seperti pada gambar 5.9.



Gambar 5.9 Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus yang diinduksi Carrageenan, pemberian EMAT 1 jam setelah Induksi.

Keterangan: KN = Kontrol Negatif = CMC 5%; Indom= Indometasin 10 mg/Kg BB sebagai Kontrol Positif; EMAT1 = EMAT dosis 300 mg/KgBB; EMAT2 = EMAT dosis 600 mg/KgBB; EMAT3 = EMAT dosis 1200 mg/KgBB
n = 3 ekor tikus, Analisa data menggunakan ANOVA dengan $p < 0,05$

Pada tabel 5.6 maupun gambar 5.9 terlihat persen peningkatan volume edema kaki tikus yang diberi EMAT1 dosis 300 mg/kg BB satu jam setelah induksi Carrageenan tidak berbeda bermakna terhadap KN sampai interval jam ke 5

($P1>0,05$), setelah jam ke 6 EMAT1 ($P1= 0,025 <0,05$) meningkat dan berbeda bermakna terhadap KN; Pada EMAT2 mulai interval jam ke 0 - 6 dengan $P1>0,05$ tidak berbeda bermakna terhadap KN; Pada EMAT3 sampai intervals jam ke 2 tidak berbeda bermakna terhadap KN, setelah jam ke 3 - 6 persen peningkatan volume edema lebih kecil ($P1<0,05$) dan berbeda bermakna dibandingkan KN. Hal ini menunjukkan EMAT1 dengan dosis 300 mg/Kg BB dan EMAT2 600 mg/Kg BB tidak mempunyai aktifitas antiinflamasi pada pemberian 1 jam setelah induksi Carrageenan; sementara EMAT3 dengan dosis 1200 mg/Kg BB baru menampakkan aktivitas antiinflamasi pada interval jam ke 3 yang berarti 2 jam setelah pemberian EMAT3, dan kekuatan aktivitas antiinflamasinya bertahan sampai jam ke 6.

Bila dibandingkan dengan Indometasin (Indom) sebagai kontrol positif, terlihat persen peningkatan volume edema kaki tikus pada EMAT1 setelah interval jam ke 2 - 4 $P2>0,05$ tidak berbeda bermakna terhadap Indom, pada interval jam ke 5 - 6 persen peningkatan volume edema lebih besar ($P2<0,05$) dan berbeda bermakna terhadap Indom; pada EMAT2 persen peningkatan edema pada interval jam ke 3 - 6 lebih besar ($P2<0,05$) dan berbeda bermakna terhadap Indom; pada EMAT3 persen peningkatan volume edema pada interval jam ke 2 - 6 dengan $P>0,05$ tidak berbeda bermakna terhadap Indom. Hal ini menunjukkan aktivitas antiinflamasi EMAT1 dan EMAT2 yang diberikan satu jam setelah induksi Carrageenan, lebih lemah dibandingkan Indometasin. Sedangkan aktivitas antiinflamasi EMAT3 yang diberikan satu jam setelah induksi Carrageenan sama atau tidak berbeda dengan Indometasin.

Tabel 5.6 Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus dengan Pemberian EMAT satu Jam Sesudah Induksi Carrageenan

Interval waktu	Persen peningkatan volume edema kaki tikus 1 jam sesudah induksi carrageenan diberi EMAT																					
	KN (%)				Indom (%)				EMAT1 (%)				EMAT2 (%)				EMAT3 (%)					
	Mean	±	SEM	Mean	±	SEM	P1	Mean	±	SEM	P1	P2	Mean	±	SEM	P1	P2	Mean	±	SEM	P1	P2
0 jam	20,492	±	2,644	26,144	±	2,067	0,202	12,326*	±	1,554	0,029	<0,001	21,369	±	1,283	0,997	0,348	18,953	±	0,657	0,971	0,065
1 jam	24,867	±	3,134	35,452*	±	1,8	0,006	18,157	±	1,231	0,124	<0,001	29,441	±	1,307	0,444	0,198	24,147	±	1,16	0,999	0,003
2 jam	29,14	±	3,435	31,731	±	1,81	0,916	24,987	±	1,591	0,671	0,229	36,967	±	2,054	0,124	0,462	28,105	±	1,476	0,997	0,768
3 jam	34,102	±	3,307	27,483	±	1,788	0,258	33,61	±	1,462	1	0,327	41,757°	±	2,451	0,148	0,002	26,001	±	1,59	0,114	0,989
4 jam	25,937	±	3,053	19,006	±	1,517	0,198	25,768	±	1,466	1	0,217	31,207°	±	2,562	0,445	0,006	18,458	±	1,765	0,145	1
5 jam	21,151	±	3,015	12,47	±	1,571	0,058	23,205°	±	1,489	0,956	0,014	27,054°	±	2,551	0,309	<0,001	15,829	±	1,353	0,407	0,789
6 jam	24,765	±	3,997	8,898*	±	0,917	<0,001	40,298**	±	2,021	0,001	<0,001	23,510°	±	2,025	0,995	0,002	13,309*	±	1,169	0,016	0,66
24 jam	6,88	±	0,96	5,598	±	1,023	0,86	16,478**	±	0,985	<0,001	<0,001	5,21	±	0,564	0,705	0,998	8,967	±	0,995	0,513	0,111

Keterangan: KN = Kontrol Negatif = CMC 0,5% ; Indom = Indometasin 10mg/kg BB ; EMAT1 = Ekstrak Metanol akar Tambolekar dosis 300 mg/KgBB ; EMAT2 = dosis 600 mg/kgBB ; EMAT3 = dosis 1200 mg/kgBB; n= 5 ekor tikus, dianalisa dengan ANOVA dan Tukey Test p<0,05, P1 analisa terhadap KN yang bertanda bintang * berbeda bermakna terhadap KN; P2 = analisa terhadap Indom, yang bertanda ° berbeda bermakna terhadap Indom

Berdasarkan analisa ketiga perlakuan, satu jam sebelum, saat dan satu jam setelah induksi *Carrageenan*, terlihat EMAT1 dengan dosis 300 mg/Kg BB hanya beraktivitas antiinflamasi dengan pemberian satu jam sebelum induksi *Carrageenan*, dan hanya beraktivitas selama 5 jam. EMAT2 dengan dosis 600 mg/Kg BB beraktivitas antiinflamasi dengan pemberian satu jam sebelum dan saat induksi *Carrageenan*. EMAT3 dengan dosis 1200 mg/KgBB beraktivitas antiinflamasi dengan pemberian baik satu jam sebelum, saat maupun satu jam setelah induksi *Carrageenan*. Untuk memastikan pengaruh waktu pemberian EMAT terhadap aktivitas antiinflamasi dilakukan analisa ANOVA pada EMAT2 dan EMAT3 yang diberikan satu jam sebelum, saat maupun satu jam setelah induksi *Carrageenan*.

5.2.4 Aktivitas Antiinflamasi EMAT2 (600 mg/KgBB) Pada Pemberian Satu jam Sebelum, Saat dan Satu jam Setelah Induksi *Carrageenan*

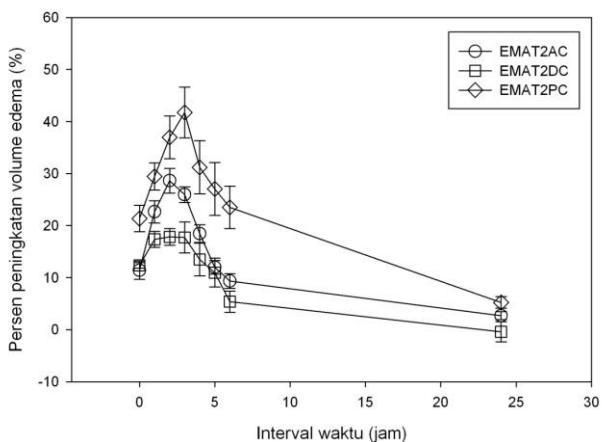
Tabel 5.7 Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus dengan Pemberian EMAT2 satu Jam Sebelum, Saat dan satu Jam Setelah Induksi *Carrageenan*

Interval waktu	Persen peningkatan volume edema kaki tikus									
	EMAT2 AC (%)			EMAT2 DC (%)			EMAT2 PC (%)			
	Mean	± SEM	Mean	± SEM	P1	Mean	± SEM	P1	P2	
0 jam	11,399	± 0,868	12,334	± 0,267	0,752	21,369*°	± 1,283	<0,001	<0,001	
1 jam	22,673	± 1,071	17,355*	± 0,775	0,011	29,441*°	± 1,307	0,002	<0,001	
2 jam	28,641	± 1,186	17,823*	± 0,793	<0,001	36,967*°	± 2,054	0,004	<0,001	
3 jam	25,974	± 0,750	17,714*	± 1,491	0,013	41,757*°	± 2,451	<0,001	<0,001	
4 jam	18,457	± 0,859	13,476	± 1,579	0,168	31,207*°	± 2,562	<0,001	<0,001	
5 jam	11,977	± 0,650	10,943	± 1,391	0,602	27,054*°	± 2,551	<0,001	<0,001	
6 jam	9,333	± 0,703	5,366	± 1,018	0,143	23,510*°	± 2,025	<0,001	<0,001	
24 jam	2,665	± 0,384	-0,436*	± 0,964	0,019	5,21°	± 0,564	0,053	<0,001	

Keterangan: EMAT2AC = Pemberian EMAT2 1 jam sebelum induksi *Carrageenan*; EMAT2DC = Pemberian EMAT2 saat induksi *Carrageenan*; EMAT2PC = Pemberian EMAT2 1 jam setelah induksi *Carrageenan*; n = 5 ekor tikus; Analisa data menggunakan ANOVA dengan p<0,05; P1 = analisa terhadap EMAT2AC; P2 = analisa terhadap EMAT2DC; tanda * berbeda bermakna terhadap EMAT2AC; tanda ° berbeda bermakna terhadap EMAT2DC

Tabel 5.7 dan gambar 5.10 memperlihatkan persen peningkatan volume edema kaki tikus yang diberi EMAT2 satu jam sebelum, saat dan satu jam setelah induksi Carrageenan. Pengamatan dilakukan sampai jam ke 24. Dari tabel 5.7 EMAT2DC pada interval jam ke 1 – 3 nilai $P1 < 0,05$, berbeda bermakna terhadap EMAT2AC; pada interval jam ke 4 – 6 $P1 > 0,05$ tidak berbeda bermakna terhadap EMAT2AC sementara pada EMAT2PC persen peningkatan volume edema lebih besar ($P1 < 0,05$ dan $P2 < 0,05$) dan berbeda bermakna terhadap EMAT2AC dan EMAT2DC sampai interval waktu ke 24.

EMAT2 diberikan 1 jam sebelum, saat dan 1 jam sesudah induksi caragenan



Gambar 5.10 Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus yang diinduksi Carrageenan, pemberian EMAT2 1 jam sebelum, Saat dan 1 jam Setelah Induksi.

Keterangan: EMAT2AC = EMAT2 dosis 600 mg/Kg BB 1 jam sebelum induksi Carrageenan; EMAT2DC = EMAT2 saat Induksi Carrageenan; EMAT2PC = EMAT2 1 jam setelah induksi Carrageenan.

$n = 5$ ekor tikus, Analisa data menggunakan ANOVA dengan $p < 0,05$

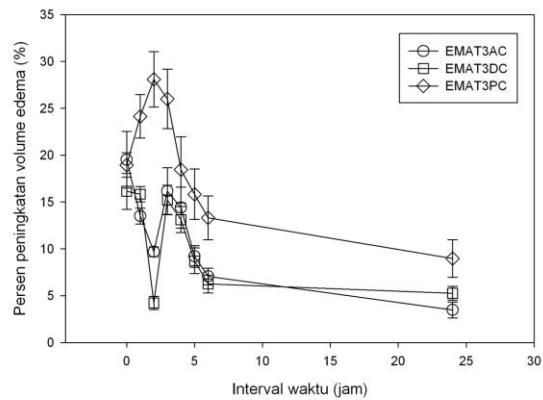
Hal ini menunjukkan pemberian EMAT dengan dosis 600 mg/Kg BB lebih efektif satu jam sebelum atau saat induksi Carrageenan. Bila pemberian EMAT dosis 600 mg/kg BB dilakukan satu jam setelah induksi Carrageenan aktivitas antiinflamasi

lebih lemah. Dari hasil di tabel 5.7 maupun gambar 5.10 juga terlihat pada EMAT2AC dan EMAT2DC persen volume edema mulai menurun pada interval jam ke 2, hal ini menunjukkan aktivitas antiinflamasi EMAT 600 mg/kg BB terjadi pada fase lanjut.

5.2.5 Aktivitas Antiinflamasi EMAT3 (1200 mg/KgBB) Pada Pemberian Satu Jam Sebelum, Saat dan Satu Jam Setelah Induksi Carrageenan

Data pada tabel 5.8 dan gambar 5.11 memperlihatkan persen peningkatan volume edema kaki tikus yang diberi EMAT3 satu jam sebelum, saat dan satu jam setelah induksi Carrageenan. Pengamatan dilakukan sampai jam ke 24

EMAT3 diberi 1 jam sebelum, saat dan 1 jam sesudah induksi caragenan



Gambar 5.11 Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus yang diinduksi Carrageenan, pemberian EMAT3 1 jam sebelum, Saat dan 1 jam Setelah Induksi Carrageenan.

Keterangan: EMAT3AC = EMAT3 dosis 1200 mg/Kg BB 1 jam sebelum induksi Carrageenan; EMAT3DC = EMAT3 saat Induksi Carrageenan; EMAT3PC = EMAT3 1 jam setelah induksi Carrageenan.

n = 5 ekor tikus, Analisa data menggunakan ANOVA dengan p<0,05 berbeda bermakna

Tabel 5.8 Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus dengan Pemberian EMAT3 Satu Jam Sebelum, Saat dan Satu Jam Setelah Induksi Carrageenan

Interval waktu	Persen peningkatan volume edema kaki tikus								
	EMAT3 AC (%)		EMAT3 DC (%)		EMAT3 PC (%)				
	Mean	± SE	Mean	± SEM	P1	Mean	± SEM	P1	P2
0 jam	19,512	± 1,518	16,146	± 0,959	0,110	18,953	± 0,657	0,110	0,110
1 jam	13,500	± 0,421	15,839	± 0,407	0,111	24,147*	± 1,16	<0,001	<0,001
2 jam	9,684	± 0,260	4,218*	± 0,356	0,003	28,105**	± 1,476	<0,001	<0,001
3 jam	16,167	± 1,250	15,217	± 0,791	0,856	26,001**	± 1,59	<0,001	<0,001
4 jam	14,395	± 1,088	13,107	± 0,692	0,756	18,458*	± 1,765	0,098	0,028
5 jam	9,196	± 0,576	8,712	± 0,684	0,929	15,829**	± 1,353	<0,001	<0,001
6 jam	7,055	± 0,438	6,254	± 0,475	0,749	13,309**	± 1,169	<0,001	<0,001
24 jam	3,475	± 0,427	5,256	± 0,369	0,179	8,967**	± 0,995	<0,001	0,005

Keterangan: EMAT3AC = Pemberian EMAT3 1 jam sebelum induksi Carrageenan;

EMAT3DC = Pemberian EMAT3 saat induksi Carrageenan; EMAT3PC = Pemberian EMAT3 1 jam setelah induksi Carrageenan;

n = 5 ekor tikus; Analisa data menggunakan ANOVA dengan p<0,05; P1 = analisa terhadap EMAT3AC; P2 = analisa terhadap EMAT3DC; tanda * berbeda bermakna terhadap EMAT3AC; tanda ° berbeda bermakna terhadap EMAT3DC

Pada tabel 5.8 menunjukkan EMAT3DC dengan P1 >0,05 pada interval jam ke 0

- 24, tidak berbeda bermakna terhadap EMAT3AC; sementara pada EMAT3PC

persen peningkatan volume edema lebih besar dan berbeda bermakna (P1 dan

P2 <0,05) terhadap EMAT3 AC dan EMAT3DC pada interval jam ke 1 – 24. Hal

ini menunjukkan efek antiinflamasi pada pemberian EMAT3 dengan dosis 1200

mg/Kg BB satu jam setelah induksi carrageenan lebih lemah dibandingkan

pemberian EMAT3 satu jam sebelum dan saat induksi Carrageenan. Dari hasil di

tabel 5.9 maupun gambar 5.11 juga terlihat pada EMAT3AC persen volume edema

mulai menurun pada interval jam ke 0, pada EMAT3DC persen volume edema

mulai menurun pada interval jam ke 1, sementara pada EMAT3PC persen volume

edema mulai menurun pada interval jam ke 2, hal ini menunjukkan aktivitas

antiinflamasi EMAT 1200 mg/kg BB terjadi pada fase awal bila diberikan satu jam

sebelum dan saat induksi carrageenan, tapi aktivitas antiinflamasi EMAT 1200

sebelum dan saat induksi Carrageenan, tapi aktivitas antiinflamasi EMAT 1200

sebelum dan saat induksi Carrageenan, tapi aktivitas antiinflamasi EMAT 1200

sebelum dan saat induksi Carrageenan, tapi aktivitas antiinflamasi EMAT 1200

mg/kg BB terjadi pada fase lambat bila pemberiannya satu jam setelah induksi

carageenan



PENELITIAN TAHAP 3:**UJI AKTIVITAS ANTI-INFLAMASI EKSTRAK METANOL AKAR TAMBOLEKAR
(*Coptosapelta Flavescens* Korth) MELALUI STABILISASI MEMBRAN RED BLOOD CELL (RBC) YANG DI INDUKSI HIPOTONISITAS****5.3 Hasil Penelitian Tahap 3**

Penelitian ini menguji aktivitas antiinflamasi EMAT dengan memproteksi membran *red blood cell* (RBC) dari kerusakan yang diinduksi larutan hyposalin. Data pada tabel 5.9 merupakan hasil perhitungan persen proteksi stabilitas membran dari absorbansi masing-masing konsentrasi baik EMAT dan Indometasin (kontrol positif). Sementara grafik yang dihasilkan seperti pada gambar 5.12.

Tabel 5.9 Persen Proteksi Stabilitas Membran RBC terhadap Induksi Hyposalin pada Pemberian EMAT dan Indometasin

Persen Proteksi Inflamasi Indometasin & EMAT pada membran RBC yang diinduksi hyposalin

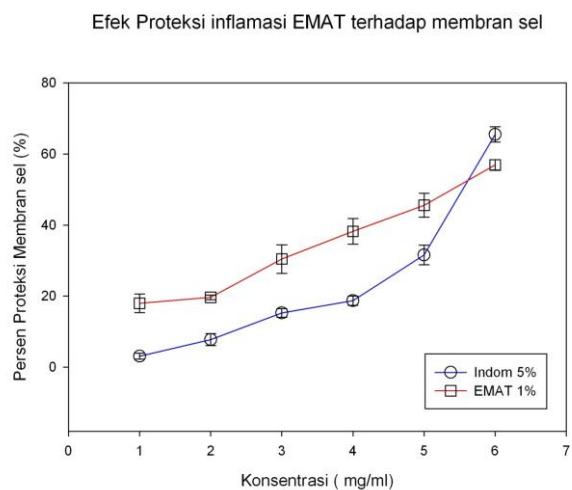
Kode Kons	Indom 5%				EMAT 1%				P
	Kons (mg/ml)	Mean	\pm	SEM	Kons (mg/ml)	Mean	\pm	SEM	
1	0,338	3,083	\pm	0,413	0,068	17,957*	\pm	1,311	<0,001
2	0,676	7,741	\pm	0,84	0,135	19,651*	\pm	0,331	<0,001
3	1,689	15,257	\pm	0,61	0,338	30,449*	\pm	2,017	0,002
4	3,378	18,698	\pm	0,642	0,676	38,229*	\pm	1,804	<0,001
5	6,757	31,56	\pm	1,384	1,351	45,534*	\pm	1,681	0,003
6	13,514	65,489	\pm	1,094	2,703	56,914*	\pm	0,712	0,003
EC ₅₀	10,288	\pm	0,212		EC ₅₀	1,905*	\pm	0,119	<0,001

Keterangan: Indom = Indometasin 50 mg/ml; EMAT= Ekstrak metanol Akar Tambolekar 10 mg/ml; n = 3 x pengulangan, Analisa menggunakan t-test, p<0,05, tanda * berbeda bermakna

Terlihat persen proteksi stabilitas membran sel pada EMAT di 6 konsentrasi lebih besar dan berbeda bermakna terhadap 6 konsentrasi Indom (p<0,05). Makin besar

konsentrasi EMAT dan Indom yang diberikan makin besar persen proteksi membran sel. Berdasarkan perhitungan persamaan regresi linear diperoleh EC₅₀ EMAT ($1,905 \pm 0,119$) mg/ml lebih kecil dan berbeda bermakna (p<0,001)

dibandingkan EC_{50} Indometasin ($10,288 \pm 0,212$) mg/ml, makin kecil EC_{50} makin kuat efek proteksi membran sel. Hal ini menunjukkan aktivitas EMAT dalam memproteksi membran RBC terhadap kerusakan yang diinduksi larutan hyposalin lebih kuat dibandingkan Indometasin, dan tergantung dosis.



Gambar 5.12 Persen Proteksi EMAT pada Membran RBC yang di Induksi Hyposalin

Keterangan: Indom = Indometasin 50 mg/ml; EMAT= Ekstrak metanol Akar Tambolekar 10 mg/ml, n = 3 x pengulangan, analisa menggunakan t-test, $p<0,05$ berbeda bermakna

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1as Pembahasan Penelitian Tahap 1

Akar Tambolekar (*Coptosapelta flavescent* Korth) sebagai bahan baku pembuatan ekstrak metanol akar Tambolekar (EMAT) diperoleh dari hutan

sekunder kabupaten Paser Kalimantan Timur. Pada penelitian ini tidak dilakukan standarisasi bahan baku, karena budidaya tanaman Tambolekar sulit dilakukan dalam waktu singkat, memerlukan keahlian tersendiri dalam pertanian, sementara secara sederhana pemindahan tempat tumbuh Tambalekar telah dilakukan, namun tidak berhasil. Oleh sebab itu, akar Tambolekar yang dikumpulkan sedapat mungkin mempunyai diameter antara 1-4 cm.

Sistem saraf autonom, yang meliputi saraf kolinergik dan adrenergik meregulasi kontraksi dan relaksasi otot polos saluran napas (Canning, 2006).

Pengobatan penyakit saluran napas seperti asma dan COPD yang menggunakan antikolinergik (Bos *et al.*, 2007) dan agonis Beta₂ adrenergik (Kasahara *et al.*, 2005) dapat merelaksasi otot polos saluran napas.

Penghambatan kontraksi yang diinduksi histamin merupakan model patologi penyakit asma alergi (Husori *et al.*, 2017). Pelepasan histamin oleh sel mast selama periode alergi menyebabkan histamin terikat pada reseptor Histamin₁ (H₁) yang banyak terdapat di otot polos saluran napas. Interaksi histamin dengan reseptor H₁ menimbulkan kontraksi otot polos saluran napas. Akar *Coptosapelta flavescent* Korth yang secara tradisional digunakan untuk mengobati sesak napas berpotensi sebagai agen antiastma dan penyakit saluran napas, oleh sebab itu penelitian ini mengevaluasi efek bronkorelaksasi ekstrak metanol akar tambolekar (EMAT) pada reseptor kolinergik, reseptor B₂ adrenergik dan reseptor histamin.

6.1.1 Aktivitas Bronkorelaksasi EMAT melalui Antagonis Reseptor Kolinergik

Otot polos saluran napas didominasi oleh syaraf kolinergik yang menghasilkan kontraksi melalui reseptor M_3 kolinergik, syaraf kolinergik berperan penting dalam mengatur kontraktilitas otot polos saluran napas (Canning, 2006).

Adanya rangsangan seperti debu, alergen pada penderita asma akan menyebabkan pelepasan ACh baik oleh saraf kolinergik maupun oleh sel-sel endotel, sel inflamasi di otot polos saluran napas. ACh yang dilepas akan berinteraksi dengan reseptor M_3 kolinergik, yang merupakan kelompok *G Protein Coupled Receptors* (GPCRs) dengan Gq protein sebagai sub unit alpha, aktivasi Gq protein oleh ACh menimbulkan serangkaian reaksi intraseluler dalam sel otot polos saluran napas dengan mengkatalisir *phosphatidylinositol 4,5-biphosphate* (PIP2), menghasilkan pembentukan dua second messengers: *diacylglycerol* (DG) intraseluler dan *inositol 1,4,5-triphosphate* (IP3). IP3 melepaskan calcium dari tempat penyimpanannya di intraselular melalui reseptor IP3R, sementara DG merangsang trasport calcium intraselular disamping mengaktifkan *protein kinase C*. Peningkatan kadar calcium sitosol menyebabkan kontraksi otot polos saluran napas (Albuquerque et al., 2016 ; Husori et al., 2017).

Pada penelitian ini, untuk membuktikan bahwa EMAT mampu menghambat reseptor kholinergik M_3 , maka EMAT diberikan terlebih dahulu untuk menempati reseptornya sebelum pemberian metakolin yang menyebabkan kontraksi. Hasilnya terbukti EMAT mampu mengantagonis reseptor M_3 kolinergik di otot polos saluran napas secara non kompetitif atau non spesifik, yang ditunjukkan oleh kurva dosis-respons (KDR) Met-EMAT10, Met-EMAT20 dan Met-EMAT30 di gambar 5.1. Ketiga kurva pada KDR bergeser ke kanan, yang menandakan terjadi penghambatan EMAT pada reseptor

kolinergik, sehingga diperlukan metakolin yang lebih banyak untuk menginduksi kontraksi yang sama pada cincin bronkus. Efek maksimum dari ketiga kurva pada KDR yang lebih rendah menunjukkan EMAT menduduki reseptor M₃ kolinergik pada sisi yang sama dari agonis namun bersifat irreversibel, atau pada sisi lain dari agonis pada reseptor, dan tidak terjadi kompetisi dengan agonis metakolin, sehingga agonis metakolin tidak mampu menggeser EMAT, yang berakibat kontraksi submaksimal (Range, et al, 2016), tidak dapat mencapai respon seperti tanpa EMAT atau kontrol. Makin besar dosis EMAT yang diberikan terlebih dulu pada cincin bronkus, maka potensi agonis mengkontraksi otot polos bronkus makin lemah, karena dosis EMAT yang menduduki reseptor M₃ kolinergik makin besar, hal ini mengindikasikan adanya komponen kimia yang terkandung dalam akar tambolekar mempunyai aktivitas dan berpotensi mengantagonis reseptor M₃ kolinergik. Aktivitas EMAT pada reseptor M₃ kolinergik menghalangi metakolin berinteraksi dengan reseptor M₃ kolinergik menghasilkan relaksasi pada otot polos saluran napas. Hal ini juga menjelaskan penggunaan akar tambolekar untuk mengatasi sesak atau asma di masyarakat Kalimantan. Ekstrak tanaman lain yang juga mempunyai aktivitas mengantagonis reseptor M₃ kolinergik seperti ekstrak etanol daun *Curanga fel-terrae* yang mengantagonis secara kompetitif reseptor M₃ kolinergik pada trachea kelinci (Harahap et al, 2017); ekstrak etanol *Salsola imbricata* yang mengantagonis reseptor kolinergik secara nonkompetitif dan beraktivitas juga pada resptor beta₂ adrenergik pada trachea kelinci (Aslam and Janbaz, 2017); ekstrak air *Nigella sativa* yang mengantagonis reseptor kolinergik dan reseptor histamin pada trachea guinea pig (Boskabady and Aslani, 2005).

6.1.2 Aktivitas Bronkorelaksasi EMAT melalui Antagonis Reseptor Histamin

Pada penelitian ini juga menghasilkan efek EMAT mengantagonis reseptor histamin (H_1) secara non kompetitif di otot polos saluran napas, yang ditunjukkan oleh KDR His-EMAT10, His-EMAT15 dan His-EMAT20 di gambar 5.3. Ketiga KDR bergeser ke kanan, yang menandakan terjadi penghambatan

EMAT pada reseptor H_1 , sehingga diperlukan histamin yang lebih banyak untuk menginduksi kontraksi yang sama pada cincin bronkus. Efek maksimum dari ketiga KDR yang lebih rendah menunjukkan EMAT menduduki reseptor H_1 pada

sisi yang sama dari agonis namun bersifat irreversibel, atau pada sisi lain dari agonis pada reseptor H_1 , dan tidak terjadi kompetisi dengan agonis histamin, sehingga agonis histamin tidak mampu menggeser EMAT, yang berakibat kontraksi submaksimal, tidak dapat mencapai respon seperti tanpa EMAT (antagonis) atau kontrol. Potensi agonis histamin yang mengkontraksi otot polos

saluran napas makin lemah dengan makin besarnya dosis EMAT menduduki reseptor H_1 , hal ini mengindikasikan adanya komponen kimia yang terkandung dalam akar Tambolekai mempunyai aktivitas dan potensi mengantagonis reseptor H_1 . Aktivitas EMAT pada reseptor H_1 menghalangi histamin berinteraksi dengan reseptor H_1 . Reseptor H_1 juga merupakan kelompok GPCRs dengan Gq protein sebagai sub unit alpha. Aktivasi Gq protein oleh histamin akan menrigriger reaksi intraseluler di sel otot polos saluran napas, seperti pada reaksi intraseluler

yang ditimbulkan oleh ACh, sehingga meningkatkan kadar Calcium sitosol, dan menimbulkan kontraksi otot polos saluran napas (Husori et al., 2017). Efek EMAT pada penelitian ini menghasilkan hambatan pada reseptor H_1 , menyebabkan

histamin yang diberikan tidak dapat terikat di reseptor H_1 yang telah diduduki oleh EMAT dan hanya berikatan pada reseptor yang belum diduduki EMAT, sehingga kontraksi yang terjadi memerlukan dosis histamin lebih besar. Efek ekstrak

tanaman lain yang juga beraktivitas menghambat reseptor H₁ seperti ekstrak etanol daun *Nyctanthes arbortristis* yang mengantagonis reseptor histamin pada trachea guinea pig, dengan mengurangi respon maksimal, dan melalui mekanisme peningkatan produksi NO (Sopi and Khan, 2013); ekstrak air *Bunium persicum* yang mengantagonis secara kompetitif reseptor Histamin pada cincin trachea guinea pig (Boskabady and Moghaddas, 2004).

6.1.3 Aktivitas Bronkorelaksasi EMAT melalui Agonis Reseptor Beta₂ Adrenergik

Pada penelitian ini EMAT berefek bronkorelaksasi, yang ditunjukkan oleh KDR pelarut ekstrak sebagai kontrol negatif (KN) dan KDR EMAT di gambar 5.5.

Untuk mendapatkan efek relaksasi EMAT, cincin bronkus dikontraksikan dulu 80% dengan menggunakan metakolin 10⁻³ M, baru diberikan EMAT secara kumulatif. Makin besar konsentrasi EMAT yang diberikan makin besar relaksasi cincin bronkus yang ditandai dengan tanda negatif, yang berarti terjadi relaksasi.

Untuk membuktikan aktivitas bronkorelaksasi dari EMAT melalui stimulasi reseptor beta₂ adrenergik, maka dilakukan penghambatan reseptor beta₂ adrenergik terlebih dahulu dengan pemberian beta bloker Propranolol, apakah relaksasinya berkurang atau tidak. Jika besar relaksasi berkurang karena Propranolol dan pada KDR tampak pergeseran kurva EMAT ke kanan, maka benar EMAT bekerja sebagai agonis di reseptor beta₂ adrenergik.

Pada penelitian ini terbukti EMAT menstimulasi reseptor beta₂ adrenergik, yang ditunjukkan oleh KDR Pro 0,5 EMAT, Pro 1,0 EMAT dan Pro 1,5 EMAT di gambar 5.5. Ketiga KDR bergeser kekanan, yang menandakan terjadi penghambatan Propranolol di reseptor beta₂ adrenergik, sehingga diperlukan agonis EMAT yang lebih banyak untuk menimbulkan relaksasi yang sama pada cincin bronkus. Penghambatan oleh propranolol yang telah diketahui sebagai

antagonis kompetitif beta adrenergik, menunjukkan E_{maks} cincin bronkus yang diblok propranolol tidak berbeda bermakna dibandingkan dengan E_{maks} yang tidak diblok (Range, et al, 2016). Hal ini mengindikasikan EMAT sebagai agonis berefek di reseptor beta₂ adrenergik. EMAT dapat menggeser propranolol, sehingga menimbulkan relaksasi cincin bronkus dengan E_{maks} yang sama dengan E_{maks} tanpa propranolol. Dan mengindikasikan pula adanya komponen aktif dalam EMAT menstimulasi reseptor beta₂ adrenergik. Aktivasi beta₂ reseptor menimbulkan rangsangan pada adenylat siklase melalui trimerik protein Gs dengan sub unit alfa. Stimulasi adenilat siklase mengkatalisis konversi *Adenosine Tri phosphate* (ATP) ke *cyclic adenosine mono phosphate* (cAMP). Aktivitas cAMP diketahui adalah mengkatalisis aktivasi protein kinase A (PKA), yang pada gilirannya memfosforilasi protein regulator yang terlibat dalam pengendalian tonus otot. cAMP juga menghasilkan penghambatan pelepasan Calcium (Ca^{2+}) dari penyimpanannya di intraseluler, mengurangi masuknya Ca^{2+} membran, dan penyerapan Ca^{2+} intraseluler, yang mengarah ke relaksasi otot polos saluran napas (Johnson, 2006). Tanaman lain yang telah dilaporkan mempunyai efek bronkorelaksasi melalui beta₂ adrenoseptor seperti, ekstrak air *Nigella sativa* dengan komponen aktifnya Thymoquinone menstimulasi reseptor beta₂ adrenergik (Keyhanmanesh et al, 2014); ekstrak metanol daun *Myxopyrum serratulum* yang merelaksasi otot polos cincin trachea guinea pig selain melalui stimulasi beta₂ adrenoseptor juga melalui antagonis reseptor histamin dan menghambat Ca^{2+} channel (Maruthamuthu and Kandasamy, 2017); ekstrak daun *Alchornea cordifolia* (Shumach and Thonn) Müell Arg., Euphorbiaceae menstimulasi beta₂ adrenoseptor pada jaringan otot polos terpisah (Adesina et al, 2017).

Dari penelitian sebelumnya telah diketahui ekstrak metanol akar tambolear mengandung bahan aktif atau metabolit sekunder polifenol, saponin,

terpenoid, steroid dan anthrakuinon (Kosala, 2015; Setiorini, 2015). Beberapa peneliti membuktikan metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak tanaman mempunyai aktivitas merelaksasi otot polos saluran napas, seperti thymoquinon (terpenoid) dalam minyak atsirie *Nigella sativa*, Ekstrak air *N.sativa* merelaksasi otot polos trachea guinea pig melalui stimulasi b₂ adrenoseptor (Keyhanmanesh, et al, 2014). γ -sitosterol (steroid) dari *Mimosa pudica* L. (Myint, et al, 2016), Quercetin, suatu polifenol (kelompok flavonoid) yang banyak terkandung dalam buah-buahan, sayur telah dilaporkan mempunyai efek merelaksasi otot polos bronkus manusia melalui hambatan kontraksi bronkus yang diinduksi ACh dan histamin, selain itu merelaksasi bronkus guinea pig melalui peningkatan kecepatan pembentukan cAMP, sehingga mengaktifkan cAMP- dependent protein kinase dan menghambat *myocin light chain kinase* dengan fosforilasi, berakibat pengurangan kontraksi (Wani et al, 2017).

Terpenoid dalam EMAT, bisa berefek seperti thymoquinone, menghambat

kontraksi otot polos saluran napas yang diinduksi metakolin dan menstimulasi B₂ adrenoseptor sehingga menghasilkan relaksasi otot polos saluran napas. Steroid dalam EMAT dapat berefek seperti γ -sitosterol, merelaksasi kontraksi otot polos saluran napas yang diinduksi histamin. Polifenol dalam EMAT dapat berefek seperti quercetin, merelaksasi bronkus dengan menghambat kontraksi yang diinduksi ACh dan Histamin, dan meningkatkan cAMP melalui stimulasi b₂ adrenoseptor.

Analog dengan metabolit sekunder dari tanaman lain, maka kandungan metabolit sekunder dalam EMAT yang bertanggung jawab dalam merelaksasi cincin bronkus guinea pig diduga adalah polifenol, terpenoid dan steroid.

6.2 Pembahasan Penelitian Tahap 2

Penelitian *invivo* ini untuk mempertegas aktivitas antiinflamasi akar tambolekari yang telah diteliti oleh Trans and Trans, 2010 dengan menggunakan ekstrak etanol *Coptosapelta tomentosa* dari daerah Vietnam. Pada penelitian ini menggunakan ekstrak metanol akar tambolekari (*Coptosapelta flavesrens* Korth) dari Kalimantan Indonesia, untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi dengan menghambat terjadinya edema pada kaki tikus yang diinduksi *carrageenan*.

Model edema kaki tikus yang diinduksi *carrageenan* ini merupakan metode standar yang digunakan untuk skrining efek antiinflamasi bahan NSAID dan ekstrak tanaman. *Carrageenan* diketahui bersifat non-antigenik, tidak mempunyai efek sistemik dan menghasilkan respon pro-inflamasi (Paramita, *et al*, 2017).

Respon inflamasi akut yang diinduksi injeksi *carrageenan* meliputi dua fase: fase awal terjadi selama satu jam dari paparan *carrageenan*, dengan melepas mediator histamin, serotonin, bradikini dan sedikit prostaglandin. Berikutnya fase kedua atau fase lambat setelah satu jam disebabkan adanya infiltrasi *polymorphonuclear* (PMN) leukosit dan pembentukan prostaglandin lanjutan (Zhang, *et al*, 2013). Supresi fase awal dapat dikaitkan dengan penghambatan pelepasan mediator awal, seperti serotonin dan histamin, dan aksi supresi di fase kedua dapat dijelaskan dengan penghambatan cyclooxygenase (Lande, *et al*, 2015).

Aktivitas anti inflamasi EMAT dosis 1200 mg/kg BB yang diberikan satu jam sebelum induksi *carrageenan* terjadi pada fase awal, maupun fase lambat, yang berarti dapat menghambat pelepasan histamin, serotonin, juga menghambat pembentukan prostaglandin dengan menghambat enzim cyclooxygenase. EMAT dosis 600 mg/kg BB yang diberikan satu jam sebelum induksi *carrageenan* menunjukkan aktivitas antiinflamasi pada fase lambat, mengindikasikan efek penghambatan pada pembentukan prostaglandin. EMAT

dosis 600 dan 1200 mg /kg BB yang diberikan selama induksi *carrageenan* menekan fase lambat inflamasi, diduga melalui penghambatan COX2. Namun, hanya EMAT dengan dosis 1200 mg / kgBB menunjukkan aktivitas anti-inflamasi melalui penghambatan COX2 ketika diberikan pada satu jam setelah induksi *carrageenan*. Dengan demikian, penelitian ini mengungkapkan bahwa dosis tinggi EMAT 1200 mg / kgBB efektif dalam mencegah dan mengobati inflamasi yang diinduksi *carrageenan* secara *in vivo*. Dalam kondisi mencegah inflamasi, EMAT 1200 mg/ kgBB diduga beraktivitas menghambat pelepasan histamin dan serotonin, sementara pada kondisi mengobati inflamasi, EMAT 1200 mg/kg BB diduga beraktivitas menghambat COX2 atau pembentukan prostaglandin. Untuk mengetahui mekanisme pasti dari EMAT masih perlu dilakukan penelitian dengan mengukur kadar COX2 atau mediator yang lain.

6.3 Pembahasan Penelitian Tahap 3

Cedera jaringan pada respon inflamasi akut dapat disebabkan oleh neutrofil dan makrofag aktif yang ekstravasasi menuju tempat inflamasi atau cedera, dan memfagositosis sisa-sisa sel yang mengalami nekrosis maupun mikroba dengan melepaskan isi lisosomnya (Abbas *et al*, 2012). Cedera jaringan maupun cedera pada membran lisosom memicu pelepasan fosfolipase A2 (PLA2) (Umapathy *et al.*, 2010) yang memediasi hidrolisis fosfolipid menjadi *lysophospholipids* dan asam lemak bebas, seperti asam arakidonat. Kedua metabolit fosfolipid ini merupakan prekursor mediator inflamasi. Jalur asam arakidonat membentuk prostaglandin dan leukotrien, sedangkan jalur *lysophospholipid* membentuk *platelet activating factor* (PAF) (Meyer *et al.*, 2005).

Penghambatan PLA2 dapat menyebabkan penghambatan COX atau LOX dan akhirnya menghambat proses inflamasi (Yoon and Baek, 2005). Isi lisosom neutrofil yang dilepas selain protease juga ada defensin, dapat

menyebabkan jaringan disekitarnya menjadi cedera (Agier and Brzezińska-Błaszczyk, 2016). Sementara sel mast berperan sentral padareaksi inflamasi dan alergi. Cepat, sel mast dapat melepaskan mediator inflamasi poten seperti histamin, protease, faktor *chemotactic*, cytokin dan metabolit asam arakidonat yang beraktivitas pada vaskular, otot polos, jaringan konektif, kelenjar mukus dan sel inflamasi (Amin, 2011). Histamin tidak hanya dilepas saat tubuh terekspose bahan beracun, tetapi juga dilepas ketika sel mast mendeteksi adanya cedera, yang menginduksi degranulasi sel mast sehingga histamin dan serotonin dilepas. Mekanisme degranulasi sel mast mirip dengan pelepasan isi lisosom dari neutrofil yakni dengan proses eksositosis, proses tersebut diinduksi oleh influx Ca^{2+} kedalam sel (Barrett *et al.*, 2012).

Dengan melakukan stabilisasi membran lisosom atau sel mast akan mencegah influx Ca^{2+} dan pelepasan selanjutnya dari isi lisosom / sel mast, sehingga dapat mencegah kerusakan jaringan dan eksaserbasi respon inflamasi (Umapathy *et al.*, 2010), serta mencegah degranulasi sel mast dan pelepasan histamin serotonin.

Dalam penelitian ini, EMAT menunjukkan kemampuan yang lebih besar untuk menstabilkan membran RBC daripada indometasin, hal ini menunjukkan bahwa EMAT dapat mencegah lisis membran RBC. Karena membran RBC dan lisosom memiliki sifat yang sama, efek stabilisasi membran dari EMAT juga dapat menghambat pelepasan enzim PLA2, yang memainkan peran penting dalam proses inflamasi; dan mencegah influx Ca^{2+} , sehingga pelepasan isi lisosom maupun degranulasi sel mast dihambat. Oleh karena itu, EMAT merupakan agen terapeutik yang potensial untuk mengobati penyakit inflamasi (Yoon and Baek, 2005).

RBC yang terpapar zat berbahaya seperti media hipotonik, panas, metil salisilat atau fenilhidrazin menghasilkan lisis dari membran, disertai hemolisis dan oksidasi dari hemoglobin. Hemolisis hipotonik berhubungan dengan akumulasi cairan intraseluler yang berlebihan, yang mengakibatkan pecahnya membran RBC. Cedera pada membran RBC meningkatkan kerentanan sel terhadap kerusakan sekunder melalui peroksidasi lipid yang diinduksi radikal bebas dan pelepasan PLA2. Stabilisasi membran mencegah kebocoran protein dan cairan serum ke dalam RBC selama periode peningkatan permeabilitas yang disebabkan oleh mediator inflamasi (Anosike et al., 2012). Dalam studi ini, EMAT menstabilkan membran RBC, sehingga berpotensi mencegah pelepasan enzim litik seperti PLA2 dan mediator inflamasi aktif.

Aktivitas anti-inflamasi EMAT berhubungan dengan kandungan metabolit sekundernya. EMAT diketahui mengandung saponin, polifenol, terpenoid, steroid, dan anthraquinones (Kosala, 2015). Saponin terdiri dari aglikon triterpenoid atau steroid dan substituen oligosakarida. Sifat hidrofilik dari bagian gula dan sifat lipofilik dari bagian aglikonnya berkontribusi pada sifat *amphiphilic* atau surfaktan dari saponin, yang bertanggung jawab atas kemampuannya membentuk busa stabil dan membentuk kompleks dengan steroid dan lipid membran (Hassan et al., 2012). Saponin dari ekstrak etanol *C. tomentosa* telah diteliti oleh Tran and Tran 2010, dan telah menunjukkan aktivitas anti-inflamasi. Peneliti lain juga telah membuktikan aktivitas anti-inflamasi ekstrak kasar saponin dari tanaman lain, seperti daun *sesbania sesban* (L.) Merr dalam bentuk gel dapat menghambat edema kaki tikus yang diinduksi *carrageenan* (Dande et al., 2010); dan tanaman herba *Nigeria Schwenckia americana* Linn, rimpang *Asparagus africanus* Lam, daun *Dichrostachys cinerea* Linn, batang *Ficus iteophylla* Miq, dan daun *Indigofera pulchra* Willd yang menghambat volume edema kaki tikus yang diinduksi *carrageenan* (Hassan et al., 2012). Polifenol

dibagi menjadi 4 kelompok besar, yaitu flavonoid, stilbenes, lignan, dan asam fenolik. Polifenol dari bahan makanan juga telah dilaporkan memiliki aktivitas anti-inflamasi, seperti *Catechin* dan *epigallocatechin gallate* dari teh hijau. Senyawa stilbene resveratrol dapat menekan edema yang diinduksi *carrageenan* pada kaki tikus melalui penghambatan aktivitas COX. Flavonoid kaempferol, quercetin, morin, dan myricetin menghambat aktivitas 5-LOX (Yoon and Baek, 2005). Curcumin menghambat aktivitas peroksidase COX dan aktivitas 5-LOX memblokir cPLA2, dan dengan demikian mengurangi ekspresi COX2 dan LOX (Jurenka, 2009). Steroid dari karang *gorgonian Pinnigorgia* sp. dilaporkan menghambat akumulasi protein pro-inflamasi iNOS dan COX-2 dalam sel makrofag RPS-64.7 yang diinduksi oleh LPS (Su *et al.*, 2016). Terpenoid telah dilaporkan menunjukkan efek anti-inflamasi melalui mekanisme penghambat NFkB yang memainkan peran penting dalam pengaturan respon imun dan inflamasi (Heras *et al.*, 2009).

Oleh karena itu, hampir semua metabolit sekunder yang ada dalam EMAT (*Coptosapelta flavescent Korth*) (saponin, polifenol, terpenoid dan steroid) terbukti menunjukkan aktivitas anti-inflamasi.

6.4 Pembahasan Umum

Pada penelitian pendahuluan telah diketahui aktivitas bronkorelaksasi fraksi heksan dan fraksi etilasetat akar tambolekar di reseptor histamin dan reseptor kolinergik lebih lemah dibandingkan fraksi metanol dan ekstrak metanol akar tambolekar (EMAT), oleh sebab itu pada penelitian ini digunakan ekstrak metanol untuk mengkaji efek bronkodilator maupun anti-inflamasi.

Hasil penelitian tahap 1 menunjukkan ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescent Korth*) berefek bronkodilator pada cincin bronkus guinea pig dengan mekanisme aksinya meng-antagonis reseptor kolinergik

secara non-kompetitif dengan konsentrasi 2, 4 dan 6 mg/ml; meng-antagonis reseptor H_1 secara non-kompetitif dengan konsentrasi 2, 3 dan 4 mg/ml dan meng-agonis Beta₂ adrenoseptor. Dari hasil tahap 1 menunjukkan konsentrasi ekstrak yang dapat menimbulkan antagonis pada reseptor histamin lebih kuat dibandingkan reseptor kolinergik, mengindikasikan bahwa kekuatan aktivitas antagonis ekstrak metanol akar tambolekar (EMAT) di reseptor histamin lebih kuat bila dibandingkan dengan di reseptor kolinergik.

Dari hasil tahap 1 menunjukkan keunggulan EMAT sebagai bronkodilator, dibandingkan dengan obat bronkodilator konvensional yang sudah ada: 1) EMAT berefek sekaligus di tiga reseptor, yakni reseptor kolinergik, reseptor histamin dan beta₂ adrenoseptor, sedangkan obat bronkodilator konvensional hanya berefek di satu reseptor, sehingga diperlukan kombinasi untuk meningkatkan efek bronkodilator. Donohue (2016) melaporkan efek bronkodilator penggunaan Combivent inhaler yang mengandung beta₂ agonis albuterol dengan antikolinergik *short acting* Ipatropium bromida lebih kuat dibandingkan dengan efek bronkodilator yang dihasilkan oleh penggunaan beta₂ agonis Albuterol saja, dan durasi bronkodilator pada penggunaan Combivent dua kali lipat lebih lama dibandingkan Albuterol saja (Donohue, et al, 2016). Dari penelitian Donohue tersebut menunjukkan EMAT yang beraktivitas mengantagonis reseptor kolinergik dan meng agonis beta₂ adrenergik dapat berefek bronkodilator yang lebih kuat dan durasi bronkodilatasinya bisa dua kali lipat dibandingkan aktivitas beta₂ agonis saja. 2) Bronkodilator konvensional seperti beta₂ agonis tidak dapat berperan seperti antihistamin. Anti-Histamin H₁ baru yaitu Cetirizine telah dilaporkan memberikan perlindungan tergantung dosis yang signifikan terhadap bronkokonstriksi yang diinduksi histamin pada subyek dengan asma ringan (Kumar, et al, 2018). Hal ini menunjukkan EMAT yang beraktivitas mengantagonis reseptor H₁ diduga juga dapat memberikan perlindungan

terhadap bronkokonstriksi yang disebabkan oleh pelepasan histamin pada fase awal asma akut. 3) Efek samping atau toksitas yang ditimbulkan tanaman obat dalam hal ini EMAT pada umumnya lebih sedikit dibandingkan obat bronkodilator konvensional yang berasal dari bahan sintetis, hal ini disebabkan kandungan berbagai bahan aktif dalam tanaman obat (EMAT) diduga dapat saling menutupi efek samping atau toksitas satu bahan aktif, hal ini masih diperlukan penelitian lebih lanjut. Contoh efek samping yang sering terjadi pada obat saluran napas sintetis, seperti antihistamin (H_1) generasi satu yang menyebabkan ngantuk karena menembus sawar otak dan mempengaruhi susunan saraf pusat; antikolinergik yang menyebabkan mulut kering serta beta₂ agonis yang kehilangan efektifitasnya pada pemakaian jangka panjang atau peningkatan dosis karena mengalami desensitivasi reseptor beta₂ (Barisione, *et al.*, 2010).

Penelitian belakangan menyatakan bahwa antikolinergik seperti Ipatropium Bromida, Tiotropium, yang menempati reseptor Muskarinik dapat memblok asetilkolin. Diketahui asetilkolin yang dilepas baik oleh saraf parasimpatis maupun oleh sel-sel inflamasi mengaktifasi reseptor muskarinik sehingga menginduksi konstriksi otot polos saluran napas dan sekresi mucus (Bos *et al.*, 2007). Dengan menghambat aktivasi reseptor kolinergik diduga juga menghambat sekresi mukus yang berlebihan. EMAT yang beraktivitas mengantagonis reseptor kolinergik selain menghambat terjadinya bronkokonstriksi juga diduga menghambat sekresi mukus.

Pada asma dan penyakit paru obstruktif kronik (PPOK), peran asetilkolin terbukti juga meningkatkan proliferasi sel dan memicu pelepasan mediator proinflamasi seperti leukotrin dari sel otot polos, sel epitel dan sel inflamasi saluran napas, sehingga meningkatkan inflamasi saluran napas. Dengan pemberian antikolinergik dapat melegakan konstriksi otot polos saluran napas, mengurangi inflamasi dan juga menghambat terjadinya *airway remodeling* (Bos

et al., 2007). EMAT telah terbukti dapat menghambat kontraksi yang disebabkan metakolin pada cincin bronkus guinea pig, diharapkan juga dapat menghambat inflamasi yang disebabkan mediator inflamasi fase lambat leukotrin. Untuk membuktikan aktivitas ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Dengan efek bronkodilator EMAT di reseptor kolinergik, reseptor histamin dan reseptor beta₂ adrenergik, mengindikasikan akar Tambolekar berpotensi untuk terapi bronkokonstriksi yang disebabkan oleh asma bronkiale, asma alergi, COPD, ataupun keadaan hipersensitivitas tipe satu.

Hasil penelitian tahap 2 menggambarkan EMAT mampu menghambat edema kaki tikus yang diinduksi carrageenan baik pada fase awal maupun fase lambat, yang mengindikasikan EMAT beraktivitas antiinflamasi dengan mekanisme diduga menghambat mediator inflamasi histamin, serotonin dan juga menghambat COX2 sehingga prostaglandin dihambat.

Pada penelitian tahap 2 EMAT yang diberikan secara oral pada tikus dapat menghambat volume edema yang terjadi di telapak kaki tikus, hal ini menunjukkan EMAT terdistribusi sampai ke kaki tikus. Distribusi obat dalam tubuh tergantung pada kecepatan aliran darah. Organ atau jaringan tubuh dikelompokkan menjadi 2 kompartemen, jaringan yang banyak dialiri darah merupakan kompartemen 1 seperti otak, jantung, paru, ginjal, sedangkan otot dan tulang merupakan kompartemen 2. Obat yang didistribusi ke kompartemen 2 harus melalui kompartemen 1 (Trevor, *et al*, 2013). EMAT yang terdistribusi ke kaki tikus yang merupakan kompartemen 2 sudah pasti harus melalui kompartemen 1 seperti paru, jadi pada asma bronkiale atau asma alergi, edema yang terjadi di saluran napas diperkirakan juga dapat dihambat oleh EMAT seperti edema pada kaki tikus. Dugaan tersebut perlu dibuktikan dengan penelitian lanjutan secara *invivo* dengan menggunakan hewan yang diinduksi ovalbumin.

Pada asma bronkiale maupun asma alergi sel mast yang teraktivasi diketahui akan mengeluarkan berbagai mediator seperti histamin dan *platelet aggregating factor* yang berperan pada fase dini, *prostaglandin-D2* (PGD2), *Leukotrien-C4* (LTC4) dan *chemotactic factor* yang berperan pada fase lambat. Akibatnya, pada fase dini terjadi bronkospasme, edema dan hipersekresi bronkus (Murdoch and Lloyd, 2010). Telah diketahui sesak napas pada asma selain bronkokonstriksi saluran napas, diperparah pula oleh adanya edema dan hipersekresi mukus, sehingga menghalangi udara yang keluar masuk saluran napas. Pada asma alergi konsentrasi PGD2 di cairan *Broncho Alveolar Liquid* (BAL) meningkat, diketahui PGD2 yang berinteraksi dengan reseptor DP2 akan menimbulkan bronkokonstriksi (Peebles, 2018). EMAT yang berefek antiinflamasi di fase dini dan fase lambat induksi *carrageenan* pada kaki tikus (hasil tahap 2), menunjukkan dapat menghambat terbentuknya edema dengan mekanisme menghambat reaksi yang ditimbulkan oleh histamin serotonin serta menghambat COX2 sehingga pembentukan PG dihambat. Bila dihubungkan dengan aktivasi sel mast pada asma bronkiale maupun asma alergi, diduga EMAT dapat berefek antiinflamasi menghambat edema di saluran napas, dan menghambat PGD2 yang dilepas oleh sel mast. Dugaan tersebut perlu dibuktikan dengan penelitian lanjutan menggunakan hewan yang diinduksi ovalbumin.

Hasil penelitian tahap 3 membuktikan EMAT mampu menstabilkan membran sel darah merah tikus yang diinduksi hipotonisitas, Maji (2011) melaporkan senyawa dengan sifat menstabilkan membran dapat menjadi pelindung signifikan membran sel dari bahan toksik dan gangguan reaksi inflamasi fase awal melalui penghambatan pembentukan mediator inflamasi. Pada penelitiannya membuktikan bahan ekstrak yang menstabilkan membran sel darah merah tikus juga menstabilkan membran sel mast tikus yang diinduksi senyawa 48/80, sehingga menghambat degranulasi (Maji, et al, 2011). Analog

dengan penelitian Maji (2011), EMAT berefek menstabilkan membran sel darah merah tikus, yang merupakan model untuk menguji stabilitas membran lisosom maupun membran sel yang mensekresi isi granulnya, seperti sel mast. Meskipun struktur kimia membran sel dan sifatnya bervariasi dari satu lokasi ke yang lain, mereka memiliki fitur umum tertentu, yakni pada umumnya mempunyai tebal sekitar 7,5 nm (75 Å); Lipid utama adalah fosfolipid amphipathic, seperti *phosphatidylcholine*, *phosphotidylserine*, dan *phosphatidylethanolamine*; ada protein integral dan protein perifer yang jumlahnya disesuaikan dengan fungsi membran; serta skleton membran seperti spektrin dan *Dystrophin* yang menjaga integritas membran sel (Barrett *et al.*, 2012).

Analog juga dengan membran lisosom, stabilisasi membran sel darah merah tikus oleh EMAT mengindikasikan ekstrak mampu mencegah terjadinya cedera jaringan sehingga mencegah pelepasan PLA2 (Meyer *et al.*, 2005). Dengan menghambat PLA2 menyebabkan hambatan pada cyclooxygenase (COX) dan lypoxigenase (LOX) dan proses inflamasi selanjutnya (Yoon and Baek, 2005). Stabilisasi membran lisosom mencegah pelepasan isi lisosom, sehingga mencegah kerusakan jaringan dan respon inflamasi selanjutnya (Umapathy *et al.*, 2010).

Aktivitas EMAT sebagai antiinflamasi di fase awal respon inflamasi akut, baik dengan menghambat pembentukan edema maupun menstabilkan membran sel darah merah tikus mengindikasikan EMAT beraktivitas menghambat pelepasan mediator inflamasi histamin, serotonin, prostaglandin, dan menjaga integritas membran sel, sehingga mengcegah pelepasan isi lisosom dari sel neutrofil maupun mencegah degranulasi sel mast. Aktivitas antiinflamasi EMAT pada fase awal respon inflamasi penting agar tidak berlanjut ke inflamasi kronis.

Pada penyakit Inflamasi kronis seperti asma maupun rematik, meskipun leukosit yang direkrut ketempat inflamasi berbeda, apabila respon inflamasi akut dapat

teratasi dengan baik, maka inflamasi kronis juga dapat dicegah. Dengan demikian EMAT berpotensi mencegah terjadinya inflamasi kronis. Keuntungan EMAT dibandingkan obat antiinflamasi konvensional adalah: Kortikosteroid bersifat bimunosupresan sehingga pengguna jangka panjang akan menekan sistem imun, yang menyebabkan pengguna kortikosteroid mudah terkena infeksi baik infeksi jamur, bakteri atau virus. Walaupun penggunaan kortikosteroid secara inhaler, namun hanya pada dosis rendah dan menengah efek sampingnya sedikit, sedang pada dosis tinggi resiko efek samping bertambah (Raissy *et al.*, 2013). Sedangkan pada EMAT belum ada laporan efek samping. Pada umumnya efek samping pada tanaman obat sedikit karena kandungan metabolitnya yang banyak sehingga dapat saling menutupi.

Dari pembahasan tahap 1, 2 dan 3 mencerminkan EMAT memiliki efek bronkodilator sekaligus antiinflamasi. Sehingga EMAT berpotensi mengobati asma alergi, namun masih diperlukan pembuktian lebih lanjut atas efek EMAT sebagai antiinflamasi kronis.

Adanya aktivitas bronkodilator dan antiinflamasi pada EMAT tidak lain karena kandungan beberapa metabolit sekunder seperti saponin, polifenol, triterpenoid dan steroid (Kosala, 2015). Peneliti lain juga telah melaporkan metabolit sekunder yang sama pada ekstrak tanaman lain memiliki efek bronkorelaksasi atau antiinflamasi seperti telah dibahas di tahap 1, 2 dan 3. Oleh sebab itu untuk mengetahui metabolit sekunder yang paling aktif beraktivitas sebagai bronkodilator atau antiinflamasi, diperlukan penelitian lanjutan untuk mencari bahan aktif tersebut.

Sesuai dengan penggunaan dimasyarakat, akar Tambolekar digodok atau direndam dengan air, kemudian air rendaman atau godokan diminum. Untuk membuktikan air rendaman atau godokan akar Tambolekar berefek bronkodilator

dan antiinflamasi, maka diperlukan juga penelitian serupa yang menggunakan ekstrak air akar Tambolekar.

Penelitian tahap 1, 2 dan 3 masih menggunakan model hewan, dan merupakan uji pre klinik. Sebelum melanjutkan penelitian efek pada manusia perlu dilakukan uji toksisitas akut, sub kronis sampai kronis.

6.5 Keterbaruan Penelitian

Melalui penelitian ini diperoleh data ilmiah baru yang belum pernah ada sebelumnya yakni akar Tambolekar (*Coptosapelta flavescent Korth*), yang secara tradisional digunakan masyarakat Kalimantan untuk mengobati sesak, sakit gigi maupun rematik, brefek bronkodilator melalui mekanisme menghambat reseptor kolinergik, reseptor histamin, dan menstimulasi respor beta₂ adrenergik pada cincin bronkus guinea pig; brefek anti-inflamasi melalui mekanisme stabilisasi membran sel darah merah tikus; serta brefek pencegahan dan pengurangan volume edema pada respon inflamasi yang diinduksi oleh *carrageenan* pada telapak kaki tikus.

6.6 Keterbatasan Penelitian

Dalam melakukan penelitian ada beberapa keterbatasan yang dialami seperti: Standarisasi akar Tambolekar tidak dilaksanakan, karena budi daya tanaman Tambolekar tidak mungkin dilakukan dalam waktu pendek. Usaha untuk membuat dayakan Akar Tambolekar mengalami kendala karena kondisi lahan yang tidak sesuai dengan tempat asal tumbuhnya tanaman tambolekar.

BAB 7

KESIMPULAN dan SARAN

7.1 Kesimpulan Tahap 1

1. Aktivitas Bronkorelaksasi Ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescent Korth*) konsentrasi 2, 4 dan 6 mg/ml melalui antagonis reseptor kolinergik M_3 secara non kompetitif

2. Aktivitas Bronkorelaksasi Ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescent Korth*) konsentrasi 2, 3 dan 4 mg/ml melalui antagonis reseptor histamin₁ secara non kompetitif

7.2 Kesimpulan Tahap 2

1. Ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescent Korth*) dosis

600 dan 1200 mg/kg BB yang diberikan satu jam sebelum induksi *carrageenan* beraktivitas antiinflamasi; Dosis 600 mg/kg BB berefek di fase lanjut; Dosis 1200 mg/kg BB berefek di fase awal dan bersifat mencegah.

2. Ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescent Korth*) dosis 600 dan 1200 mg/kg BB yang diberikan saat induksi *carrageenan* beraktivitas antiinflamasi; Dosis 600 mg/kg BB berefek di fase lanjut; Dosis 1200 mg/kg BB berefek di fase awal dan bersifat mengobati.

3. Ekstrak metanol akar tambolekar (*Coptosapelta flavescent Korth*) dosis 1200 mg/kg BB yang diberikan satu jam setelah induksi *carrageenan* beraktivitas antiinflamasi dan berefek di fase lanjut dan bersifat mengobati.

7.3 Kesimpulan Tahap 3

Ekstrak metanol akar Tambolekar (*Coptosapelta flavesrens* Korth) beraktivitas antiinflamasi melalui stabilisasi membran RBC tikus dengan kekuatan lebih besar dibandingkan indometasin.

7.4 Kesimpulan Umum

1. Ekstrak metanol akar Tambolekar (*Coptosapelta flavesrens* Korth)

beraktivitas bronkodilator pada cincin bronkus guinea pig melalui mekanisme:

a. Antagonis non kompetitif pada reseptor kolinergik

b. Antagonis non kompetitif pada reseptor histamin

c. Agonis pada beta₂ adrenoseptor

2. Ekstrak metanol akar Tambolekar (*Coptosapelta flavesrens* Korth)

beraktivitas antiinflamasi menghambat volume edema kaki tikus yang diinduksi

carrageenan dengan menghambat mediator inflamasi fase awal dan fase lambat

3. Ekstrak metanol akar Tambolekar (*Coptosapelta flavesrens* Korth)

beraktivitas antiinflamasi dengan menstabilkan membran sel darah merah tikus

yang diinduksi hipotonisitas.

7.5 Saran

1. Penelitian ini merupakan penelitian pra klinik, masih diperlukan penelitian lanjutan untuk sampai ke uji klinik terutama uji toksisitas akut, subkronis dan kronis.

2. Untuk mengetahui akar Tambolekar berefek anti-inflamasi pada asma, diperlukan penelitian lebih lanjut menggunakan hewan yang diinduksi ovalbumin secara *in vivo*.

3. Perlu dilakukan budidaya tanaman Tambolekar untuk standarisasi akar Tambolekar yang digunakan dalam penelitian lanjutan.

4. Perlu penelitian lanjutan untuk mengkaji efek bronkodilator dan antiinflamasi dengan menggunakan ekstrak air akar Tambolekar

5. Perlu penelitian lanjutan untuk mencari metabolit sekunder yang paling aktif beraktivitas bronkodilator dan antiinflamasi.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman,A.H., Pillai, A. 2012. *Cellular and Molecular Immunology*. 7th ed. Elsevier Saunders, USA, p 16-19
- Abd-Allah AAM, Nasr El-Deen NAM, Mohamed WAM, Naguib FM. 2018. Mast cells and pro-inflammatory cytokines roles in assessment of grape seeds extract anti-inflammatory activity in rat model of carrageenan-induced paw edema. *Iran J Basic Med Sci*, **21**:97-107.
- Adesina S.K., Johnny I.I. and Olayiwola G. 2017. Plants in respiratory disorders I-anti-asthmatics, A Review. *British J of Pharmaceutical Research*; **16**(2): 1-22
- Agier, J. and Brzezińska-Błaszczyk, E. 2016. Cathelicidins and defensins regulate mast cell antimicrobial activity. *Europe PMC Plus*, **70**(0):618-636
- Agustina, R., Indrawati, D.T., Masruhin, M.A. 2015. Aktivitas ekstrak daun salam (*eugenia polyantha*) sebagai antiinflamasi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). *J. Trop. Pharm. Chem* **3**(2): 120
- Aits S. and Ja“a“ ttela“ M. 2013. Lysosomal cell death at a glance. *Journal of Cell Science*, **126**, 1905–1912 Published by The Company of Biologists Ltd doi: 10.1242/jcs.091181
- Ajiningrum, P.S., 2011. *Valuasi Potensi Keanekaragaman Jenis Hasil Hutan Non Kayu (HHNK) Masyarakat Lokal Dayak Lundayeh dan Uma’lung di Kabupaten Malinau Kalimantan Timur*. Tesis. Program Pascasarjana, Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok. p 68
- Akib, A.A.P. 2002. Asma pada Anak. *Sari Pediatri* **4**(2): 78 – 82
- Al'Amrie, A.F., Amir, M.M., Herman, S.P. 2011. “*Aktivitas Antioksidan Akar Merung (Coptosapelta tomentosa Valeton, K.Heyne) Terhadap Radikal Bebas DPPH*”. Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman. p 56
- Albuquerque, A.A.S., Carvalho, M.T.M., Evora, P.M., de Nadai, T.R., Celotto, A.C., Evora, P.R.B. 2016. *In vitro* reactivity (“organ chamber”) of guinea pig tracheal rings—methodology considerations. *Ann Transl Med* **4**(11): 216.

- Amin, K. 2011. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respiratory Medicine* **106**: 9-14.
- Anosike, C.A., Obidoa, O. and Ezeanyika, L.U. 2012. Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* **20**: 76.
- Aslam N and Janbaz KH. 2017. Antispasmodic and bronchorelaxant activities of *Salsola imbricata* are mediated through dual Ca^{+2} antagonistic and beta-adrenergic agonistic effects. *Pharm Biol*, **55**(1): 1131–1137.
- Awortwe, C., Sackeyfio, A.C., Osei-Safo, D., Bugyei, K.A., Asiedu-Gyekye, I.J. 2011. Full Length Research Paper, Dual effect of *Taraxacum officinale* leaves: Anticholinergic and inhibitory effect on inflammatory cells in ovalbumin-sensitized guinea-pigs. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **5**(23) : 2613-2619
- Bankova, L.G., Lai, J., Yoshimoto, E., Boyce, J.A., Austen, K.F., Kanaoka, Y. and Barrett, N.A. 2016. Leukotriene E4 elicits respiratory epithelial cell mucin release through the G protein-coupled receptor, GPR99. *Immunology and Inflammation* **113**(22): 6242-6247
- Barisione, G., Baroffio, M., Crimi, E., Brusasco, V. 2010. Review Beta-Adrenergic Agonists. *Pharmaceuticals* **3**: 1016-1044;
- Barnes, P.J. 2013. Theophylline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* : 901-906.
- Barrett, K.E., Boitano, S., Barman, S.M., Brooks, H.L. 2012. Ganong's Review of Medical Physiology, A Lange medical book, 24th edition, The McGraw-Hill Companies, p 621-624
- Bhatt, H.G., Agrawal, Y.K., Raval, H.G., Manna, K., Desai, P.R. 2010. Histamine H4 Receptor: A novel therapeutic target for immune and allergic responses. Mini Reviews. *Medicinal Chemistry* **10**(14): 1293-1308(16)
- Bos, I.S.T., Gosens, R., Zuidhof, A.B., Schaafsma, D., Halayko, A.J., Meurs, H., Zaagsma, J. 2007. Inhibition of allergen-induced airway remodelling by tiotropium and budesonide : a comparison. *Eur Respir J* **30**: 653–661

- Boskabady, M.H. and Aslani, M.R. 2005. Possible relaxant effects of thymoquinone on guinea pig tracheal chains. *Iranian Biomedical Journal* **9**(3): 123-128.
- Boskabady, M.H. and Moghaddas, A. 2004. Antihistaminic effect of bunium persicum on guinea pig tracheal chains. *Iranian Biomedical Journal* **8**(3): 149-155.
- Bousquet, J., Peter, K.J., William, W.B., Johnson, M., Antonio, M.V. 2000. "Asthma", From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **161**(5): 1720-1745.
- Bradding, P. 2007. Mast cell regulation of airway smooth muscle function in asthma. *European Respiratory Journal* **29**: 827-830.
- Brannan, J.D. and Lougheed, M.D. 2012. Airway hyperresponsiveness in asthma: mechanisms, clinical significance, and treatment. *Front Physiol* **3**: 460.
- Brown, S.M., Koarai, A., Sturton, R.G., Nicholson, A.G., Barnes, P.J., Donnelly, L.E. 2013. A role for M_2 and M_3 muscarinic receptors in the contraction of rat and human small airways. *European Journal of Pharmacology*, **702**(1-3): 109-115.
- Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. 2006. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of THERAPEUTICS. eleventh edition*. McGraw-Hill. Medical Publishing Division. New York Chicago San Francisco Lisbon London Madrid Mexico City Milan New Delhi. P 34-38
- Canning, B.J. 2006. Reflex regulation of airway smooth muscle tone. *J Appl Physiol* **101**: 971–985.
- Chung, K.F. 2003. Individual cytokines contributing to asthma pathophysiology: valid targets for asthma therapy? *Curr Opin Investig Drugs* **4**(11):1320-1326
- Dande, P.R., Talekar, V.S., Chakraborty, G.S. 2010. Evaluation of crude saponins extract from leaves of Sesbania sesban (L.) Merr. for topical anti-inflammatory activity. *Int. J. Res. Pharm. Sci* **1**(3) : 296-299.

- Darusman, L.K. 2004. FINAL TECHNICAL REPORT,The Potential of Medicinal Plants to Support Sustainable Forest Management: Ecological, Economic, and SOCiocultura. I Aspects, Bogor Indonesia
- Dekkers, B.G.J., Maarsingh, H., Meurs, H., Gosens, R. 2009. Airway structural components drive airway smooth muscle remodeling in asthma, *Proc Am Thoracic Soc* **8**:683-692
- Dhimas. 2015. Perbandingan Aktivitas Antioksidan 3 Fraksi Ekstrak Akar Tambolekar (*Coptosapelta flavesrens* Korth) dengan Curcumin Menggunakan Metode DPPH, Fakultas Kedokteran Unmul Samarinda. p 68
- Doan, T., Melvold, R., Viselli, S., Waltenbaugh, C. 2008. Lippincott's Illustrated Reviews: Immunology. Seri editor RA Harvey, PC Champe. Lippincott Williams and Wilkins. P 51-54; 196-198
- Donohue, J.F., Wise, R., Busse, W.W., Garfinkel, S., Zubek, V.B., Ghafouri, M., Manuel, R.C., Schlenker-Herceg, R. and Bleeker, E.R. 2016. Efficacy and safety of ipratropium bromide/albuterol compared with albuterol in patients with moderate-to-severe asthma: a randomized controlled trial. *BMC Pulmonary Medicine* **16**:65
- Evans, R.L., Nials, A.T., Knowles, R.G., Kidd, E.J., Ford, W.R., Broadley, K.J. 2012. A comparison of antiasthma drugs between acute and chronic ovalbumin-challenged guinea-pig models of asthma. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **25**(6): 453-464
- Fitzsimons, R., van der Poel, L-A., Thornhill, W. du Toit, G., Shah, N., Brough, H.A. 2015. Antihistamine use in children. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* **100**:122-131.
- George, A., Chinnappan, S., Chintamaneni, M., Kotak, C.V., Choudhary, Y., Kueper, T., Radhakrishnan, A.K. 2014. Anti-inflammatory effects of *Polygonum minus*(Huds) extract (Lineminus™) in in-vitro enzyme assays and carrageenan induced paw edema. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **14**:355

- Global Initiative for Ashma (GINA), 2017. Pocket Guide for Ashma Management and Prevention, A Pocket Guide for Health Professionals Updated. p 11-16
- Harahap, U., Husori, D.I., Marianne, Yuliasmi, S., Patilaya, P., Laila, L., Prasetyo, B.E., Wahyuni, H.S., Sumantri, I.B. 2017. Inhibitory effect of ethanolic extract of *Curanga fel-terrae* (pugun tano) leaves on acetylcholine muscarinic-3 receptors induced on isolated guinea pig tracheal. *Asian Pharm Clin Res* **10**(1): 95-98
- Hassan, H.S., Sule, M.I., Musa, A.M., Musa, K.Y., Abubakar, M.S., Hassan, A.S. 2012. Anti-Inflammatory activity of crude saponin extracts from five nigerian medicinal plants. *Afr J Tradit Complement Altern Med* **9**(2): 250-255.
- Heras, B.D.L. and Sonsoles, H. 2009. Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. *Inflamm & Allergy-Drug Targets* **8** (1) : 28-39(12)
- Heyne, K. 1987. "TUMBUHAN BERGUNA INDONESIA". jilid III, diterjemahkan oleh Badan Litbang Kehutanan Jakarta. hal 1763
- Hidayat, S. 2011. "Konservasi Ex Situ Tumbuhan Obat Di Kebun Raya Bogor", Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Hounkong, K., Sawangjaroen, N., Kongyen, W., Rukachaisirikul, V., Voravuthikunchai, S.P., Phongpaichit, S. 2014. Anti-intestinal protozoan activities of 1-hydroxy-2-hydroxymethylanthraquinone from *Coptosapelta flavescent*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* **4**(6): 457-462
- Husori, D.I., Harahap, U., Marianne, Yuliasmi, S., Patilaya, P., Laila, L. 2017. Preliminary study of ethanolic extract of pogun tano (*Picria fel-terrae* lour.) leaves on β_2 -adrenoceptors, histamine₁ receptors and muscarinic₃ acetylcholine receptors on isolated guinea-pig tracheal. *Journal of Pharmacy Research* **11**(10): 1279-1284.
- Johnson, M. 2006. Molecular mechanisms of β_2 -adrenergic receptor function, response, and regulation. *J Allergy Clin Immunol* **117**:18-24
- Jurenka, J.S. 2009. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: A Review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev* **14**(2) : 141-153.

- Kasahara, D.I., Perini, A., Lopes, F.D.T.Q.S., Arantes-Costa, F.M., Martins, M.A., Nunes, M.P.T. 2005. Effect of salbutamol on pulmonary responsiveness in chronic pulmonary allergic inflammation in guinea pigs. *Braz J Med Biol Res* **38**(5) 723-730
- Katzung, B.G. 2012. Basic Principles. In Katzung, B.G., Masters, S.B., Trevor, A.J. 2012. Basic & Clinical Farmakologi, 12 ed. McGraw-Hill. P 7-14
- Keyhanmanesh, R., Gholamnezhad, Z. and Boskabady, M.H. 2014, The relaxant effect of *Nigella sativa* on smooth muscles, its possible mechanisms and clinical applications. *Iran Journal of Basic Medical Sciences* **17**(12)
- Kolahian, S. and Gosens, R. 2012. Review Article Cholinergic Regulation of Airway Inflammation and Remodelling. *Journal of Allergy*. Hindawi Publishing Corporation, Article ID 681258, 9 pages
- Kongyen, W., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Sawangjaroen, N., Songsing, P., Madardam, H. 2014. Anthraquinone and naphthoquinone derivatives from the roots of *Coptosapelta flavescentia*, *Natural Product Communications* **9**(2):219-220
- Kosala, K. 2015. Uji fitokimia dan toksisitas fraksi ekstrak akar tambolekar (*Coptosapelta flavescentia* Korth) dengan reaksi warna dan Brine Shrimp Lethal Test, *Molucca Medica Jurnal Kedokteran dan Kesehatan* **8**(1) 98-104.
- Kosala, K., Sahid, Rosita, Jufriah, Saidah. 2012. "Laporan RISTOJA 2012 Kab. Paser Propinsi Kalimantan Timur" p 23
- Krystel-Whittemore M, Dileepan KN and Wood JG. 2016. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front. Immunol.* **6**:620. doi: 10.3389/fimmu.2015.00620
- Kumar V., Bhat Z.A., Kumar D., Bohra P., Sheela S. 2011. In-Vitro anti-inflammatory activity of leaf extracts of *Basella Alba* Linn. Var. Alba. *Int. J. Drug Dev. & Res.*, **3** (2): 176-179
- Kumar, S., Singh, L.R. and Sharma, B. 2018. Role of b2 adrenergic agonists and antihistaminics in asthma: an overview. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **7**(5): 338-351

- Lande, A.A., Ambavade, S.D., Swami, U.S., Adkar, P.P., Ambavade, P.D., Waghmare, A.B. 2015. Saponins isolated from roots of *Chlorophytum borivilianum* reduce acute and chronic inflammation and histone deacetylase. *Journal of Integrative Medicine* **13**(1): 25–33.
- Lim, H.D., M.van Rijn, R., Ling, P., Bakker, R.A., Thurmond, R.L., Leurs, R. 2005. Evaluation of histamine H1-, H2-, and H3-receptor ligands at the human histamine H4 receptor: Identification of 4-Methylhistamine as the first potent and selective H4 receptor agonist. *The J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **314**(3):1310–1321
- Limtrakul, P., Yodkeeree, S., Pitchakarn, P., Punfa, W. 2015. Suppression of inflammatory responses by Black rice Extract in RAW 264.7 Macrophage cells via downregulation of NF-kB and AP-1 signaling pathways. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **16**: 4277-4283
- Lin, K.W. 2005. Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Jah Hut peoples in Malaysia. *Indian J Med Sci* **59**(4).
- Lowe, A.P.P., Broadley, K.J., Nials, A.T., Ford, W.R., Kidd, E.J. 2014. Adjustment of sensitisation and challenge protocols restores functional and inflammatory responses to ovalbumin in guinea-pigs, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **10**.007
- Maji, A.K., Bhadra, S., Mahapatra, S., Banerji, P., Banerjee, D. 2011. Mast cell stabilization and membrane protection activity of *Barleria prionitis* L. *Pharmacognosy Journal*, **3** (24), p 67-71
- Malaysia Biodiversity Information System (MyBIS). *Coptosapelta flavesrens*. Available at <https://www.mybis.gov.my/sp/13820>. [Accessed 18 October 2018]
- Maruthamuthu, V. and Kandasamy, R. 2017. Bronchodilatory effect of *Myxopyrum serratulum* in animal model. *Bangladesh J Pharmacol* **12**: 84-90
- Masaru, I. and Yoshihisa, K. 2006. Muscarinic acetylcholine receptors. *Current Pharmaceutical Design* **12**(28): 3573-3581(9)
- Medzhitov, R. 2010. Inflammation 2010 : New adventures of an old flame. *Cell* **140**(6) : 771–776

- Meiyanti and Mulia, J.I. 2000. Perkembangan patogenesis dan pengobatan Asma Bronkial. *J Kedokter Trisakti* **19**(3): 125-132
- Meurs, H., Gosens, R., Zaagsma, J. 2008. Airway hyperresponsiveness in asthma: lessons from *in vitro* model systems and animal model DOI: 10.1183/09031936.00023608 Published 1 August 2008
- Meyer, M.C., Rastogi, P., Beckett, C.S., McHowat, J. 2005. Phospholipase A2 inhibitors as potential anti-inflammatory agents. *Curr Pharm Des* **11**(10)
- Moerad, E.B., Shem, N., Antasari, S., Yuniati, Fikriah, I., Kosala, K., Ismail, S. 2012. Laporan Penelitian Eksplorasi Potensi Tumbuhan Obat Indonesia Sebagai Antiasma. Lembaga Penelitian Universitas Mulawarman. P 14-16
- Mulroney, S.E. and Myers, A.K. 2009. Netter's Essential Physiology. Saunders, Elsevier Inc. p46-48
- Mulyoutami, E., Rismawan, R., Joshi, L. 2009. Local knowledge and management of simpukng (forest gardens) among the Dayak people in East Kalimantan, Indonesia. *Forest Ecol. Manage*, doi:10.1016/j.foreco.2009.01.042
- Murdoch, J.R. and Lloyd, C.M. 2010. Chronic inflammation and asthma. *Mutat Res* **690**(1-2): 24-39
- Murphy, K.P. 2012. Janeway's immunobiology 8th edition. Published by Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, London and New York. p 10-11; 82-84; 105-107
- Mutlu, G.M. and Factor, P. 2008. Translational Review, Alveolar Epithelial b2-Adrenergic Receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **38**: 127–134
- Myint, P.P., Kyi, M.M., Myint, S.H. and Ngwe, D.H. 2016. Investigation of phytochemical constituents and smooth muscle relaxation activity of various herbal plants in Myanmar. *Journal of Complementary and Alternative Medical Research* **1**(4): XXX-XXX, Article no.JOCAMR.29005
- Nakagome, K. and Nagata, M. 2011. Pathogenesis of airway inflammation in bronchial asthma. *Auris Nasus Larynx* **38**: 555–563
- Ouedraogo, N. and Roux, E. 2014. Physiology of airway contraction: An Overview. *J Pulm Respir Med* **4**:6

- Ozier, A., Bara, I., Girodet, P.O., Marthan, R., Berger, P. 2011. Pathophysiology of asthma. *La Revue Du Praticien [Rev Prat]* **61**(3): 339-345
- Panula, P., Chazot, P.L., Cowart, M., Gutzmer, R., Leurs, R., Liu, W.L.S., Stark, H., Thurmond, R.L., Haas, H.L. 2015. International union of basic and clinical pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors. *Pharmacol Rev* **67**:601–655
- Papadopoulos, N.G., Arakawa, H., Carlsen, K-H., Custovic, A., Gern, J., Lemanske, R., Le Souef, P., Mäkelä, M., Roberts, G., Wong, G., 2012 International consensus on (ICON) pediatric asthma. *Allergy* **67**(8): 976–997
- Paramita, S., Kosala, K., Dzulkifli, D., Saputri, D.I., Wijayanti, E. 2017. Anti-inflammatory activities of ethnomedicinal plants from Dayak Abai in North Kalimantan, Indonesia. *Biodiversitas* **18**(4): 1556-1561
- Peebles, R.S.Jr. 2018. Prostaglandins in asthma and allergic diseases. *Pharmacology & Therapeutics* **193**: 1–19
- Peters-Golden, M., and Henderson, W.R., 2007. Review Article, Mechanisms of disease, Leukotrienes, *The New England Journal of Medicine (N Engl J Med)*, **357**:1841-1854
- Puhl, A., Milton, F., Cvoro, A., Sieglaff, D., Campos, J., Bernardes, A., Filguiera, C., Lindemann, J.L., Deng, T., Neves, F., Polikarpov, I. and Webb, P. 2015. Mechanisms of peroxisome proliferator activated receptor γ regulation by non-steroidal antiinflammatory drugs. *Nucl Recept Sig* **13** (e004).
- Raissy, H.H., Kelly, H.W., Harkins, M. and Szeffler, S.J. 2013. Inhaled corticosteroids in lung diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **187**(8): 798-803
- Rang, H.P., Ritter, J.M., Flower, R.J., Henderson, G. 2016. Rang & Dale's Pharmacology, International Edition, eight edition. Elsevier Churchill Livingstone. P 6-15
- Ricciardolo, F.L.M. 2003. Occasional review, Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax* **58**:175-182

- Rorke, S., Jennison, S., Jeffs, J.A., Sampson, A.P., Arshad, H., Holgate, S.T. 2002. Role of cysteinyl leukotrienes in adenosine 5'-monophosphate induced bronchoconstriction in asthma. *British Thoracic Society Journal* **57**(4) :323-327
- Sano, Y., Adachi, M., Kiuchi, T., Miyamoto, T. 2006. Effects of nebulized sodium cromoglycate on adult patients with severe refractory asthma. *Respiratory Medicine* **100**, p 420–433
- Setiorini. 2015. *Deteksi Metabolit Sekunder Yang Bersifat Antioksidan Fraksi Ekstrak Akar Tambolekar (Coptosapelta flavesrens Korth) dengan Kromatografi Lapis Tipis*, Fakultas Kedokteran Unmul Samarinda. p 61
- Shaikh, R.U., Pund, M.M., Gacche, R.N. 2016. Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants used in Indian traditional medication system in vitro as well as in vivo. *J. of Trad and Complement Med* **6**: 355-361
- Sopi, R.B. and Khan, M.F.H. 2013. Bronchodilatory effect of ethanolic extract of the leaves of *Nyctanthes arbortristis*. *Pharmacognosy Res* **5**(3): 169–172
- Straßer, A., Wittmann, H-J., Marc Kunze, M., Elz, S., Seifert, R. 2009. Molecular basis for the selective interaction of synthetic agonists with the human histamine H1-Receptor compared with the guinea pig H1-Receptor. *Molecular Pharmacology* **75**(3) 454–465
- Su, Y-D., Cheng, C-H., Wen, Z-H., Wu, Y-C., Sung, P-J. 2016. New anti-inflammatory sterols from a gorgonian *Pinnigorgia* sp. *Bioorganic & Med Chem Lett* **26**(13) : 3060-3063
- Tae C.M., Befus, A.D., and Kulka, M. 2014. Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. *Frontiers in Immunology*, Vol 5
- Thurmond, R.L., Chen, B., Dunford, P.J., Eckert, W.A., Karlsson, L., La, D., Ward, P., Xu, X.L. and Greenspan, A.J. 2017. Pharmacology and Clinical Activity of Toreforant, a Histamine H₄ Receptor Antagonist. *Ann Pharmacol Pharm* **2**(2): 1013.

- Tran, T.V.A. and Tran, H. 2010. Study chemical constituents in anti inflammatory extracts of *Coptosapelta tomentosa*. *Y Hoc TP. Ho Chi Minh* **14** Supplement of No 1: 116–122
- Trevor, A.J., Katzung, B.G., Kruidering-Hall, M., Masters, S.B. 2013. *Pharmacology Examination & Board Review. Tenth Edition*, The McGraw-Hill Companies, p 156-158
- Umapathy, E., Ndebia, E.J., Meeme, A., Adam, B., Menziwa, P., Nkeh-Chungag, B.N., Iputo, J.E. 2010. An experimental evaluation of *Albuca setosa* aqueous extract on membrane stabilization, protein denaturation and white blood cell migration during acute inflammation, *J. of Med Plants Res* **4**(9): 789-795.
- Velez, T.E., Swartzendruber, J.A., Hulse, K.E. and Bryce, P.J. 2016. Regulation of B cell responses in allergy by histamine receptors. *AJ Immunol* **196** (1 Supplement) 123.13
- Wani SA, Iqbal H. and Basir SF. 2017. Mechanism of flavonoids action in smooth muscle relaxation. *World J Pharmacy and Pharm Sci*, **6**(9): 514-550
- Webb, R.C. 2003. Smooth Muscle Contraction And Relaxation. *Advances in Physiology Education* **27**(4): 201-206
- Witzenrath, M., Ahrens, B., Schmeck, B., Kube, S.M., Hippenstiel, S., Rousseau, S., Hamelmann, E., Suttorp, N., Schütte, H. 2008 Rho-kinase and contractile apparatus proteins in murine airway hyperresponsiveness, *Exp Toxicol Pathol* **60**(1):9-15
- Wojno, E.D.T., L A Monticelli, L.A. Tran, S.V., Alenghat, T. Osborne, L.C., Thome, J.J., Willis, C., Budelsky, A., Farber, D.L. and Artis, D. 2015. The prostaglandin D₂ receptor CRTH2 regulates accumulation of group 2 innate lymphoid cells in the inflamed lung. *Mucosal Immunology* **8**: 1313–1323
- Yoon, J-H. and Baek, S.J. 2005. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Medical Journal* **46**(5): 585 - 596
- Yu J. 2009. Airway Receptors and Their Reflex Function – *Invited Article*. In: Gonzalez C., Nurse C.A., Peers C. (eds) *Arterial Chemoreceptors*.

- Zampeli, E. and Tiligada, E. 2009. Review, The role of histamine H₄ receptor in immune and inflammatory disorders. *British Journal of Pharmacology* **157**: 24–33
- Zhang, J., Wang, H., Wang, T., Chong, Y., Yu, P., Lu, C., Xue, Y., Fu, F., Zhang, L. 2013. Anti-inflammatory activity of Yanshu spraying agent in animal models. *Experimental and Therapeutic Medicine* **5**: 73-76
- Zhang, M., Thurmond, R.L., Dunford, P.J. 2007. The histamine H₄ receptor: A novel modulator of inflammatory and immune disorders. *Pharmacology & Therapeutics* **113**(3): 594-606
- Zosky, G.R. and Sly, P.D. 2007. Animal models of asthma, *Clinical & Experimental Allergy* **37**(7): 973–988





Lampiran 1.

Ethical Clearance dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan FK Unmul

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS MULAWARMAN
Jl. Krayan Kampus Gunung Kelua Samarinda-KALTIM 75119
Telp: 0541 - 748581 / 748449 ; email : ppd@unmul.ac.id



**KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS MULAWARMAN
Samarinda**

SURAT PERSETUJUAN KELAYAKAN ETIK
NO. 43/KEPK-FK/V/2017

DIBERIKAN PADA PENELITIAN :

**Kajian Efek Ekstrak Metanol Akar Tambolekar (Coptosapelta flavesrens Korth)
Sebagai Antiinflamasi Dan Bronkodilator.**

Peneliti Utama : Khemasili Kosala
Nim : 117070100011057 (Universitas Brawijaya)

Samarinda, 30 Mei 2017



Ketua

Dr. dr. Sjarif Ismail, M.Kes

Anggota :

Dr. dr. Nataniel Tandirogang, M.Si, Dr.dr. Arie Ibrahim, Sp.BS (K)
Dr. dr. Swandari. Paramita, M.Kes, Dr. dr. Endang Sawitri, M.Kes
Dr. dr. Carta Gunawan, Sp.PD-KPTI, Dr. dr. Lily Pertiwi Kalalo, Sp.PK
Dr. dr. Yadi, M.Si, DR. drh. Gina Septiani, M.Si



Lampiran 2

Surat Keterangan Plagiasi

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia

Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755

<http://www.fk.ub.ac.id>

e-mail : sekr.fk@ub.ac.id

SURAT KETERANGAN

Nomor : 492 /UN10.F08.08/PN/2018

Berdasarkan pemindaian dengan perangkat lunak Turnitin, Badan Penerbitan Jurnal (BPJ)
Fakultas Kedokteran menyatakan bahwa Artikel Ilmiah berikut :

Judul : Kajian Efek Ekstrak Metanol Akar Tamboleker (*Coptosapelta flavesrens*
Korth) Sebagai Antiinflamasi Dan Bronkolidator

Penulis : Dra. Khemasili Kosala, Apt., SpFRS

NIM : 117070100011057

Jumlah Halaman : 168

Jenis Artikel : Disertasi (Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran)

Kemiripan : 3 %

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

12 OCT 2018

Ketua Badan Penerbitan Jurnal,

Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes
NIP. 19751125 200501 2 001



**KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS MULAWARMAN
FAKULTAS KEHUTANAN
LABORATORIUM DENDROLOGI DAN EKOLOGI HUTAN**

Alamat : Kampus Unmul Gunung Kelua, Jl. Ki Hajar Dewantara Samarinda 75123
Telp. (0541) 7013960, Email: lab_dendro_unmul@yahoo.co.id

Samarinda, 7 Juli 2014

Nomor : 09/UN17.4.3.08/LL/2014
Lampiran : -
Perihal : Hasil Identifikasi/Determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
Bpk./Ibu/Sdr(i). Dra. Khemasili, K.Apt., Sp. FRS
di-

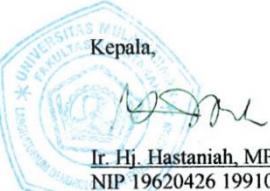
Samarinda

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang saudara kirimkan ke "Herbarium Mulawarman", Laboratorium Dendrologi dan Ekologi Hutan Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman Samarinda, adalah sebagai berikut:

Kingdom	:	Plantae
Division	:	Spermatophyta
Sub Division	:	Angiospermae
Class	:	Dicotyledonae
Sub Class	:	Sympetalae
Ordo	:	Rubiales
Family	:	Rubiaceae
Genus	:	Coptosapelta
Species	:	<i>Coptosapelta flavescens</i> Korth.

Demikian, semoga berguna bagi saudara.


Kepala,
Ir. Hj. Hastaniah, MP.
 NIP 19620426 199103 2 001

Tembusan:
Arsip

Lampiran 4

Pembuatan Larutan Ekstrak Metanol Akar Tambolekar

Untuk membuat 6 ml larutan ekstrak metanol akar tambolekar 10%

Timbang ekstrak 600 mg ditambah DMSO 600 µl,

setelah ekstrak larut ditambah etanol pa 600 µl,

lalu ditambah lagi aquabidest 4800 µl

Untuk membuat 6 ml larutan ekstrak metanol akar tambolekar 15%

Timbang ekstrak 900 mg ditambah DMSO 600 µl,

setelah ekstrak larut ditambah etanol pa 600 µl,

lalu ditambah lagi aquabidest 4800 µl

Untuk membuat 6 ml larutan ekstrak metanol akar tambolekar 20%

Timbang ekstrak 1200 mg ditambah DMSO 600 µl,

setelah ekstrak larut ditambah etanol pa 600 µl,

lalu ditambah lagi aquabidest 4800 µl

Untuk membuat 6 ml larutan ekstrak metanol akar tambolekar 30%

Timbang ekstrak 1800 mg ditambah DMSO 600 µl,

setelah ekstrak larut ditambah etanol pa 600 µl,

lalu ditambah lagi aquabidest 4800 µl

Lampiran 5**Pembuatan Larutan Atropin**

Untuk membuat 10 ml larutan stok Atropin Sulfat 10^{-2} M

Timbang 0,0695 g Atropin, tambahkan 10 ml aquabidest sampai larut sehingga diperoleh konsentrasi 10^{-2} M

Pipet 1 ml larutan Atropin 10^{-2} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-3} M

Pipet 1 ml larutan Atropin 10^{-3} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-4} M

Pipet 1 ml larutan Atropin 10^{-4} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-5} M



Lampiran 6

Untuk membuat 10 ml larutan stok Propanolol 10^{-2} M

Timbang 0,0296 g Propanolol, tambahkan 10 ml aquabidest sampai larut sehingga diperoleh konsentrasi 10^{-2} M.

Pipet 1 ml larutan Propanolol 10^{-2} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-3} M.

Pipet 1 ml larutan Propanolol 10^{-3} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-4} M.

Pipet 1 ml larutan Propanolol 10^{-4} M, tambahkan 1 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 5×10^{-5} M.

Pipet 1 ml larutan Propanolol 10^{-3} M, tambahkan 5,67 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 15×10^{-5} M.

Lampiran 7

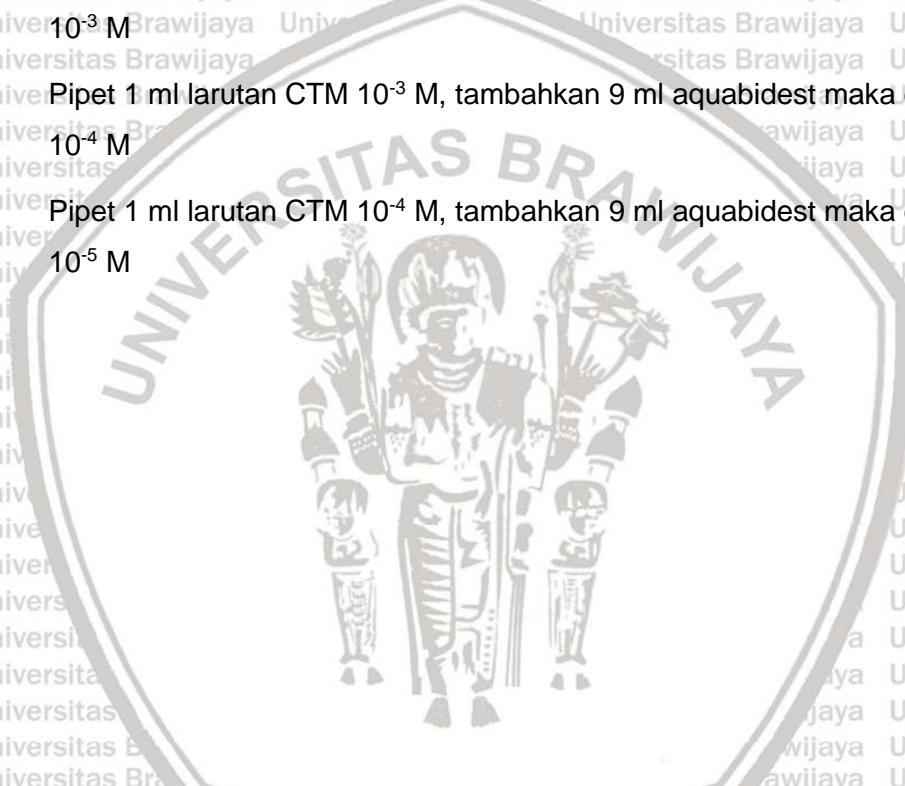
Untuk membuat 10 ml larutan stok CTM 10^{-2} M

Timbang 0,0390 g CTM, tambahkan 10 ml aquabidest sampai larut sehingga diperoleh konsentrasi 10^{-2} M

Pipet 1 ml larutan CTM 10^{-2} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-3} M

Pipet 1 ml larutan CTM 10^{-3} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-4} M

Pipet 1 ml larutan CTM 10^{-4} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-5} M



Lampiran 8

Untuk membuat 10 ml larutan stok Metakolin 10^{-1} M

Timbang 0,1957 g Metakolin, tambahkan 10 ml aquabidest diperoleh konsentrasi 10^{-1} M

Pipet 1 ml larutan Metakolin 10^{-1} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-2} M

Pipet 1 ml larutan Metakolin 10^{-2} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-3} M

Pipet 1 ml larutan Metakolin 10^{-3} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-4} M

Pipet 1 ml larutan Metakolin 10^{-4} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-5} M

Pipet 1 ml larutan Metakolin 10^{-5} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-6} M

Pipet 1 ml larutan Metakolin 10^{-6} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-7} M

Lampiran 9**Pembuatan Larutan Histamin**

Untuk membuat 10 ml larutan stok Histamin 10^{-1} M

Timbang 0,111 g Histamin, tambahkan 10 ml aquabidest sampai larut sehingga diperoleh konsentrasi 10^{-1} M

Pipet 1 ml larutan Histamin 10^{-1} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-2} M

Pipet 1 ml larutan Histamin 10^{-2} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-3} M

Pipet 1 ml larutan Histamin 10^{-3} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-4} M

Pipet 1 ml larutan Histamin 10^{-4} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-5} M

Pipet 1 ml larutan Histamin 10^{-5} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-6} M

Pipet 1 ml larutan Histamin 10^{-6} M, tambahkan 9 ml aquabidest maka diperoleh konsentrasi 10^{-7} M



Lampiran 10**Pembuatan Larutan Kreb's-Henseleit**

Untuk membuat 1 Liter Larutan Kreb's-Henseleit, timbang :

- NaCl	6,9 g
- KCl	0,35 g
- CaCl ₂	0,28 g
- MgSO ₄	0,29 g
- KH ₂ PO ₄	0,16 g
- NaHCO ₃	2,10 g
Glukosa	2,00 g

Masing-masing bahan diatas dilarutkan terpisah dalam aquabidest, campurkan berurutan sambil dikocok NaCl, KCl, MgSO₄, KH₂PO₄, NaHCO₃ dan Glukosa kedalam labu ukur 1 liter. Terakhir campurkan larutan CaCl₂. Tambahkan aquabidest sampai mencapai tanda pada leher labu ukur.

Ukur pH larutan, bila dibawah 7,4 maka ditambahkan NaOH pekat beberapa tetes sampai pH 7,4. Bila diatas 7,4 maka ditambahkan HCl pekat sampai pH 7,4

Larutan kemudian dialiri gas carbogen (95% O₂ dan 5% CO₂) sebelum digunakan.

Lampiran 11**Pemberian dosis metakolin kumulatif ke dalam organ bath berisi cincin bronkus**

Vol organi bath	Kons organ bath	log Kons akhir	Vol Met yg diberikan	Vol kum met	Kons Met
(ml)	M		(ml)	(ml)	M
10,01	1E-10	-10,0	0,010	0,010	1E-07
10,03	3E-10	-9,5	0,020	0,030	1E-07
10,1	1E-09	-9,0	0,070	0,100	1E-07
10,12	3E-09	-8,5	0,020	0,120	1E-06
10,19	1E-08	-8,0	0,070	0,190	1E-06
10,21	3E-08	-7,5	0,020	0,210	1E-05
10,28	1E-07	-7,0	0,070	0,280	1E-05
10,3	3E-07	-6,5	0,020	0,300	1E-04
10,37	1E-06	-6,0	0,070	0,370	1E-04
10,39	3E-06	-5,5	0,020	0,390	0,001
10,46	1E-05	-5,0	0,070	0,460	0,001
10,48	3E-05	-4,5	0,020	0,480	0,01
10,55	1E-04	-4,0	0,070	0,550	0,01
10,57	3E-04	-3,5	0,020	0,570	0,1
10,64	1E-03	-3,0	0,070	0,640	0,1

Lampiran 12**Pemberian dosis histamin kumulatif ke dalam organ bath berisi cincin bronkus**

Vol organi bath	Kons organ bath	log Kons akhir	Vol His diberikan	Vol kum His	Kons His
(ml)	M		(ml)	(ml)	M
10,01	1E-10	-10,0	0,010	0,010	1E-07
10,03	3E-10	-9,5	0,020	0,030	1E-07
10,1	1E-09	-9,0	0,070	0,100	1E-07
10,12	3E-09	-8,5	0,020	0,120	1E-06
10,19	1E-08	-8,0	0,070	0,190	1E-06
10,21	3E-08	-7,5	0,020	0,210	1E-05
10,28	1E-07	-7,0	0,070	0,280	1E-05
10,3	3E-07	-6,5	0,020	0,300	1E-04
10,37	1E-06	-6,0	0,070	0,370	1E-04
10,39	3E-06	-5,5	0,020	0,390	0,001
10,46	1E-05	-5,0	0,070	0,460	0,001
10,48	3E-05	-4,5	0,020	0,480	0,01
10,55	1E-04	-4,0	0,070	0,550	0,01
10,57	3E-04	-3,5	0,020	0,570	0,1
10,64	1E-03	-3,0	0,070	0,640	0,1

Lampiran 13**Pemberian dosis EMAT kumulatif ke dalam organ bath berisi cincin bronkus**

Vol organ bath (ml)	Kons organ bath mg/ml	log kons akhir	Vol EMAT	Vol Kum EMAT ml	Kons EMAT mg/ml
10,02	0,316	-0,5	0,020	0,020	200
10,03	0,562	-0,25	0,010	0,030	200
10,05	1,000	0	0,020	0,050	200
10,09	1,778	0,25	0,040	0,090	200
10,16	3,162	0,5	0,070	0,160	200
10,3	5,623	0,75	0,140	0,300	200
10,5	10,000	1	0,200	0,500	200



Lampiran 14

Persebahan Kontraksi Cincin Bronkus yang di Inkubasi EMAT 3 Konsentrasi dan diberi Metakolin Dosis Kumulatif

Log Kons	Persebahan Kontraksi Cincin Bronkus yang diberi metakolin														
	Met-KN (%)			Met-AS 2 μ M (%)			Met-EMAT10 (%)			Met-EMAT 20 (%)			Met-EMAT 30 (%)		
	Mean	SEM	Mean	Mean	SEM	P	Mean	SEM	P	Mean	SEM	P	Mean	SEM	P
-10	0,411	± 0,065	0,269	± 0,063	0,489	0,18	± 0,065	0,087	0,4	± 0,076	1	0,175	± 0,0241	0,078	
-9,5	0,857	± 0,14	0,527	± 0,057	0,153	0,312*	± 0,117	0,005	0,616	± 0,083	0,43	0,297*	± 0,0701	0,004	
-9	1,328	± 0,223	0,833	± 0,098	0,168	0,417*	± 0,16	0,002	1,207	± 0,133	0,978	0,432*	± 0,0999	0,003	
-8,5	1,491	± 0,227	1,168	± 0,106	0,605	0,560*	± 0,173	0,003	1,848	± 0,123	0,51	0,535*	± 0,129	0,002	
-8	2,315	± 0,203	1,982	± 0,203	0,682	0,706*	± 0,203	<0,001	2,954	± 0,12	0,116	0,667*	± 0,146	<0,001	
-7,5	5,629	± 0,123	3,147*	± 0,146	<0,001	0,853*	± 0,168	<0,001	3,521*	± 0,108	<0,001	0,833*	± 0,141	<0,001	
-7	16,916	± 1,029	4,439*	± 0,137	<0,001	1,177*	± 0,159	<0,001	4,113*	± 0,124	<0,001	1,027*	± 0,117	<0,001	
-6,5	38,516	± 1,305	7,186*	± 0,16	<0,001	4,855*	± 0,242	<0,001	4,565	± 0,087	<0,001	1,317*	± 0,104	<0,001	
-6	71,633	± 2,371	20,414*	± 1,64	<0,001	26,957*	± 2,199	<0,001	8,432*	± 0,721	<0,001	2,257*	± 0,101	<0,001	
-5,5	101,645	± 2,062	47,746*	± 1,712	<0,001	62,858*	± 1,866	<0,001	16,164*	± 1,191	<0,001	7,909*	± 0,266	<0,001	
-5	127,016	± 1,551	83,021*	± 1,456	<0,001	101,707*	± 1,679	<0,001	41,254*	± 1,803	<0,001	19,567*	± 1,731	<0,001	
-4,5	141,473	± 2,377	119,89*	± 2,373	<0,001	128,288*	± 2,21	<0,001	73,348*	± 0,247	<0,001	32,849*	± 1,44	<0,001	
-4	153,208	± 1,664	150,368	± 2,338	0,862	145,114	± 2,759	0,068	100,760*	± 1,874	<0,001	44,241*	± 1,28	<0,001	
-3,5	159,421	± 1,947	161,329	± 2,031	0,967	150,585	± 2,387	0,048	114,257*	± 1,91	<0,001	52,680*	± 2,241	<0,001	
-3	163,614	± 1,422	164,359	± 1,772	0,999	152,220*	± 2,310	0,002	118,230*	± 1,935	<0,001	57,186*	± 1,829	<0,001	
-2,5	163,106	± 1,294	164,069	± 1,776	0,999	151,755*	± 2,263	0,002	117,686*	± 1,879	<0,001	56,801*	± 1,789	<0,001	
Emak	163,614	± 1,422	164,359	± 1,772	0,999	152,220*	± 2,310	0,002	118,230*	± 1,935	<0,001	57,186*	± 1,829	<0,001	
EC50	1,7E-06	± 8E-08	0,00000934*	± 3E-07	<0,001	0,00000495*	± 1E-07	0,004	0,0000187*	± 3E-07	<0,001	0,000024*	± 1E-06	<0,001	
pD2	5,772	± 0,022	5,031*	± 0,016	<0,001	5,307*	± 0,012	<0,001	4,728*	± 0,007	<0,001	4,622*	± 0,020	<0,001	

Lampiran 15

Persen kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi DMSO-etanol 10% 200 ul 10 menit dikontraksi dengan metakolin secara kumulatif

log Kons met	Jumlah pengulangan respon kontraksi cincin bronkus (%)						Mean	±	SE
	I	II	III	IV	V	VI			
-10	0,187	0,452	0,526	0,628	0,300	0,371	0,411	±	0,0648
-9,5	0,469	1,355	0,964	1,099	0,699	0,557	0,857	±	0,14
-9	0,562	1,732	1,753	1,884	1,199	0,836	1,328	±	0,223
-8,5	0,562	1,807	1,928	2,041	1,399	1,207	1,491	±	0,227
-8	1,687	2,560	2,629	2,747	2,597	1,671	2,315	±	0,203
-7,5	5,623	5,798	5,784	5,965	5,495	5,107	5,629	±	0,123
-7	14,902	18,223	19,457	19,780	14,186	14,949	16,916	±	1,029
-6,5	35,426	40,136	41,017	42,779	36,364	35,376	38,516	±	1,305
-6	66,729	76,355	76,337	77,708	68,232	64,438	71,633	±	2,371
-5,5	95,783	108,358	104,119	105,495	98,901	97,214	101,645	±	2,062
-5	126,804	129,593	129,535	130,455	125,375	120,334	127,016	±	1,551
-4,5	137,301	145,256	146,626	147,331	139,361	132,962	141,473	±	2,377
-4	150,515	155,422	156,705	157,692	151,748	147,168	153,208	±	1,664
-3,5	160,356	163,630	164,680	159,184	157,143	151,532	159,421	±	1,947
-3	160,262	165,361	166,959	167,661	161,738	159,703	163,614	±	1,422
	160,169	164,608	166,433	166,562	161,439	159,424	163,106	±	1,294
Emaks	160,262	165,361	166,959	167,661	161,738	159,703	163,614	±	1,422
EC50	0,00000185	0,00000149	0,00000157	0,00000150	0,00000181	0,00000198	0,00000170	±	8,43E-08
pD2	5,733	5,828	5,804	5,823	5,743	5,703	5,772	±	0,0215

Lampiran 16

Persen kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi Atropin Sulfat 10^{-4} M 200 ul 10 menit dikontraksi dengan metakolin secara kumulatif

log Kons met	Jumlah pengulangan respon kontraksi cincin bronkus (%)						Mean	\pm	SE
	I	II	III	IV	V	VI			
-10	0,469	0,151	0,175	0,157	0,200	0,464	0,269	\pm	0,0627
-9,5	0,750	0,452	0,438	0,471	0,400	0,650	0,527	\pm	0,0571
-9	1,031	0,602	0,613	0,628	1,099	1,021	0,833	\pm	0,0981
-8,5	1,312	0,904	0,964	0,942	1,399	1,486	1,168	\pm	0,106
-8	2,249	1,506	1,578	1,570	2,298	2,693	1,982	\pm	0,203
-7,5	3,374	2,861	2,805	2,826	3,397	3,621	3,147	\pm	0,146
-7	4,873	4,142	4,119	4,160	4,695	4,643	4,439	\pm	0,137
-6,5	7,685	6,852	6,836	6,829	7,393	7,521	7,186	\pm	0,16
-6	23,149	16,114	16,652	17,739	23,576	25,255	20,414	\pm	1,64
-5,5	51,359	44,127	44,259	43,642	52,947	50,139	47,746	\pm	1,712
-5	84,724	80,572	80,018	79,199	87,912	85,701	83,021	\pm	1,456
-4,5	124,086	115,663	115,425	113,187	123,776	127,205	119,890	\pm	2,373
-4	156,232	145,633	145,311	144,584	155,944	154,503	150,368	\pm	2,338
-3,5	166,167	157,003	157,493	156,201	167,133	163,974	161,329	\pm	2,031
-3	169,916	160,994	160,736	159,969	168,432	166,110	164,359	\pm	1,772
	169,634	160,768	160,473	159,576	168,132	165,831	164,069	\pm	1,776
Emaks	169,916	160,994	160,736	159,969	168,432	166,110	164,359	\pm	1,772
EC50	0,00000905	0,00001003	0,00001001	0,00001011	0,00000853	0,00000828	0,00000934	\pm	3,36E-07
pD2	5,043	4,999	4,999	4,995	5,069	5,082	5,031	\pm	0,0158

Lampiran 17

Persen kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi EMAT 10% 200 ul 10 menit dikontraksi dengan metakolin secara kumulatif

log Kons met	Jumlah pengulangan respon kontraksi cincin bronkus (%)						Mean	±	SE
	I	II	III	IV	V	VI			
-10	0,469	0,075	0,263	0,078	0,100	0,093	0,180	±	0,0647
-9,5	0,843	0,151	0,438	0,157	0,100	0,186	0,312	±	0,117
-9	1,125	0,226	0,613	0,157	0,100	0,279	0,417	±	0,16
-8,5	1,312	0,452	0,789	0,235	0,200	0,371	0,560	±	0,173
-8	1,593	0,602	0,964	0,314	0,300	0,464	0,706	±	0,203
-7,5	1,593	0,753	1,052	0,471	0,599	0,650	0,853	±	0,168
-7	1,874	0,904	1,315	0,863	0,899	1,207	1,177	±	0,159
-6,5	5,061	4,066	5,697	5,259	4,496	4,550	4,855	±	0,242
-6	30,553	35,316	28,396	22,057	22,577	22,841	26,957	±	2,199
-5,5	66,635	60,090	65,381	68,603	57,942	58,496	62,858	±	1,866
-5	107,779	96,913	104,119	102,355	97,403	101,671	101,707	±	1,679
-4,5	134,489	121,762	134,882	128,493	125,774	124,327	128,288	±	2,21
-4	153,515	140,060	154,075	141,994	140,559	140,483	145,114	±	2,759
-3,5	157,638	146,310	157,844	145,055	146,154	150,511	150,585	±	2,387
-3	159,138	147,440	159,597	147,802	148,551	150,789	152,220	±	2,31
	158,575	146,988	159,071	147,645	148,851	149,396	151,755	±	2,263
Emaks	159,138	147,440	159,597	147,802	148,551	150,789	152,220	±	2,31
EC50	0,00000473	0,00000467	0,00000504	0,00000455	0,00000533	0,00000536	0,00000495	±	1,42E-07
pD2	5,325	5,331	5,297	5,342	5,274	5,271	5,307	±	0,0124

Lampiran 18

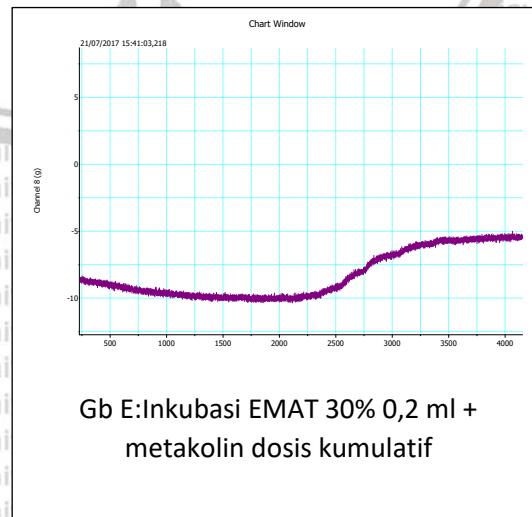
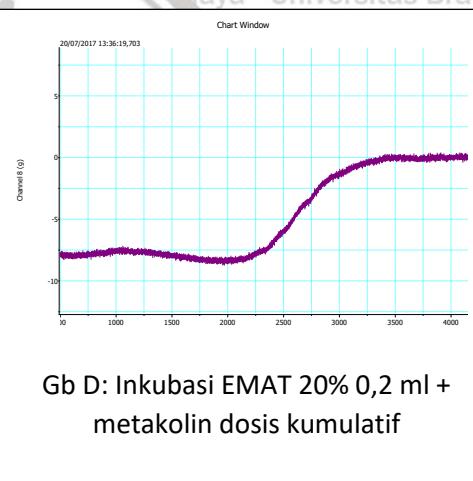
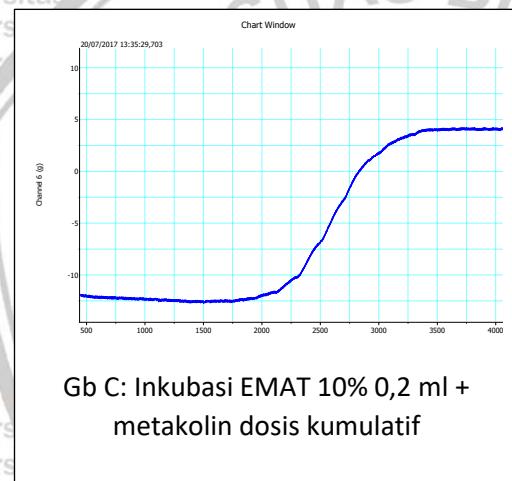
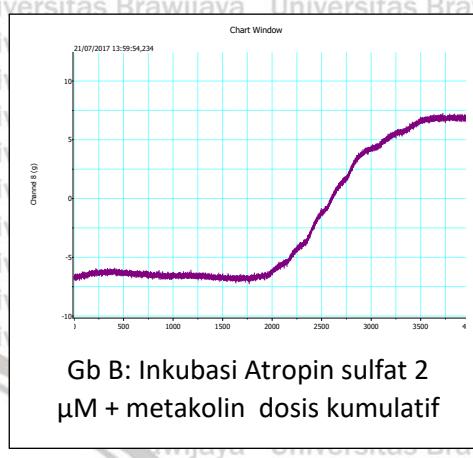
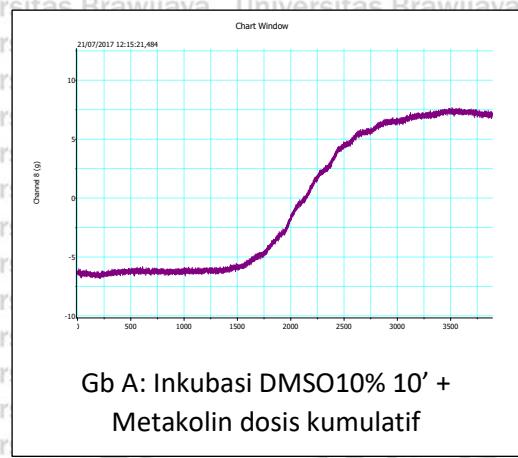
Persen kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi EMAT 20% 200 ul 10 menit dikontraksi dengan metakolin secara kumulatif

log Kons met	Jumlah pengulangan respon kontraksi cincin bronkus (%)						Mean	±	SE
	I	II	III	IV	V	VI			
-10	0,469	0,602	0,613	0,235	0,200	0,279	0,400	±	0,076
-9,5	0,656	0,828	0,876	0,471	0,400	0,464	0,616	±	0,0827
-9	1,312	1,581	1,578	0,942	0,899	0,929	1,207	±	0,133
-8,5	1,968	2,184	2,191	1,570	1,598	1,578	1,848	±	0,123
-8	3,187	3,238	3,243	2,669	2,697	2,693	2,954	±	0,12
-7,5	3,749	3,765	3,769	3,297	3,297	3,250	3,521	±	0,108
-7	4,217	4,443	4,470	3,846	3,896	3,807	4,113	±	0,124
-6,5	4,592	4,819	4,820	4,396	4,396	4,364	4,565	±	0,0873
-6	7,685	10,693	10,692	6,986	7,293	7,242	8,432	±	0,721
-5,5	18,182	19,880	18,230	13,344	13,886	13,463	16,164	±	1,191
-5	45,923	45,708	44,084	37,049	37,063	37,697	41,254	±	1,803
-4,5	73,571	74,021	72,217	73,312	73,427	73,538	73,348	±	0,247
-4	104,030	106,175	104,470	96,939	96,104	96,843	100,760	±	1,874
-3,5	114,433	120,708	119,106	110,283	110,889	110,121	114,257	±	1,91
-3	119,963	123,946	123,138	113,972	115,085	113,278	118,230	±	1,935
	118,369	123,645	122,612	113,344	114,685	113,463	117,686	±	1,879
Emaks	119,963	123,946	123,138	113,972	115,085	113,278	118,230	±	1,935
EC50	0,0000175	0,0000182	0,0000191	0,0000191	0,0000196	0,0000187	0,0000187	±	3,18E-07
pD2	4,758	4,741	4,718	4,718	4,707	4,728	4,728	±	0,00746

Lampiran 19

Persen kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi EMAT 30% 200 ul 10 menit dikontraksi dengan metakolin secara kumulatif

log Kons met	Jumlah pengulangan respon kontraksi cincin bronkus (%)						Mean	±	SE
	I	II	III	IV	V	VI			
-10	0,187	0,151	0,175	0,157	0,100	0,279	0,175	±	0,0241
-9,5	0,562	0,226	0,175	0,157	0,200	0,464	0,297	±	0,0701
-9	0,750	0,301	0,263	0,235	0,300	0,743	0,432	±	0,0999
-8,5	1,031	0,377	0,351	0,314	0,300	0,836	0,535	±	0,129
-8	1,218	0,452	0,438	0,471	0,400	1,021	0,667	±	0,146
-7,5	1,312	0,602	0,526	0,549	0,799	1,207	0,833	±	0,141
-7	1,312	0,904	0,613	0,942	0,999	1,393	1,027	±	0,117
-6,5	1,593	1,130	1,052	1,256	1,199	1,671	1,317	±	0,104
-6	2,530	1,958	2,191	2,355	1,998	2,507	2,257	±	0,101
-5,5	8,247	7,530	7,450	7,535	7,592	9,099	7,909	±	0,266
-5	23,899	16,114	18,668	16,327	16,583	25,812	19,567	±	1,731
-4,5	36,832	30,497	31,201	30,612	30,070	37,883	32,849	±	1,44
-4	48,641	41,491	42,682	43,250	41,658	47,725	44,241	±	1,28
-3,5	59,231	48,645	50,394	49,294	48,352	60,167	52,680	±	2,241
-3	62,980	52,636	55,127	53,846	55,944	62,581	57,186	±	1,829
	62,793	52,410	54,601	53,611	55,644	61,746	56,801	±	1,789
Emaks	62,980	52,636	55,127	53,846	55,944	62,581	57,186	±	1,829
EC50	0,0000222	0,0000241	0,0000243	0,0000244	0,0000287	0,0000202	0,0000240	±	1,16E-06
pD2	4,653	4,618	4,614	4,612	4,541	4,695	4,622	±	0,0208

Lampiran 20**Gambar respon cincin bronkus di inkubasi EMAT di kontraksi dengan Metakolin secara kumulatif**

Lampiran 21

Persen Kontraksi Cincin Bronkus yang di Inkubasi EMAT 3 Konsentrasi dan diberi Histamin Dosis Kumulatif

Log Kons	Persen Kontraksi Cincin Bronkus yang diinkubasi 3 konsentrasi EMAT dan diberi histamin dosis kumulatif																		
	His-KN (%)			His-CTM 1 μ M (%)			His-EMAT10 (%)			His-EMAT 15 (%)			His-EMAT 20 (%)						
	Mean	\pm	SEM	Mean	\pm	SEM	P	Mean	\pm	SEM	P	Mean	\pm	SEM	P				
-10	0,616	\pm	0,058	0,334*	\pm	0,045	0,026	0,481	\pm	0,068	0,547*	0,508	\pm	0,044	0,731	0,572	\pm	0,085	0,987
-9,5	1,484	\pm	0,061	0,685*	\pm	0,083	<0,001	1,807	\pm	0,138	0,156*	1,264	\pm	0,081	0,504	0,992*	\pm	0,101	0,011
-9	1,931	\pm	0,074	0,991*	\pm	0,110	<0,001	2,817*	\pm	0,119	<0,001	1,897	\pm	0,109	0,999	1,373*	\pm	0,130	0,011
-8,5	2,695	\pm	0,134	1,410*	\pm	0,097	<0,001	3,182*	\pm	0,047	0,022	2,533	\pm	0,113	0,804	1,635*	\pm	0,109	<0,001
-8	3,477	\pm	0,089	1,659*	\pm	0,080	<0,001	3,681	\pm	0,054	0,565	2,771*	\pm	0,109	<0,001	1,955*	\pm	0,129	<0,001
-7,5	4,964	\pm	0,084	2,43*	\pm	0,080	<0,001	4,996	\pm	0,086	0,999	3,160*	\pm	0,118	<0,001	2,285*	\pm	0,130	<0,001
-7	5,654	\pm	0,118	3,015*	\pm	0,075	<0,001	5,376	\pm	0,055	0,232	3,493*	\pm	0,114	<0,001	2,844*	\pm	0,081	<0,001
-6,5	6,505	\pm	0,084	4,046*	\pm	0,103	<0,001	5,942*	\pm	0,090	0,009	4,413*	\pm	0,132	<0,001	3,715*	\pm	0,121	<0,001
-6	7,494	\pm	0,163	4,943*	\pm	0,126	<0,001	6,306*	\pm	0,110	<0,001	4,923*	\pm	0,188	<0,001	4,014*	\pm	0,164	<0,001
-5,5	12,863	\pm	0,806	5,700*	\pm	0,131	<0,001	6,818*	\pm	0,128	<0,001	6,424*	\pm	0,191	<0,001	4,575*	\pm	0,101	<0,001
-5	25,707	\pm	0,861	10,766*	\pm	0,305	<0,001	10,224*	\pm	1,216	<0,001	9,313*	\pm	0,123	<0,001	6,174*	\pm	0,333	<0,001
-4,5	44,511	\pm	1,388	33,904*	\pm	1,510	<0,001	24,289*	\pm	1,076	<0,001	18,757*	\pm	1,175	<0,001	12,949*	\pm	0,890	<0,001
-4	90,514	\pm	1,392	60,236*	\pm	1,571	<0,001	69,755*	\pm	1,376	<0,001	59,317*	\pm	1,658	<0,001	35,902*	\pm	0,987	<0,001
-3,5	113,256	\pm	1,640	97,887*	\pm	1,834	<0,001	93,622*	\pm	1,360	<0,001	83,268*	\pm	1,216	<0,001	52,610*	\pm	1,579	<0,001
-3	119,356	\pm	1,567	117,924	\pm	1,622	0,964	98,223*	\pm	1,429	<0,001	86,684*	\pm	1,239	<0,001	57,445*	\pm	1,792	<0,001
-2,5	118,774	\pm	1,564	117,297	\pm	1,604	0,998	97,477*	\pm	1,566	<0,001	86,025*	\pm	1,282	<0,001	56,774*	\pm	1,566	<0,001
Emak	119,356	\pm	1,567	117,924	\pm	1,622	0,964	98,223*	\pm	1,429	<0,001	86,684*	\pm	1,239	<0,001	57,445*	\pm	1,792	<0,001
EC50	4,1E-05	\pm	1E-06	0,0000836*	\pm	3E-06	<0,001	0,0000641*	\pm	1E-06	<0,001	0,0000641*	\pm	2E-06	<0,001	0,0000745*	\pm	1,5E-06	<0,001
pD2	4,393	\pm	0,0106	4,079*	\pm	0,0131	<0,001	4,194*	\pm	0,0076	<0,001	4,162*	\pm	0,0118	<0,001	4,129*	\pm	0,00867	<0,001

Lampiran 22

Persen kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi DMSO-etanol 10% 200 ul 10 menit dikontraksi dengan histamin secara kumulatif

log Kons His	Jumlah pengulangan respon kontraksi cincin bronkus (%)						Mean	\pm	SE
	I	II	III	IV	V	VI			
10	0,499	0,713	0,430	0,554	0,705	0,793	0,616	\pm	0,058
-9,5	1,330	1,501	1,613	1,267	1,606	1,586	1,484	\pm	0,061
-9	1,663	2,026	2,043	1,742	2,076	2,039	1,931	\pm	0,074
-8,5	2,328	2,702	3,226	2,375	2,820	2,718	2,695	\pm	0,134
-8	3,159	3,602	3,548	3,246	3,682	3,624	3,477	\pm	0,089
-7,5	4,738	5,066	5,161	4,671	5,053	5,096	4,964	\pm	0,084
-7	5,403	5,741	6,022	5,226	5,758	5,776	5,654	\pm	0,118
-6,5	6,234	6,642	6,559	6,255	6,659	6,682	6,505	\pm	0,084
-6	7,066	7,880	7,204	7,126	7,873	7,814	7,494	\pm	0,163
-5,5	12,219	14,747	11,075	10,214	14,767	14,156	12,863	\pm	0,806
-5	24,688	27,617	25,054	22,249	27,340	27,293	25,707	\pm	0,861
-4,5	42,145	47,767	40,645	41,568	47,944	46,999	44,511	\pm	1,388
-4	86,118	93,508	89,032	87,411	93,694	93,318	90,514	\pm	1,392
-3,5	108,811	116,923	109,462	110,689	116,099	117,554	113,256	\pm	1,640
-3	114,131	122,402	120,323	114,964	122,914	121,404	119,356	\pm	1,567
	113,965	122,176	119,355	114,093	122,327	120,725	118,774	\pm	1,564
Emaks	114,131	122,402	120,323	114,964	122,914	121,404	119,356	\pm	1,567
EC50	0,00004062	0,00003860	0,00004492	0,00004183	0,00003915	0,00003828	0,0000406	\pm	0,00000103
pD2	4,391	4,413	4,348	4,379	4,407	4,417	4,393	\pm	0,0106

Lampiran 23

Persen kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi CTM 10^{-4} M 100 ul 10 menit dikontraksi dengan histamin secara kumulatif

log Kons His	Jumlah pengulangan respon kontraksi cincin bronkus (%)						Mean	\pm	SEM
	I	II	III	IV	V	VI			
-10	0,499	0,263	0,430	0,238	0,235	0,340	0,334	\pm	0,045
-9,5	0,831	0,450	0,860	0,554	0,509	0,906	0,685	\pm	0,083
-9	1,164	0,750	1,290	0,713	0,783	1,246	0,991	\pm	0,110
-8,5	1,663	1,276	1,613	1,108	1,214	1,586	1,410	\pm	0,097
-8	1,829	1,538	1,935	1,425	1,528	1,699	1,659	\pm	0,080
-7,5	2,660	2,326	2,688	2,296	2,233	2,378	2,430	\pm	0,080
-7	3,242	2,889	3,118	2,850	2,820	3,171	3,015	\pm	0,075
-6,5	4,323	3,865	4,301	3,800	3,799	4,190	4,046	\pm	0,103
-6	5,237	4,653	5,376	4,751	4,661	4,983	4,943	\pm	0,126
-5,5	5,902	5,478	5,914	5,305	5,484	6,116	5,700	\pm	0,131
-5	10,973	10,994	10,645	9,580	11,868	10,532	10,766	\pm	0,305
-4,5	38,321	31,220	38,065	31,512	29,651	34,655	33,904	\pm	1,510
-4	65,254	56,735	62,581	57,403	56,365	63,080	60,236	\pm	1,571
-3,5	101,579	93,433	103,441	94,141	94,046	100,680	97,887	\pm	1,834
-3	121,280	114,972	122,903	113,302	115,041	120,045	117,924	\pm	1,622
Emaks	121,280	114,972	122,903	113,302	115,041	120,045	117,924	\pm	1,622
EC50	0,0000754	0,00008956	0,00007933	0,00008518	0,00009145	0,00008079	0,0000836	\pm	2,53E-06
pD2	4,122	4,048	4,101	4,07	4,039	4,093	4,079	\pm	0,0131

Lampiran 24

Persen kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi EMAT 10% 200 ul 10 menit dikontraksi dengan histamin secara kumulatif

log Kons His	Jumlah pengulangan respon kontraksi cincin bronkus (%)						Mean	\pm	SE
	I	II	III	IV	V	VI			
-10	0,665	0,675	0,538	0,317	0,353	0,340	0,481	\pm	0,068
-9,5	2,161	2,064	2,043	1,584	1,293	1,699	1,807	\pm	0,138
-9	3,159	3,039	3,011	2,692	2,507	2,492	2,817	\pm	0,119
-8,5	3,325	3,265	3,226	3,009	3,094	3,171	3,182	\pm	0,047
-8	3,824	3,790	3,763	3,484	3,604	3,624	3,681	\pm	0,054
-7,5	5,237	5,103	5,161	4,751	4,740	4,983	4,996	\pm	0,086
-7	5,569	5,403	5,484	5,226	5,249	5,323	5,376	\pm	0,055
-6,5	6,234	6,116	6,022	5,859	5,758	5,663	5,942	\pm	0,090
-6	6,650	6,529	6,452	6,017	6,071	6,116	6,306	\pm	0,110
-5,5	7,149	7,054	7,097	6,572	6,580	6,455	6,818	\pm	0,128
-5	13,134	12,645	12,903	8,551	7,090	7,022	10,224	\pm	1,216
-4,5	27,681	26,341	25,806	22,407	22,092	21,404	24,289	\pm	1,076
-4	73,150	72,833	72,043	67,775	67,724	65,006	69,755	\pm	1,376
-3,5	97,007	96,848	95,591	91,686	91,696	88,901	93,622	\pm	1,360
-3	102,078	100,225	101,398	96,516	95,691	93,431	98,223	\pm	1,429
	101,746	99,737	100,968	95,249	94,751	92,412	97,477	\pm	1,566
Emaks	102,078	100,225	101,398	96,516	95,691	93,431	98,223	\pm	1,429
EC50	0,00006096	0,00006081	0,00006346	0,00006630	0,00006579	0,00006703	0,0000641	\pm	0,00000112
pD2	4,215	4,216	4,197	4,178	4,182	4,174	4,194	\pm	0,0076

Lampiran 25

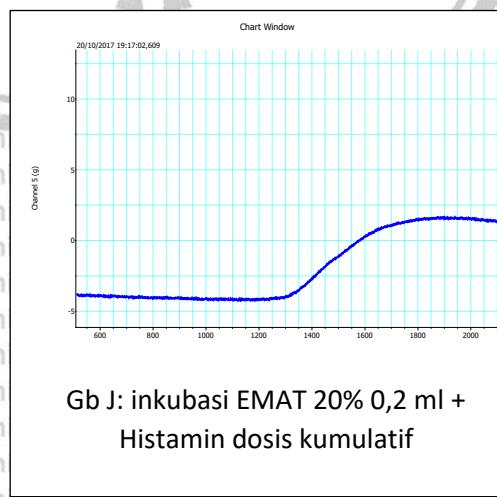
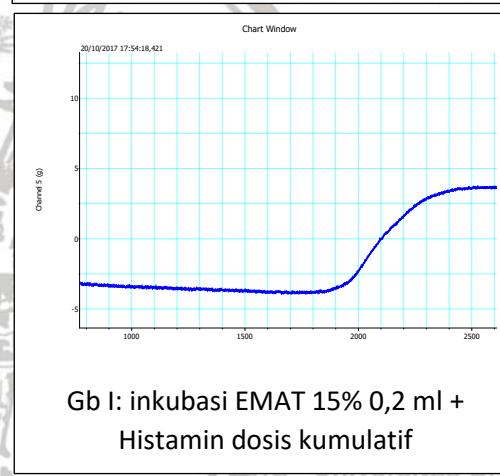
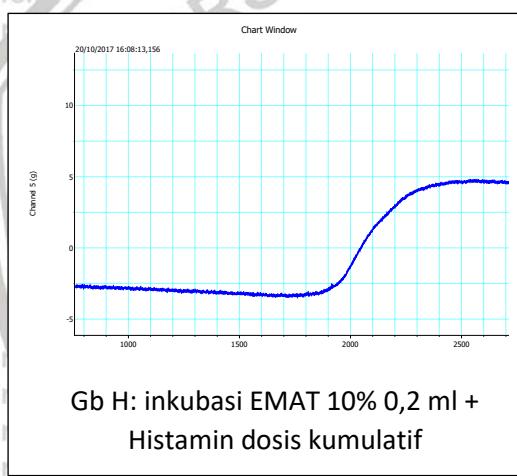
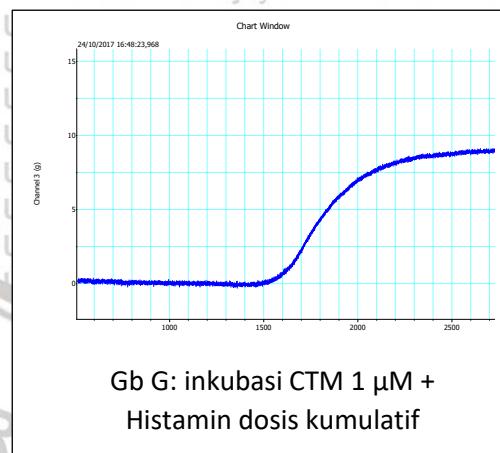
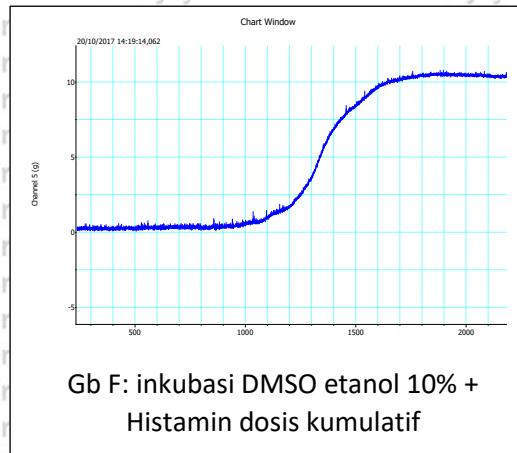
Per센 kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi EMAT 15% 200 ul 10 menit dikontraksi dengan histamin secara kumulatif

log Kons His	Jumlah pengulangan respon kontraksi cincin bronkus (%)						Mean	±	SE
	I	II	III	IV	V	VI			
-10	0,665	0,450	0,538	0,475	0,353	0,566	0,508	±	0,044
-9,5	1,496	1,426	1,398	1,108	1,136	1,019	1,264	±	0,081
-9	2,161	2,101	2,151	1,663	1,606	1,699	1,897	±	0,109
-8,5	2,826	2,814	2,688	2,217	2,272	2,378	2,533	±	0,113
-8	3,076	3,039	2,903	2,534	2,468	2,605	2,771	±	0,109
-7,5	3,408	3,415	3,441	2,850	2,899	2,945	3,160	±	0,118
-7	3,741	3,752	3,656	3,167	3,134	3,511	3,493	±	0,114
-6,5	4,738	4,728	4,624	4,276	4,034	4,077	4,413	±	0,132
-6	5,237	5,366	5,376	4,671	4,583	4,304	4,923	±	0,188
-5,5	6,816	6,829	6,882	6,176	5,954	5,889	6,424	±	0,191
-5	9,559	9,606	9,570	9,184	9,009	8,947	9,313	±	0,123
-4,5	21,197	21,051	21,828	16,706	15,903	15,855	18,757	±	1,175
-4	63,508	63,302	62,151	55,028	55,966	55,946	59,317	±	1,658
-3,5	86,617	85,966	85,269	80,523	80,259	80,974	83,268	±	1,216
-3	90,108	89,231	88,602	84,006	82,765	85,391	86,684	±	1,239
	89,609	88,818	87,957	83,215	82,295	84,258	86,025	±	1,282
Emaks	90,108	89,231	88,602	84,006	82,765	85,391	86,684		1,239
EC50	0,0000654	0,00006496	0,00006442	0,00007292	0,00007164	0,00007475	0,0000690	±	1,88E-06
pD2	4,184	4,187	4,191	4,137	4,145	4,126	4,162	±	0,0118

Lampiran 26

Persen kontraksi cincin bronkus yang di inkubasi EMAT 20% 200 ul 10 menit dikontraksi dengan histamin secara kumulatif

log Kons His	Jumlah pengulangan respon kontraksi cincin bronkus (%)						Mean	±	SE
	I	II	III	IV	V	VI			
-10	0,333	0,788	0,753	0,713	0,509	0,340	0,572	±	0,085
-9,5	1,081	1,201	1,183	1,108	0,588	0,793	0,992	±	0,101
-9	1,413	1,764	1,720	1,267	1,058	1,019	1,373	±	0,130
-8,5	1,579	1,839	2,043	1,584	1,293	1,472	1,635	±	0,109
-8	1,746	2,064	2,366	2,217	1,528	1,812	1,955	±	0,129
-7,5	2,244	2,589	2,581	2,454	1,802	2,039	2,285	±	0,130
-7	2,577	3,002	3,011	2,930	2,938	2,605	2,844	±	0,081
-6,5	3,491	4,090	3,871	3,959	3,369	3,511	3,715	±	0,121
-6	3,741	4,353	4,301	4,355	3,369	3,964	4,014	±	0,164
-5,5	4,406	4,803	4,839	4,751	4,348	4,304	4,575	±	0,101
-5	5,736	6,979	6,989	6,730	5,288	5,323	6,174	±	0,333
-4,5	10,474	15,422	14,516	14,568	12,182	10,532	12,949	±	0,890
-4	33,915	38,949	37,527	37,688	33,921	33,409	35,902	±	0,987
-3,5	47,215	55,985	55,914	56,057	49,863	50,623	52,610	±	1,579
-3	52,535	60,375	61,720	61,995	53,231	54,813	57,445	±	1,792
	52,203	60,450	60,108	60,095	53,427	54,360	56,774	±	1,566
Emaks	52,535	60,375	61,720	61,995	53,231	54,813	57,445	±	1,792
EC50	0,0000765	0,00006875	0,00007519	0,00007532	0,00007202	0,00007898	0,0000745	±	1,47E-06
pD2	4,116	4,163	4,124	4,123	4,143	4,103	4,129	±	0,00867

Lampiran 27**Gambar respon cincin bronkus di inkubasi EMAT + Histamin dosis kumulatif**

Lampiran 28

Perse Relaksasi Cincin Bronkus yang di Inkubasi Propanolol 3 Konsentrasi, Prekontraksi Metakolin lalu diberi EMAT dibandingkan Terhadap Perse Relaksasi Cincin Bronkus tanpa Inkubasi Propanolol

Log Kons (mg/ml)	Perse relaksasi cincin bronkus sebelum dan sesudah diinkubasi Propranolol											
	EMAT (%)			Pro 0,5 EMAT (%)			Pro 1,0 EMAT (%)			Pro 1,5 EMAT (%)		
	Mean	SEM	P	Mean	SEM	P	Mean	SEM	P	Mean	SEM	P
-0,5	-2,163	± 0,772		-2,621	± 0,183	-	-2,878	± 0,251	-	-2,991	± 0,285	-
-0,25	-9,031	± 2,098		-8,497	± 0,279	-	-6,668	± 0,372	-	-8,755	± 0,75	-
0	-46,127*	± 10,561		-16,127*	± 1,132	0,001	-13,974*	± 0,394	< 0,001	-19,314*	± 0,957	0,005
0,25	-103,970*	± 16,578		-59,103*	± 6,956	0,005	-40,827*	± 1,199	< 0,001	-52,710*	± 1,011	0,001
0,5	-124,124	± 17,955		-115,031	± 9,041		-94,339	± 1,752	0,171	-101,403	± 1,757	0,411
0,75	-134,534	± 19,332		-140,696	± 11,832	0,993	-123,634	± 1,624	0,94	-120,912	± 0,774	0,876
1	-143,928	± 20,302		-146,792	± 11,135	1	-131,763	± 1,059	0,919	-125,414	± 1,172	0,717
1,25	-146,482	± 21,033		-146,618	± 11,233	1	-131,033	± 1,068	0,843	-125,108	± 1,096	0,625
Emak	-146,482	± 21,033		-146,792	± 11,135	1	-131,763	± 1,059	0,919	-125,414	± 1,172	0,717
EC50	1,388*	± 0,104		2,008*	± 0,034	< 0,001	2,246*	± 0,0343	< 0,001	1,906*	± 0,023	< 0,001
pD2	-0,136*	± 0,0335		-0,302*	± 0,00734	< 0,001	-0,351*	± 0,0066	< 0,001	-0,280*	± 0,005	< 0,001

Lampiran 29

Respon kontraktilitas cincin bronkus diinkubasi aquabides, diprekontraksi dengan metakolin 2 μM (20 μl 10⁻³ M), diberi DMSO etanol 10% kumulatif

Log kons	Jumlah pengulangan respon kontraktilitas cincin bronkus (%)						Mean	\pm	SEM
	I	II	III	IV	V	VI			
-0,5	0,396	0,390	1,866	1,124	2,394	3,427	1,6	\pm	0,489
-0,25	0,462	1,105	2,305	5,393	2,431	4,234	2,655	\pm	0,761
0	0,859	3,056	2,909	7,416	2,799	6,653	3,949	\pm	1,034
0,25	1,057	5,462	3,403	7,865	3,610	8,065	4,91	\pm	1,122
0,5	1,387	7,607	4,116	8,989	4,457	8,468	5,837	\pm	1,22
0,75	1,519	8,973	4,226	9,213	5,083	9,677	6,449	\pm	1,361
1	2,048	9,493	4,336	9,663	5,120	10,685	6,891	\pm	1,437
2	2,035	9,250	4,254	9,457	5,095	10,075	6,694	\pm	1,364

Lampiran 30

Respon kontraktilitas cincin bronkus, diprekontraksi dengan metakolin 2 μM (20 μl 10⁻³ M), diberi EMAT secara kumulatif

Log Kons	Jumlah pengulangan respon relaksasi cincin bronkus (%)						Mean	\pm	SE
	I	II	III	IV	V	VI			
-0,5	-1,221	-5,479	-2,480	-0,706	-0,319	-2,778	-2,164	\pm	0,772
-0,25	-3,125	-15,525	-5,689	-5,176	-14,223	-10,450	-9,031	\pm	2,098
0	-20,947	-91,324	-52,079	-35,176	-24,462	-52,778	-46,128	\pm	10,56
0,25	-57,031	-171,233	-126,769	-94,941	-73,984	-99,868	-103,971	\pm	16,58
0,5	-68,945	-198,630	-141,503	-124,353	-98,884	-112,434	-124,125	\pm	17,96
0,75	-75,488	-215,753	-148,724	-138,941	-107,928	-120,370	-134,534	\pm	19,33
1	-84,766	-230,822	-151,787	-155,529	-118,845	-121,825	-143,929	\pm	20,3
Emaks	-87,500	-237,900	-153,683	-157,176	-120,279	-122,354	-146,482	\pm	21,03
EC50	1,569	1,224	1,157	1,641	1,630	1,092	1,385	\pm	0,104
pD2	-0,196	-0,088	-0,063	-0,215	-0,212	-0,038	-0,135	\pm	0,033

Lampiran 31

Respon kontraktilitas cincin bronkus diinkubasi propranolol 0,5 μM (100 $\mu\text{l } 5 \times 10^{-5} \text{ M}$), diprekontraksi dengan metakolin 2 μM (20 $\mu\text{l } 10^{-3} \text{ M}$), diberi EMAT secara kumulatif

Log kons	Jumlah pengulangan respon relaksasi cincin bronkus (%)						Mean	\pm	SE
	I	II	III	IV	V	VI			
-0,5	-3,159	-2,649	-2,385	-3,154	-2,138	-2,240	-2,621	\pm	0,183
-0,25	-7,848	-7,586	-8,561	-8,905	-8,640	-9,440	-8,497	\pm	0,279
0	-16,683	-16,255	-13,683	-19,666	-12,233	-18,240	-16,127	\pm	1,132
0,25	-66,091	-53,402	-56,450	-89,425	-48,129	-41,120	-59,103	\pm	6,956
0,5	-124,975	-115,593	-113,683	-151,206	-95,131	-89,600	-115,031	\pm	9,041
0,75	-144,669	-148,224	-133,268	-190,353	-122,862	-104,800	-140,696	\pm	11,832
1	-152,567	-153,341	-137,568	-194,249	-125,267	-117,760	-146,792	\pm	11,135
Emaks	-152,567	-153,341	-137,568	-194,249	-125,267	-117,760	-146,792	\pm	11,135
EC50	1,916	2,114	1,939	1,947	2,066	2,064	2,008	\pm	0,034
pD2	-0,282	-0,325	-0,287	-0,289	-0,315	-0,314	-0,302	\pm	0,00734

Lampiran 32

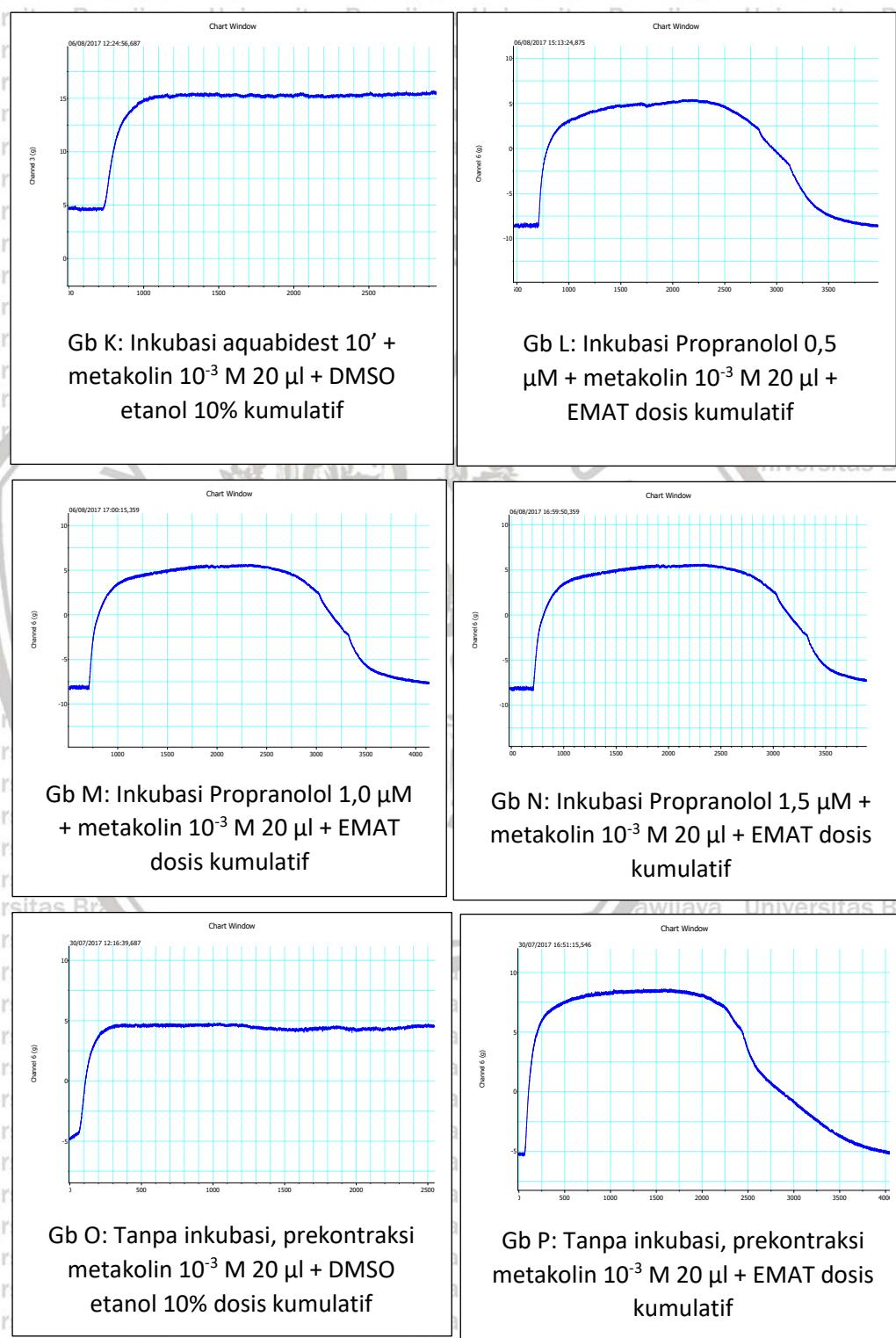
Respon kontraktilitas cincin bronkus diinkubasi propranolol $1,0 \mu\text{M}$ ($100 \mu\text{l } 10^{-4} \text{ M}$), diprekontraksi dengan metakolin $2 \mu\text{M}$ ($20 \mu\text{l } 10^{-3} \text{ M}$), diberi EMAT secara kumulatif

Log kons	Jumlah pengulangan respon relaksasi cincin bronkus (%)						Mean	\pm	SE
	I	II	III	IV	V	VI			
-0,5	-2,738	-2,866	-3,913	-2,338	-2,230	-3,183	-2,878	\pm	0,251
-0,25	-6,670	-6,096	-7,649	-5,216	-7,507	-6,868	-6,668	\pm	0,372
0	-13,141	-13,694	-13,056	-15,108	-13,603	-15,243	-13,974	\pm	0,394
0,25	-41,065	-38,626	-38,634	-46,223	-38,875	-41,541	-40,827	\pm	1,199
0,5	-98,457	-90,582	-91,249	-98,381	-89,544	-97,822	-94,339	\pm	1,752
0,75	-122,549	-127,389	-119,210	-126,079	-127,651	-118,928	-123,634	\pm	1,624
1	-130,463	-132,803	-128,388	-135,791	-130,302	-132,831	-131,763	\pm	1,059
	-130,314	-132,257	-127,179	-135,072	-130,055	-131,323	-131,033	\pm	1,068
Emaks	-130,463	-132,803	-128,388	-135,791	-130,302	-132,831	-131,763	\pm	1,059
EC50	2,158	2,355	2,269	2,178	2,330	2,188	2,246	\pm	0,0343
pD2	-0,334	-0,372	-0,355	-0,338	-0,367	-0,340	-0,351	\pm	0,0066

Lampiran 33

Respon kontraktilitas cincin bronkus diinkubasi propranolol 1,5 μM (100 μl $15 \times 10^{-5} \text{ M}$), diprekontraksi dengan metakolin 2 μM (20 μl 10^{-3} M), diberi EMAT secara kumulatif

Log kons	Jumlah pengulangan respon relaksasi cincin bronkus (%)						Mean	\pm	SE
	I	II	III	IV	V	VI			
-0,5	-2,238	-3,067	-2,478	-3,899	-2,525	-3,743	-2,991	\pm	0,285
-0,25	-7,600	-7,604	-6,739	-8,577	-11,082	-10,928	-8,755	\pm	0,75
0	-18,896	-18,403	-15,758	-19,298	-22,721	-20,808	-19,314	\pm	0,957
0,25	-52,056	-50,990	-50,000	-51,657	-55,869	-55,689	-52,71	\pm	1,011
0,5	-99,948	-99,744	-95,391	-100,780	-104,918	-107,635	-101,403	\pm	1,757
0,75	-120,406	-119,553	-119,822	-120,468	-120,525	-124,701	-120,912	\pm	0,774
1	-122,384	-124,601	-122,448	-127,096	-126,164	-129,790	-125,414	\pm	1,172
Emaks	-122,384	-124,601	-122,448	-127,096	-126,164	-129,790	-125,414	\pm	1,172
EC50	1,888	1,934	1,982	1,944	1,827	1,863	1,906	\pm	0,0234
pD2	-0,276	-0,286	-0,297	-0,288	-0,261	-0,270	-0,280	\pm	0,00535

Lampiran 34**Gambar respon cincin bronkus di inkubasi propranolol, prekontraksi metakolin diberi EMAT dosis kumulatif**

Lampiran 35**Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus 1 jam sebelum induksi Carrageenan Diberi CMC dan Indometasin**

Persen peningkatan volume edema 1 jam sebelum induksi carrageenan diberi CMC

0,5%

Interval waktu (jam)	Jumlah pengulangan pada kaki tikus (%)					Mean	± SEM
	I	II	III	IV	V		
0	42,11	38,02	28,38	35,96	40,45	36,98	± 2,392
1	49,68	44,63	36,97	40,35	50,56	44,44	± 2,622
2	60,75	55,59	48,56	53,51	58,43	55,37	± 2,100
3	65,42	58,68	52,67	65,79	55,06	59,52	± 2,662
4	59,63	57,85	44,87	59,65	47,19	53,84	± 3,225
5	52,12	48,76	35,08	51,75	37,08	44,96	± 3,685
6	52,03	48,57	34,99	48,25	43,82	45,53	± 2,940
24	25,26	26,45	16,48	29,82	16,85	22,97	± 2,681

Persen peningkatan volume edema 1 jam sebelum induksi carrageenan diberi Indometasin 20 mg/kgBB

Interval waktu (jam)	Jumlah pengulangan pada kaki tikus (%)					Mean	± SEM
	I	II	III	IV	V		
0	21,28	24,24	14,94	17,93	18,47	19,37	± 1,579
1	23,40	19,86	19,41	22,76	19,75	21,04	± 0,845
2	30,66	23,28	30,29	30,34	26,11	28,14	± 1,477
3	28,50	21,28	28,47	27,59	22,93	25,75	± 1,521
4	21,28	16,31	20,59	21,38	15,92	19,10	± 1,225
5	15,44	12,06	14,76	16,55	13,38	14,44	± 0,787
6	12,89	7,38	8,06	11,03	8,92	9,66	± 1,016
24	5,80	2,71	3,53	4,14	3,18	3,87	± 0,535

Lampiran 36**Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus 1 jam sebelum induksi Carrageenan Diberi EMAT 3 Dosis****Persen peningkatan volume edema 1 jam sebelum induksi carrageenan diberi EMAT1**

Interval waktu (jam)	I	II	III	IV	V	Mean	\pm	SEM
0	6,96	10,00	8,94	9,02	9,16	8,82	\pm	0,502
1	28,70	30,00	24,39	30,33	25,19	27,72	\pm	1,234
2	38,87	32,86	30,46	35,25	32,82	34,05	\pm	1,423
3	36,13	28,71	30,08	30,33	29,01	30,85	\pm	1,355
4	27,78	25,00	24,89	26,23	22,90	25,36	\pm	0,807
5	28,70	28,57	29,27	29,51	25,95	28,40	\pm	0,636
6	48,30	42,00	47,22	49,18	41,22	45,59	\pm	1,657
24	15,87	11,29	10,32	10,66	10,69	11,76	\pm	1,038

Persen peningkatan volume edema 1 jam sebelum induksi carrageenan diberi EMAT2

Interval waktu (jam)	I	II	III	IV	V	Mean	\pm	SEM
0	13,53	10,34	8,62	11,90	12,59	11,40	\pm	0,868
1	24,81	20,00	22,41	25,40	20,74	22,67	\pm	1,071
2	30,83	25,52	28,45	31,75	26,67	28,64	\pm	1,186
3	27,82	24,83	25,00	27,78	24,44	25,97	\pm	0,750
4	20,30	17,93	16,38	20,63	17,04	18,46	\pm	0,859
5	12,02	11,97	11,24	14,29	10,37	11,98	\pm	0,650
6	8,77	8,59	10,79	11,11	7,41	9,33	\pm	0,703
24	2,26	1,69	2,45	3,97	2,96	2,66	\pm	0,384

Persen peningkatan volume edema 1 jam sebelum induksi carrageenan diberi EMAT3

Interval waktu (jam)	I	II	III	IV	V	Mean	\pm	SEM
0	17,11	23,62	15,23	19,86	21,74	19,51	\pm	1,518
1	13,16	12,24	13,23	14,38	14,49	13,50	\pm	0,421
2	8,89	10,24	9,60	10,27	9,42	9,68	\pm	0,260
3	15,53	19,98	12,26	17,12	15,94	16,17	\pm	1,250
4	13,87	17,98	11,28	15,07	13,77	14,39	\pm	1,088
5	10,26	9,75	6,96	9,59	9,42	9,20	\pm	0,576
6	6,61	8,60	5,97	6,85	7,25	7,05	\pm	0,438
24	3,32	5,09	2,65	3,42	2,90	3,47	\pm	0,427

Lampiran 37**Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus Saat induksi Carrageenan Diberi CMC dan Indometasin**

Persen peningkatan volume edema saat induksi carrageenan diberi CMC 0,5%

Interval waktu (jam)	I	II	III	IV	V	Mean	\pm	SEM
0	18,24	19,59	28,53	21,48	15,69	20,71	\pm	2,171
1	26,14	29,36	41,32	29,63	26,47	30,58	\pm	2,777
2	32,96	35,21	44,32	34,81	32,35	35,93	\pm	2,164
3	37,18	38,95	48,89	38,52	38,24	40,36	\pm	2,154
4	25,99	34,98	40,74	27,41	33,33	32,49	\pm	2,674
5	19,24	23,36	31,53	19,26	26,47	23,97	\pm	2,327
6	27,56	28,27	44,63	27,41	32,35	32,05	\pm	3,274
24	10,10	9,53	18,10	9,63	12,75	12,02	\pm	1,63

Persen peningkatan volume edema saat induksi carrageenan diberi Indometasin 20 mg/kg BB

Interval waktu (jam)	I	II	III	IV	V	Mean	\pm	SEM
0	22,94	16,20	28,65	27,52	11,86	21,44	\pm	3,244
1	31,28	19,60	29,81	33,03	16,95	26,13	\pm	3,276
2	26,28	16,00	20,19	27,52	11,86	20,37	\pm	2,979
3	30,53	20,00	29,81	11,93	7,63	19,98	\pm	4,612
4	20,10	10,20	18,19	9,17	5,93	12,72	\pm	2,733
5	10,09	8,00	11,38	5,50	3,39	7,67	\pm	1,463
6	5,62	4,40	6,50	3,67	2,54	4,55	\pm	0,699
24	7,59	4,20	8,35	1,83	1,69	4,73	\pm	1,398

Lampiran 38**Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus Saat induksi Carrageenan Diberi EMAT 3 Dosis**

Persen peningkatan volume edema **saat induksi carrageenan** diberi EMAT1 300 mg/kg BB

Interval waktu (jam)	Jumlah pengulangan pada kaki tikus (%)					Mean	± SEM
	I	II	III	IV	V		
0	14,43	9,81	10,46	13,24	11,72	11,93	± 0,856
1	21,57	20,31	18,34	21,32	17,93	19,90	± 0,752
2	25,00	22,66	22,22	25,74	20,69	23,26	± 0,927
3	26,29	31,59	27,45	30,88	24,83	28,21	± 1,31
4	22,14	27,69	22,92	25,74	20,69	23,83	± 1,266
5	20,71	21,88	19,61	21,32	17,93	20,29	± 0,7
6	35,86	41,66	36,99	40,44	34,48	37,88	± 1,365
24	13,00	18,44	12,46	16,18	11,03	14,22	± 1,348

Persen peningkatan volume edema **saat induksi carrageenan** diberi EMAT2 600 mg/kg BB

Interval waktu (jam)	Jumlah pengulangan pada kaki tikus (%)					Mean	± SEM
	I	II	III	IV	V		
0	11,87	12,43	13,24	12,40	11,72	12,33	± 0,267
1	15,03	19,00	19,14	17,05	16,55	17,36	± 0,775
2	15,26	19,66	18,80	18,60	16,79	17,82	± 0,793
3	17,74	17,14	18,10	22,48	13,10	17,71	± 1,491
4	15,81	13,57	11,21	17,83	8,97	13,48	± 1,579
5	11,29	12,14	10,34	14,73	6,21	10,94	± 1,391
6	4,65	4,14	6,76	8,53	2,76	5,37	± 1,018
24	-2,63	-1,53	-1,72	2,33	1,38	-0,44	± 0,964

Persen peningkatan volume edema **saat induksi carrageenan** diberi EMAT3 1200 mg/kg BB

Interval waktu (jam)	Jumlah pengulangan pada kaki tikus (%)					Mean	± SEM
	I	II	III	IV	V		
0	17,00	18,90	13,00	16,13	15,70	16,15	± 0,959
1	16,83	15,75	16,45	15,72	14,45	15,84	± 0,407
2	5,00	5,09	3,67	4,03	3,31	4,22	± 0,356
3	17,33	13,60	14,17	16,94	14,05	15,22	± 0,791
4	14,67	11,45	13,33	14,52	11,57	13,11	± 0,692
5	7,83	8,94	10,50	9,68	6,61	8,71	± 0,684
6	7,33	5,36	7,17	6,45	4,96	6,25	± 0,475
24	5,17	5,36	5,17	6,45	4,13	5,26	± 0,369

Lampiran 39**Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus 1 jam Setelah induksi Carrageenan Diberi CMC dan Indometasin**

Interval waktu (jam)	Jumlah pengulangan pada kaki tikus (%)					Mean	± SEM
	I	II	III	IV	V		
0	24,09	16,45	23,66	12,17	26,09	20,49	± 2,644
1	29,36	20,48	28,18	14,78	31,52	24,87	± 3,134
2	33,18	23,90	34,48	18,26	35,87	29,14	± 3,435
3	37,73	31,16	37,71	22,61	41,30	34,10	± 3,307
4	30,91	24,52	27,96	14,78	31,52	25,94	± 3,053
5	26,36	17,26	23,66	11,30	27,17	21,15	± 3,015
6	35,45	22,90	17,20	15,65	32,61	24,76	± 3,997
24	8,91	8,42	6,38	3,48	7,22	6,88	± 0,96

Per센 peningkatan volume edema **1 jam setelah induksi** carrageenan diberi CMC
Indometasin 20 mg/kg BB

Interval waktu (jam)	Jumlah pengulangan pada kaki tikus (%)					Mean	± SEM
	I	II	III	IV	V		
0	28,46	20,10	30,26	22,31	29,59	26,14	± 2,067
1	36,92	34,29	35,48	29,75	40,82	35,45	± 1,8
2	30,77	31,43	32,26	26,45	37,76	31,73	± 1,81
3	23,08	30,48	30,11	23,14	30,61	27,48	± 1,788
4	19,23	20,00	18,28	14,05	23,47	19,01	± 1,517
5	14,38	10,52	11,83	8,26	17,35	12,47	± 1,571
6	8,46	8,57	8,60	6,61	12,24	8,90	± 0,917
24	6,77	4,05	6,53	2,48	8,16	5,60	± 1,023

Lampiran 40**Persen Peningkatan Volume Edema Kaki Tikus 1 jam Setelah induksi Carrageenan Diberi EMAT 3 Dosis**

Persen peningkatan volume edema **1 jam setelah induksi** carrageenan diberi EMAT1
300 mg/kg BB

Interval waktu (jam)	Jumlah pengulangan pada kaki tikus (%)					Mean	± SEM
	I	II	III	IV	V		
0	16,87	9,66	8,29	12,41	14,39	12,33	± 1,554
1	20,52	16,54	14,59	17,93	21,21	18,16	± 1,231
2	25,83	26,71	20,78	22,07	29,55	24,99	± 1,591
3	35,74	34,09	28,69	32,41	37,12	33,61	± 1,462
4	27,45	27,28	20,49	24,83	28,79	25,77	± 1,466
5	25,13	24,71	18,29	21,38	26,52	23,20	± 1,489
6	41,62	40,67	35,69	36,55	46,97	40,30	± 2,021
24	15,23	17,83	14,59	15,03	19,70	16,48	± 0,985

Persen peningkatan volume edema **1 jam setelah induksi** carrageenan diberi EMAT2
600 mg/kg BB

Interval waktu (jam)	Jumlah pengulangan pada kaki tikus (%)					Mean	± SEM
	I	II	III	IV	V		
0	24,41	22,26	18,07	23,48	18,62	21,37	± 1,283
1	31,25	29,53	27,86	33,04	25,52	29,44	± 1,307
2	40,44	36,68	33,37	42,61	31,72	36,97	± 2,054
3	43,02	44,21	38,37	48,70	34,48	41,76	± 2,451
4	32,37	34,89	28,62	37,39	22,76	31,21	± 2,562
5	28,33	28,42	24,42	34,78	19,31	27,05	± 2,551
6	25,68	25,26	20,67	28,70	17,24	23,51	± 2,025
24	6,33	6,38	5,35	4,61	3,38	5,21	± 0,564

Persen peningkatan volume edema **1 jam setelah induksi** carrageenan diberi EMAT2
1200 mg/kg BB

Interval waktu (jam)	Jumlah pengulangan pada kaki tikus (%)					Mean	± SEM
	I	II	III	IV	V		
0	19,58	16,92	20,48	19,83	17,95	18,95	± 0,657
1	25,42	20,65	26,83	25,62	22,22	24,15	± 1,16
2	30,77	23,33	28,52	31,40	26,50	28,10	± 1,476
3	29,10	23,01	23,39	30,58	23,93	26,00	± 1,59
4	22,26	16,72	14,78	23,14	15,38	18,46	± 1,765
5	16,00	15,88	13,78	20,66	12,82	15,83	± 1,353
6	14,19	12,84	11,04	17,36	11,11	13,31	± 1,169
24	9,94	7,84	7,83	12,40	6,84	8,97	± 0,995

Lampiran 41**Pemberian dosis EMAT 1% dan Indometasin 5% kedalam RBC yang diinduksi hipotonisitas**

Kode kons	Kons EMAT mg/ml	Vol EMAT ml	Kons akhir EMAT mg/ml	Vol bufer +RBC+ EMAT ml
1	10	0,0125	0,068	1,850
2	10	0,0250	0,135	1,850
3	10	0,0625	0,338	1,850
4	10	0,1250	0,676	1,850
5	10	0,2500	1,351	1,850
6	10	0,5000	2,703	1,850

Kode kons	Kons Indom mg/ml	Vol Indom ml	Kons akhir Indom mg/ml	Vol bufer +RBC+Indom ml
1	50	0,0125	0,338	1,850
2	50	0,0250	0,676	1,850
3	50	0,0625	1,689	1,850
4	50	0,1250	3,378	1,850
5	50	0,2500	6,757	1,850
6	50	0,5000	13,514	1,850

Lampiran 42**Persen Proteksi EMAT dan Indometasin Terhadap Kestabilan Membran Sel Darah Merah diinduksi Hipotonisitas****Persen Proteksi Inflamasi EMAT**

kons (mg/ml)	I	II	III	Mean	\pm	SEM
0,068	15,998	17,428	20,445	17,957	\pm	1,311
0,135	20,286	19,492	19,174	19,651	\pm	0,331
0,338	26,955	30,449	33,942	30,449	\pm	2,017
0,676	34,895	38,706	41,088	38,229	\pm	1,804
1,351	42,358	48,075	46,169	45,534	\pm	1,681
2,703	55,538	57,920	57,285	56,914	\pm	0,712

EC502,143 1,769 1,803 1,905 \pm 0,119**Persen proteksi inflamasi Indometasin**

kons(mg/ml)	I	II	III	Mean	\pm	SEM
0,338	3,771	3,136	2,342	3,083	\pm	0,413
0,676	7,424	6,471	9,329	7,741	\pm	0,840
1,689	16,157	15,522	14,093	15,257	\pm	0,610
3,378	19,174	17,428	19,492	18,698	\pm	0,642
6,757	29,337	31,243	34,101	31,560	\pm	1,384
13,514	63,319	66,812	66,336	65,489	\pm	1,094

EC50

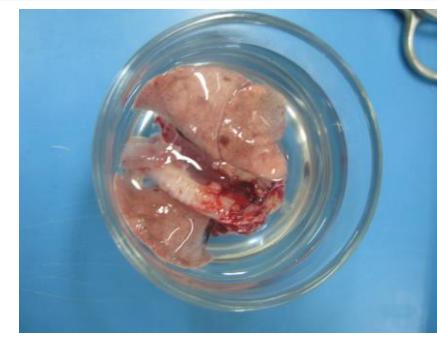
10,703 10,157 10,004 10,288

Lampiran 43**Dokumentasi gambar bronkus dan alat isolated organ bath**

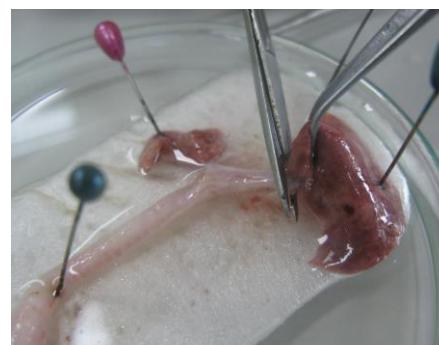
Guinea pig setelah di anestesi
dan di dislokasi lehernya



Preparasi paru-paru dan trachea
guinea pig



Paru-paru dan trachea dalam
larutan Kreb's



Pembersihan dan pemotongan
bronkus



Cincin bronkus dalam
organ bath

Lampiran 44

Dokumentasi gambar 1 set /6 chamber organ bath dan monitor komputer yang terhubung ke recorder



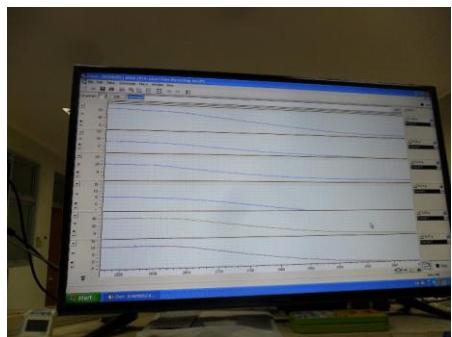
Cincin bronkus dalam organ bath terhubung dengan tranduser isometrik dan power lab AD instrumen



Power lab AD Instrument terhubung ke recorder dan komputer



1 set/6 chamber organ bath dan monitor komputer terhubung recorder



Alat monitor komputer memperlihatkan respon kontraktilitas cincin bronkus

Lampiran 45

Dokumentasi gambar alat plethysmometer dan tikus Wistar setelah diinduksi carrageenan



Tikus Wistar setelah disonde EMAT, setelah 1 jam diinduksi carrageenan



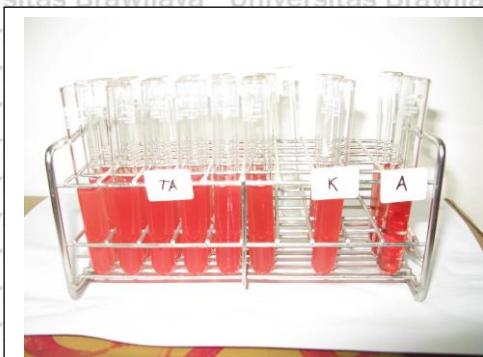
Alat Plethysmometer untuk mengukur volume edema kaki tikus



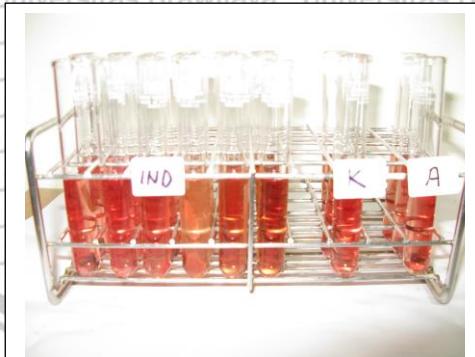
Recorder volume edema kaki tikus

Lampiran 46

Dokumentasi gambar Stabilisasi membran RBC



Bufer RBC + EMAT 6 konsentrasi sebelum di inkubasi



Bufer RBC + Indometasin 6 konsentrasi sebelum di inkubasi



Bufer RBC + EMAT 6 konsentrasi setelah di inkubasi



Bufer RBC + Indometasin 6 konsentrasi setelah di inkubasi