

Terapi Ekstrak Etanol Daun *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina Terhadap Ekspresi *Cyclooxygenase2*, Prostaglandin E₂ dan Gambaran Histopatologi Lambung Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* yang Diinduksi Indometasin

TESIS

Sebagai Salah Satu Persyaratan Memperoleh Gelar Magister Sains dalam Bidang Kimia



Oleh :

Tri Zulfi Anita

NIM. 176090200111002

**PROGRAM STUDI S2 KIMIA
BIDANG KEKHUSUSAN BOKIMIA**

PROGRAM PASCASARJANA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG 2018

2019



Terapi Ekstrak Etanol Daun *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina Terhadap Ekspresi *Cyclooxygenase2*, Prostaglandin E₂ dan Gambaran Histopatologi Lambung Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* yang Diinduksi Indometasin

TESIS

Sebagai Salah Satu Persyaratan Memperoleh Gelar Magister Sains dalam Bidang Kimia



Oleh :

Tri Zulfi Anita

NIM. 176090200111002

**PROGRAM STUDI S2 KIMIA
BIDANG KEKHUSUSAN BOKIMIA**

PROGRAM PASCASARJANA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG 2018

2019

LEMBAR PENGESAHAN

Terapi Ekstrak Etanol Daun *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina Terhadap Ekspresi *Cyclooxygenase2*, Prostaglandin E₂ dan Gambaran Histopatologi Lambung Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* yang Diinduksi Indometasin

Oleh:

Tri Zulfi Anita

176090200111002

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 14 Oktober 2019
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains dalam bidang Ilmu Kimia

Menyetujui

Komisi Pembimbing,

Ketua

Anggota

Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES

NIP.19600903 198802 2 001

Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS

NIP. 19600903 198802 1 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi S2 Kimia

Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Arie Srihardyastutie, Si., M.Kes

NIP.19720326 200212 2 001

TIM PENGUJI TESIS**Judul Tesis:**

Terapi Ekstrak Etanol Daun *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina Terhadap Ekspresi *Cyclooxygenase2*, Prostaglandin E₂ dan Gambaran Histopatologi Lambung Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* yang Diinduksi Indometasin

Nama Mahasiswa : Tri Zulfi Anita

NIM : 176090200111002

Program Studi : Kimia

Bidang Minat : Biokimia

KOMISI PEMBIMBING

Ketua : Prof. Dr.drh. Aulanni'am, DES.

Anggota : Prof.Dr.Ir. Chanif Mahdi, MS.

TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji 1 : Anna Safitri, S.Si., M.Sc. Ph.D.

Dosen Penguji 2 : Dr. Warsito, MS

Tanggal Ujian : 14 Oktober 2019

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya, yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Tri Zulfi Anita

NIM : 176090200111002

Program Studi : Kimia

Bidang Minat : Biokimia

Judul Tesis : Terapi Ekstrak Etanol Daun *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina Terhadap Ekspresi *Cyclooxygenase 2*, Prostaglandin E₂ dan Gambaran Histopatologi Lambung Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* yang Diinduksi Indometasin

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah tesis ini tidak terdapat unsur-unsur plagiasi karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.
2. Apabila ternyata di dalam naskah tesis ini terdapat unsur-unsur plagiasi, maka saya bersedia tesis ini untuk digugurkan, serta diproses sesuai dengan aturan perundang-undangan yang berlaku (UU. No. 20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan Pasal 70).

Demikian pernyataan ini dibuat dengan kesadaran.

Malang, 24 Oktober 2019

Mahasiswa

Tri Zulfi Anita

176090200111002

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

DATA PRIBADI

Nama : Tri Zulfi Anita
 NIM : 176090200111002
 Tempat, Tanggal Lahir : Jombang, 25 Maret 1994
 Jenis Kelamin : Perempuan
 Agama : Islam
 Alamat : Dsn. Modo RT/RW:003/001 Mlaras, Sumobito
 Jombang
 Kontak Person : 082336639189
 E-mail : anita_mvp@yahoo.co.id
trizulfi@gmail.com

DATA PENDIDIKAN

No.	Tahun Lulus	Jenjang	Pendidikan	Jurusan/Bidang
1	2000	TK	TK PKK Mlaras	
2	2006	SD	MI Bustanul Ulum Mlaras	
3	2009	SMP	MTsN Sumobito	
4	2012	SMK	SMA Darul Ulum 2 Unggulan BPPT	IPA
6	2017	S-1	Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang	Kimia
7	2019	S-2	Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam	Kimia

RINGKASAN

Tri Zulfi Anita. 176090200111002. Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya. **Terapi Ekstrak Etanol Daun *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina Terhadap Ekspresi *Cyclooxygenase2*, Prostaglandin dan Gambaran Histopatologi Lambung Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Inflammatory Bowel Disease yang Diinduksi Indometasin.** Ketua Komisi Pembimbing Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES, Anggota Komisi Pembimbing Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS.

Inflammatory Bowel Disease (IBD) merupakan inflamasi kronis yang terjadi pada *gastrointestinal* (GI) yang dapat disebabkan oleh berbagai faktor. Salah satu penyebab IBD yaitu penggunaan berkelanjutan Non steroid Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) seperti Indometasin. IBD menyebabkan kerusakan mukosa GI serta peningkatan ekspresi mediator inflamasi seperti COX-2 dan PGE₂. Beberapa senyawa aktif seperti golongan alkaloid efektif mencegah terjadinya over ekspresi COX-2. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi perbedaan senyawa alkaloid dan potensinya sebagai antiinflamasi dari ekstrak etanol daun *P.longifolia* dari wilayah Indonesia dan Filipina. Kemudian melihat efektivitas sebagai obat IBD dilihat dari kemampuan menurunkan ekspresi proinflamasi yaitu COX-2 dan Prostaglandin (PGE₂) serta gambaran histopatologi lambung. Penelitian diawali dengan proses ekstraksi daun *P.longifolia* dari Indonesia dan Filipina dengan etanol 70%. Ekstrak etanol daun *P.longifolia* identifikasi senyawa alkaloid menggunakan LC-MS. Senyawa yang telah teridentifikasi dilakukan *molecular docking* untuk mengetahui kemampuan sebagai anti-inflamasi dengan menghambat COX-2. *Molecular docking* dilakukan dengan program PyRx dan dianalisis interaksi dengan asam amino dengan program LigPlot+. Efektivitas ekstrak etanol daun *P.longifolia* dari Indonesia dan Filipina untuk IBD dilakukan secara *in vivo*. Hewan coba dibagi atas 3 kelompok yaitu Kelompok ekstrak Indonesia, Filipina dan obat *gold standar* (Sulfasalazin). Setiap kelompok dilakukan pembedahan pada hari ke-7 dan ke-14 setelah terapi. Identifikasi senyawa alkaloid menunjukkan adanya senyawa 5 senyawa yang sama dan satu senyawa yang berbeda pada ekstrak Indonesia dan Filipina. Kelima senyawa terdiri dari polylongine, liriodenine, noroliveroline dan oliveroline-β-N-oxide. Senyawa N-methylnandingerine-β-N-oxide ditemukan hanya pada ekstrak etanol daun *P.longifolia* sedangkan O-methylbulbocapnine-N-oxide di Indonesia. Kadar senyawa (AA/mg) ekstrak etanol daun *P.longifolia* dari Indonesia lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa ekstrak etanol daun *P.longifolia*. Analisis senyawa alkaloid sebagai antiinflamasi secara *molecular docking* menunjukkan bahwa keseluruhan senyawa memiliki potensi sebagai antiinflamasi. Liriodenine merupakan senyawa yang paling potensi dengan nilai energi ikat sebesar -10,9 kkal/mol. Senyawa O-methylbulbocapnine-N-oxide memiliki energi ikat yang lebih rendah (-8,2 kkal/mol) dibandingkan dengan N-methylnandingerine-β-N-oxide (-7,4 kkal/mol). Sedangkan senyawa sulfasalazin sebagai *gold standart* obat IBD memiliki energy ikat sebesar (-7,1 kkal/mol). Efektivitas ekstrak etanol daun *P.longifolia* dari Indonesia lebih baik daripada Filipina dilihat dari gambaran histopatologi dan kemampuan menurunkan ekspresi proinflamasi COX-2 dan PGE-2. Analisis statistika

menunjukkan bahwa pemberian perlakuan memberikan pengaruh sangat nyata terhadap ekspresi COX-2 dan PGE-2 ($P < 0,01$). Berdasarkan gambaran histopatologi lambung, pemberian ekstrak etanol daun *P.longifolia* mampu memperbaiki jaringan mukosa yang rusak dan mengurangi infiltrasi sel radang. Berdasarkan uraian di atas dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun *P.longifolia* dari Indonesia dan Filipina memiliki efektivitas sebagai obat IBD. Ekstrak etanol daun *P.longifolia* dari Indonesia memiliki efektivitas sebagai obat IBD yang lebih baik dari Filipina.



SUMMARY

Tri Zulfi Anita. 176090200111002. Universitas Brawijaya Post Graduate Program. **Therapy of Ethanol Extracts of Indonesian and Philippine *Polyalthia longifolia* Leaves to the Expression of Cyclooxygenase2, Prostaglandin and Hispatology Picture of Rat Gastric (*Rattus norvegicus*) Indomethacin-Induced Bowel Disease Model.** Chairperson of the Supervisory Commission Prof. Dr Aulanni'am, drh., DES, Member of the Supervisory Commission Prof. Dr Ir. Chanif Mahdi, MS.

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a chronic inflammation that occurs in the gastrointestinal (GI) which can be caused by various factors. One of the causes of IBD is the continuous use of Non-steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) such as Indometasi. IBD causes GI mucosal damage as well as increased expression of inflammatory mediators such as COX-2 and PGE2. Some active compounds such as alkaloids are effective in preventing over-expression of COX-2. This study aims to identify differences in alkaloid compounds and their potential as an anti-inflammatory from ethanol extracts of *P. longifolia* leaves from Indonesia and the Philippines. Then see the effectiveness as an IBD drug seen from the ability to reduce proinflammatory expression, namely COX-2 and Prostaglandin (PGE2) and histopathological features of the stomach. The study began with the extraction process of *P. longifolia* leaves from Indonesia and the Philippines with 70% ethanol. Ethanol extract of *P. longifolia* leaves identified alkaloid compounds using LC-MS. The compounds that have been identified do molecular docking to determine their ability as an anti-inflammatory by inhibiting COX-2. Molecular docking was carried out with the PyRx program and analyzed interactions with amino acids with the LigPlot + program. The effectiveness of *P. longifolia* leaf ethanol extracts from Indonesia and the Philippines for IBD was carried out in vivo. Experimental animals were divided into 3 groups namely the Indonesian, Philippine extract group and the gold standard drug (Sulfasalazine). Each group was surgically operated on the 7th and 14th day after therapy. Identification of alkaloid compounds showed the existence of 5 compounds which are the same compound and one compound which is different in Indonesian and Philippine extracts. The five compounds consist of polylongine, liriodenine, noroliveroline and oliveroline- β -N-oxide. N-methylnandingerine- β -N-oxide compounds are found only in the ethanol extract of *P. longifolia* leaves while O-methylbulbocapnine-N-oxide in Indonesia. The level of compound (AA/mg) of ethanol extract of *P. longifolia* leaves from Indonesia is higher than the ethanol extract of *P. longifolia* leaves. Analysis of alkaloid compounds as an anti-inflammatory by molecular docking shows that the whole compound has potential as an anti-inflammatory. Liriodenine is the most potent compound with a binding energy value of -10.9 kcal/mol. O-methylbulbocapnine-N-oxide compounds have lower binding energy (-8.2 kcal/mol) compared to N-methylnandingerine- β -N-oxide (-7.4 kcal/mol). While sulfasalazine compounds as gold standard IBD drugs have a binding energy of (-7.1 kcal/mol). The effectiveness of ethanol extract of *P. longifolia* leaves from Indonesia is better than that of the Philippines in terms of histopathological features and the ability to reduce the expression of COX-2 and PGE-2 proinflammation. Statistical

analysis showed that the treatment gave a very significant influence on the expression of COX-2 and PGE-2 ($P < 0.01$). Based on the histopathological picture of the stomach, the ethanol extract of *P. longifolia* leaves can repair damaged mucosal tissue and reduce inflammatory cell infiltration. The best improvement was seen in the treatment group who were given ethanol extract of *P. longifolia* leaves from Indonesia for 14 days. Based on the description above, it can be concluded that the ethanol extract of *P. longifolia* leaves from Indonesia and the Philippines has effectiveness as an IBD drug. The ethanol extract of *P. longifolia* leaves from Indonesia has effectiveness as a better IBD drug than the Philippines.



KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum wa Rahmatullahi wa Barokatu

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis mampu menyelesaikan tesis ini dengan judul “Terapi Ekstrak Etanol Daun *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina Terhadap Ekspresi *Cyclooxygenase-2*, Prostaglandin E₂ dan Gambaran Histopatologi Lambung Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* yang Diinduksi Indometasin”. Shalawat serta salam senantiasa penulis panjatkan kepada nabi Muhammad SAW yang telah membimbing menuju jalan yang diridhoi Allah SWT.

Penyelesaian tesis ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, seiring terselesaikannya tesis ini, dengan penuh rasa hormat, kesungguhan dan kerendahan hati, penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES selaku Pembimbing I yang telah banyak memberikan saran dan bimbingan selama penyusunan tesis.
2. Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS selaku Pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan selama penyusunan tesis.
3. Ibu Anna Safitri, S.Si, M.Sc, Ph.D, Alm. Dr. Edi Priyo Utomo, MS dan Dr. Warsito, MS selaku penguji yang telah memberikan banyak masukan.
4. Dr. Maria Asuncion G. Beltran yang bersedia memberikan bantuan dalam penyediaan bahan daun *Polyalthia longifolia* yang diperoleh dari Filipina.
5. Dr. Arie Srihardyastutie, Si., M.Kes selaku Ketua prodi Pascasarjana Jurusan Kimia dan para dosen-dosen berserta staf Jurusan Kimia.
6. Keluarga penulis Zainul Arifin, Sugiati, Zulfatunnuriyah, S.Si, Zulkhoornain, S.P, Kolil, S.Ag dan Masruroh, S.P,
7. Saudaraku Ani Rahmawati, S.Si., M.Si dan Miftah Ayu Rahmati, S.T yang selalu memberikan bantuan dan semangat
8. Teman seperjuangan biokimia medis drh.Ricadona Raissa, Day Shine Nahari, S.Si serta Tim *Research* IBD dari FKH UB.



9. Pak Maryono, Wibi Riawan, S.Si., M.Biomed, Bu Fitri, drh Yudit Oktanella, M.Si dan drh. Fitri Novitasari selaku Laboran di Laboratorium Biokimia F.MIPA, Biokimia Molekuler Kedokteran, Animal Disease Diagonosis F.KH dan Biosains.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak dengan senang hati. Semoga dengan tersusunnya tesis ini dapat memberikan manfaat dan masukan bagi kita semua.

Wassalamu'alaikum wa Rahmatullohi wa Barokatuh

Malang, 24 Oktober 2019

Penulis



DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
IDENTITAS TIM PENGUJI TESIS.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS.....	iv
RIWAYAT HIDUP.....	v
RINGKASAN.....	vi
SUMMARY.....	viii
KATA PENGANTAR.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
DAFTAR ISTILAH.....	xix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Permasalahan	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Batasan Masalah	5
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 <i>Polyalthia Longifolia</i>	7
2.2 <i>Inflammatory Bowel Disease (IBD)</i>	10
2.3 Indometasin.....	12
2.4 Lambung.....	13
2.5 <i>Cyclooxygenase</i>	17



2.6	Prostaglandin.....	18
2.7	Tikus Putih	20
BAB III KERANGKA KONSEP.....		22
3.1	Kerangka Teori.....	22
3.2	Kerangka Konsep.....	23
3.3	Hipotesis.....	25
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN.....		26
4.1	Waktu dan Tempat Penelitian.....	26
4.2	Alat dan Bahan.....	26
	4.2.1 Alat	26
	4.2.2 Bahan	26
4.3	Rancangan Penelitian	27
4.4	Variabel Penelitian.....	29
4.5	Tahapan Penelitian.....	29
4.6	Prosedur Penelitian.....	30
	4.6.1 Preparasi Sampel dan Ekstrak Daun <i>Polyalthia longifolia</i>	30
	4.6.2 LC-MS.....	30
	4.6.3 Uji in Silico Simulasi <i>Molecular Docking</i> Bioaktif dari Daun <i>Polyalthia longifolia</i>	31
	4.6.4 Perlakuan Hewan Coba.....	31
	4.6.5 Pembedahan dan Pengambilan Organ Lambung.....	32
	4.6.6 Pengukuran Ekspresi COX-2 dan PGE ₂	32
	4.6.6.1 Pembuatan Parafin Block Jaringan.....	32
	4.6.6.2 Proses Deparafinasi.....	32
	4.6.6.3 Pewarnaan Imonohistokimia COX-2.....	33
	4.6.6.4 Pewarnaan Imonohistokimia PGE ₂	33
	4.6.7 Pengamatan Hematoksilin Eosin Organ Lambung.....	34
	4.6.7.1 Fiksasi, Dehidrasi, <i>Clearing</i> dan <i>Embedding</i>	34
	4.6.7.2 Pembuatan Preparat.....	35

4.6.7.3 Pewarnaan dengan Hematoksilin Eosin.....	35
4.7 Analisis Hasil.....	36
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
5.1 Hasil Skrining Fitokimia dan Identifikasi Senyawa Alkaloid Ekstrak Etanol Daun <i>Polyalthia longifolia</i>	37
5.2 <i>Molecular Docking</i> Senyawa alkaloid Sebagai Antiinflamasi.....	39
5.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun <i>Polyalthia longifolia</i> Terhadap Ekspresi COX-2 pada Lambung Tikus IBD.....	44
5.4 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun <i>Polyalthia longifolia</i> Terhadap Ekspresi PGE ₂ pada Lambung Tikus IBD.....	49
5.5 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun <i>Polyalthia longifolia</i> Terhadap Perbaikan Histopatologi Lambung Tikus IBD.....	53
5.6 Hubungan Ekstrak Etanol Daun <i>Polyalthia longifolia</i> dari Indonesia dan Filipina Terhadap Ekspresi COX-2, PGE ₂ dan Gambaran Histopatologi Lambung Sebagai <i>Anti Inflammatory Bowel Disease</i>	60
BAB VI PENUTUP.....	65
6.1 Kesimpulan.....	65
6.2 Saran.....	66
DAFTAR PUSTAKA.....	67

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 *Polyalthia longifolia*..... 8

Gambar 2.2 Struktur senyawa flavonoid..... 9

Gambar 2.3 Senyawa alkaloid..... 9

Gambar 2.4 Struktur Indometasin..... 12

Gambar 2.5 Penampakan lambung tikus yang dibuka..... 15

Gambar 2.6 Mukosa lambung yang diwarnai dengan hematoxylin-eosin... 15

Gambar 2.7 Skematik jalur intraseluler pada mekanisme penyembuhan luka lambung 16

Gambar 2.8 Biosintesis prostaglandin..... 19

Gambar 3.1 Kerangka teori..... 22

Gambar 3.2 Kerangka konsep..... 23

Gambar 5.1 Grafik kadar senyawa alkaloid..... 39

Gambar 5.2 Interaksi senyawa dengan asam amino..... 41

Gambar 5.3 Gambaran Imunohistokimia *Cyclooxygenase 2* lambung hasil perlakuan pada perbesaran 400x..... 45

Gambar 5.4 Gambaran Imunohistokimia *Cyclooxygenase 2* lambung kontrol pada perbesaran 400x..... 46

Gambar 5.5 Grafik ekspresi COX-2 pada lambung tikus IBD yang telah diterapi 47

Gambar 5.6 Gambaran Imunohistokimia Prostaglandin E₂ (PGE₂) lambung hasil perlakuan pada perbesaran 400x..... 50

Gambar 5.7 Gambaran Imunohistokimia Prostaglandin E₂ lambung model IBD pada perbesaran 400x..... 51

Gambar 5.8 Grafik ekspresi PGE₂ pada lambung tikus IBD yang diterapi.. 52

Gambar 5.9 Histopatologi lambung tikus IBD dengan pemberian sulfasalazine 10 mg selama 7 hari..... 54

Gambar 5.10 Histopatologi lambung tikus IBD dengan pemberian sulfasalazine 10 mg selama 14 hari..... 54

Gambar 5.11 Histopatologi lambung tikus IBD dengan pemberian EEDPLI selama 7 hari..... 55



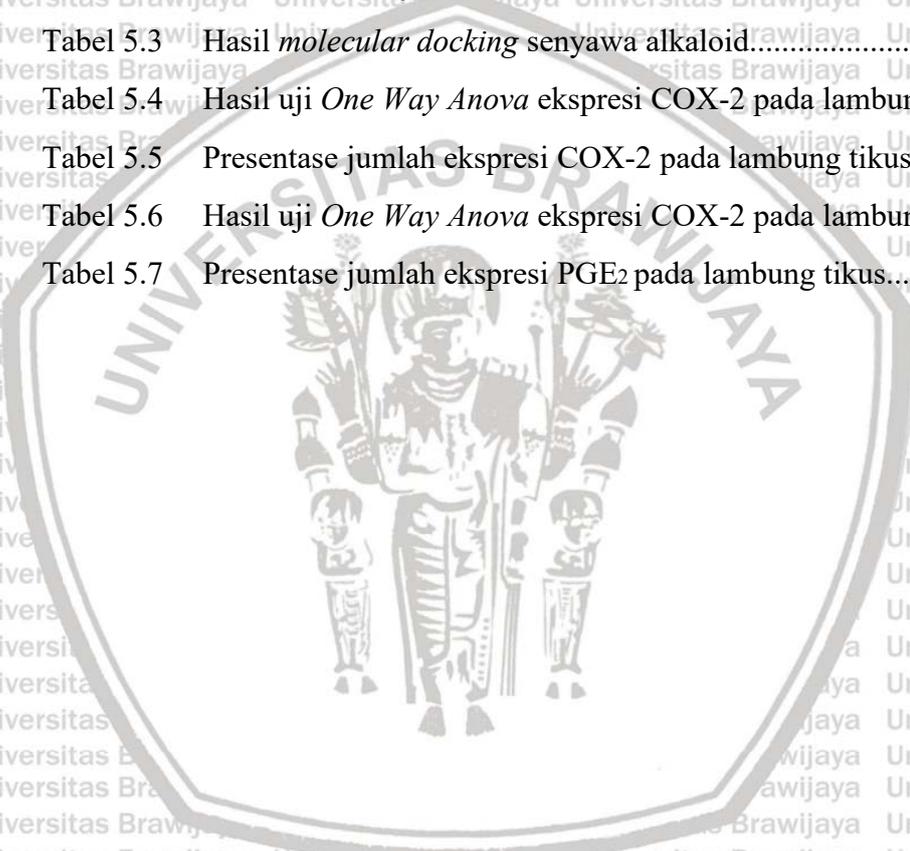
Gambar 5.12	Histopatologi lambung tikus IBD dengan pemberian EEDPLI selama 14 hari.....	55
Gambar 5.13	Histopatologi lambung tikus IBD dengan pemberian EEDPLF selama 7 hari.....	56
Gambar 5.14	Histopatologi lambung tikus IBD dengan pemberian EEDPLF selama 14 hari.....	56
Gambar 5.15	Histologi lambung tikus normal.....	58
Gambar 5.16	Histopatologi lambung tikus IBD.....	58
Gambar 5.17	Mekanisme senyawa turunan alkaloid pada pengobatan IBD..	61
Gambar 5.18	Mekanisme penghambatan Inflamasi melalui jalur sintesis Eicosanoid.....	62
Gambar 5.19	Mekanisme penangkapan radikal bebas senyawa polylongine	63
Gambar 5.20	Mekanisme penangkapan radiakal bebas N-methylnandingerine- β -N-oxide.....	63
Gambar 5.21	Mekanisme penangkapan radikal bebas senyawa quarcetin beserta bentuk tautomernya.....	64



DAFTAR TABEL

Halaman

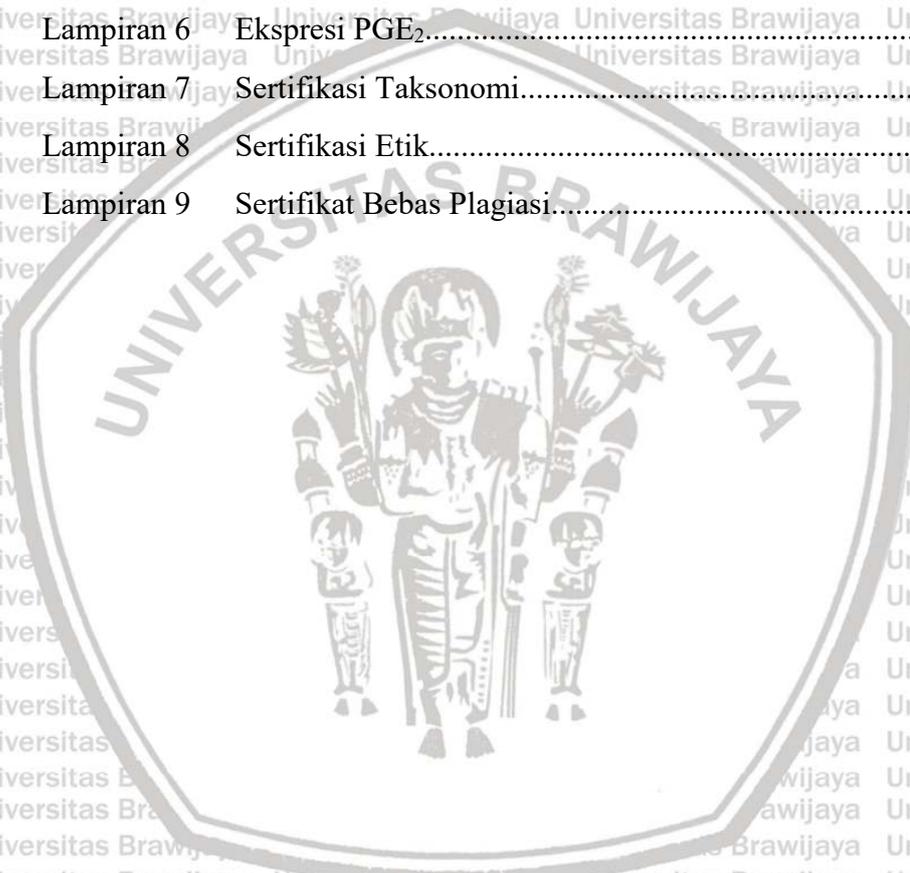
Tabel 4.1	Pembagian kelompok berdasarkan perlakuan.....	27
Tabel 4.2	Perhitungan	28
Tabel 4.3	ANOVA	28
Tabel 5.1	Hasil uji golongan senyawa pada EEDPL yang berasal dari Indonesia dan Filipina.....	37
Tabel 5.2	Identifikasi senyawa alkaloid.....	38
Tabel 5.3	Hasil <i>molecular docking</i> senyawa alkaloid.....	40
Tabel 5.4	Hasil uji <i>One Way Anova</i> ekspresi COX-2 pada lambung.....	47
Tabel 5.5	Presentase jumlah ekspresi COX-2 pada lambung tikus.....	47
Tabel 5.6	Hasil uji <i>One Way Anova</i> ekspresi COX-2 pada lambung.....	51
Tabel 5.7	Presentase jumlah ekspresi PGE2 pada lambung tikus.....	52



DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1	Diagram Alir Penelitian	74
Lampiran 2	Pembuatan Larutan	81
Lampiran 3	Perhitungan Ekstrak dan Sulfasalazine.....	82
Lampiran 4	Hasil Ekstraksi.....	84
Lampiran 5	Ekspresi COX-2.....	89
Lampiran 6	Ekspresi PGE ₂	92
Lampiran 7	Sertifikasi Taksonomi.....	95
Lampiran 8	Sertifikasi Etik.....	96
Lampiran 9	Sertifikat Bebas Plagiasi.....	97



DAFTAR SINGKATAN

- AA : Asam Arakidonat
- ANOVA : *Analysis of variant*
- BB : Berat Badan
- COX : *Cyclooxygenase*
- DAB : Diaminobenzidine
- EEDPL : Ekstrak Etanol Daun *Polyalthia longifolia*
- EEDPLF : Ekstrak Etanol Daun *Polyalthia longifolia* Filipina
- EEDPLI : Ekstrak Etanol Daun *Polyalthia longifolia* Indonesia
- FGF : Fibroblast Growth Factors
- GI : gastrointestinal
- HE : Hematoxyline-Eosin
- IBD : *Inflammatory Bowel Disease*
- IL-1 : Interleukin-1
- KU : Kolitis Ulseratif
- LC-MS : Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
- NF-κB : Nuclear factor-kappa Beta
- NSAIDs : *Non-steroidal Anti Inflammatory Drugs*
- PC : Penyakit Crohn
- PG : Prostaglandin
- PGE₂ : Prostaglandin E₂
- ROS : Reactive Oxygen Species
- SA-HRP : Stepfa avidin- Horseradish Peroxide
- TGF- β : Transforming Growth Factor-β
- TNF-α : Tumor Necrosis Factor α

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inflammatory Bowel Disease (IBD) merupakan inflamasi kronis pada gastrointestinal (GI). IBD terdiri dari dua penyakit yaitu penyakit Crohn (PC) dan kolitis ulseratif (KU). Prevalensi IBD di Amerika mencapai 286/100000 pada KU dan 319/100000 pada PC. Di Eropa, prevalensi KU mencapai 505/100000 dan PC mencapai 322/100000. Prevalensi PC di Asia khususnya di Taiwan mencapai 4 % dan 4,8% pada KU (Siew *et al.*, 2017). Prevalensi IBD di Asia semakin meningkat selama beberapa decade terakhir ini (Wee, Wong and Ng, 2016). Sedangkan di Indonesia, prevalensi PC yang tercatat di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo mencapai 2,1% (Pratama, Abdullah and Kansera, 2011). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa IBD dapat disebabkan karena pemakaian obat anti-inflamasi non steroid (*Non-steroidal Anti Inflammatory Drugs*, NSAIDs) (Klein dan Eliakim, 2010; Ari dan Makmun, 2014; Mardhiyah, Fauzi dan Syam, 2015; Sinha *et al.*, 2015).

Non-Steroid Anti-Inflammatory Drugs merupakan salah satu golongan obat yang sering diserepkan untuk mengobati rasa sakit, inflamasi, dan demam di seluruh dunia (Ari & Makmun, 2014; Mardhiyah, Fauzi, & Syam, 2015). NSAIDs bekerja dengan menghambat enzim *Cyclooxygenase* (COX). Enzim COX memiliki 2 isomer yaitu COX-1 dan COX-2 di mana COX-1 akan mensintesis prostaglandin (PG) E₂ yang bersifat protektif, sedangkan COX-2 menghasilkan PGE₂ yang proinflamasi. NSAIDs memicu IBD dikarenakan mampu merusak mukosa GI. PGE₂ yang berlebihan atau tinggi dihasilkan oleh isoform COX-2 yang terlibat dalam berbagai patologi. Faktanya, ekspresi COX-2 dan produksi PGE₂ berlebih di mukosa GI adalah ciri khas IBD seperti PC dan KU (Lejeune *et al.*, 2010). Organ yang terkena efek NSAIDs yang pertama ialah lambung, karena lambung memiliki peran untuk mencampur makanan sebelum diteruskan ke usus (Teng, Kairupan and Loho, 2013).

Umumnya NSAIDs yang seringkali digunakan untuk induksi IBD adalah Indometasin (Takeuchi, 2015).

Penggunaan Indometasin memiliki efek samping yaitu erosi mukosa lambung yang akhirnya membentuk ulkus dan komplikasi seperti perforasi lambung dan perdarahan (Neal, 2006). Indometasin menghambat COX-1 dan COX-2 tetapi lebih selektif terhadap penghambatan COX-1 (Aulanni'am, Rosdiana and Rahmah, 2011; Sholichah, Aulanni'am and Mahdi, 2012). Penghambatan COX-1 oleh Indometasin akan mengakibatkan penurunan sintesis prostaglandin (Sholichah, Aulanni'am and Mahdi, 2012). Penurunan prostaglandin menyebabkan menurunnya proteksi pada mukosa lambung dan membuat bakteri patogen mudah diserang (Suleyman *et al.*, 2010). Penghambatan COX-1 menyebabkan kerusakan mukosa lambung dan memicu terjadinya inflamasi. Saat kondisi inflamasi, kandungan COX-2 akan meningkat (Masbuchin, Putu and Suryana, 2014). Penelitian (Aryani, Anisa and Purwatiningsih, 2018) diketahui bahwa pemberian Indometasi 15 mg/kg BB secara oral mampu merusak mukosa pada organ lambung, duodenum, ileum dan kolon.

Penanganan pada penderita IBD biasanya diberikan obat-obatan dari jenis kortikosteroid, asam aminosalisilat dan immunosupresif (Firmansyah, 2013). Sulfasalazine merupakan jenis obat dari aminosalisilat yang paling umum digunakan untuk penanganan IBD. Efek samping penggunaan jangka panjang dapat memperburuk inflamasi, menyebabkan katarak dan hipertensi. Pada jaringan inflamsi, penghambatan selektif COX-2 memberikan keuntungan menurunkan inflamasi dan mengurangi efek toksik pada GI. Penelitian yang menggunakan terapi obat penghambatan selektif COX-2 menunjukkan aman dan bermanfaat pada sebagian besar pasien IBD tanpa memperburuk komplikasi IBD (Miedany *et al.*, 2006)(Wang and DuBois, 2011).

Obat herbal diyakini mempunyai efek samping yang rendah. Beberapa penelitian tentang efektivitas tanaman sebagai pengobatan IBD meliputi Daun Kedondong (*Lannea coromandelica*) (Sholichah, Aulanni'am and Mahdi, 2012), bawang prei (*Allium fistulosum*) (Masbuchin, Putu and Suryana, 2014), lidah

buaya (*Aloe vera*) (Mustaqim, Asri and Almurdi, 2017), Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) (Aulanni'am, Rosdiana and Rahmah, 2011) dan direkombinasikan sebagai obat IBD. Namun pengaruh daun *Polyalthia longifolia* yang banyak tumbuh di negara-negara tropis dan sub tropis perlu dikaji potensinya untuk digunakan sebagai treatment IBD.

Daun *Polyalthia longifolia* memiliki senyawa aktif berupa flavonoid, alkaloid, seskuiterpen, diterpen, saponin dan alkaloid. Adanya berbagai senyawa aktif menyebabkan memiliki aktivitas antibakteri, antioksidan, antiiskemik, antijamur, antidiabetes, anti-inflamasi, antiulser (Sharma *et al.*, 2016), antimikroba (Chanda, Baravalia and Kaneria, 2011), antikanker, antipiretik, dan hepatoprotektif (Katkar, Suthar and Chauhan, 2010; Dixit *et al.*, 2014). Pada penelitian (Sharma *et al.*, 2016) menunjukkan bahwa dosis 300 mg/kg BB ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* merupakan dosis terbaik terhadap perlindungan ulser gastrik.

Tanaman *Polyalthia longifolia* memiliki berbagai kandungan senyawa aktif dari beberapa golongan senyawa. Golongan senyawa aktif alkaloid memiliki kemampuan untuk digunakan sebagai obat IBD (Peng *et al.*, 2019). Salah satu penanganan IBD yaitu dengan cara mengurangi peradangan/inflamasi. Studi *in silico* dapat digunakan untuk memprediksi senyawa aktif yang memiliki kemampuan sebagai antiinflamasi.

Tanaman *Polyalthia longifolia* dapat ditemukan pada wilayah dengan geografis tropis dan sub tropis. Indonesia dan Filipina merupakan negara yang mampu ditumbuhi tanaman *polyalthia longifolia*. Perbedaan geografis antara Indonesia dan Filipina akan menyebabkan perbedaan kandungan senyawa aktif dalam tanaman, sehingga dapat memiliki perbedaan aktivitas farmakologis yang akan dihasilkan (Colegate and Molyneux, 2007). Oleh karena itu, akan dilakukan penelitian tentang pengaruh ekstrak daun *Polyalthia logifolia* yang berasal dari Indonesia dan Filipina sebagai obat herbal IBD. Berdasarkan ekspresi *Cyclooxygenase-2* (COX-2), Prostaglandin E₂ (PGE₂) dan gambaran Histopatologi lambung.

1.2 Rumusan Masalah

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

1. Apakah terdapat perbedaan senyawa alkaloid pada ekstrak etanol *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dan Filipina serta bagaimana hasil *molecular docking* senyawa tersebut sebagai antiinflamasi secara *in silico*?
2. Bagaimana ekspresi *Cyclooxygenase-2* (COX-2) pada lambung tikus model IBD yang diteliti oleh ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dan Filipina dibandingkan dengan obat Sulfasalazine sebagai *gold standard*?
3. Bagaimana ekspresi prostaglandin E₂ (PGE₂) pada lambung tikus model IBD yang telah diteliti oleh ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dan Filipina dibandingkan dengan obat Sulfasalazine sebagai *gold standard*?
4. Bagaimana perbaikan mukosa lambung tikus model IBD yang telah diteliti oleh ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dan Filipina dibandingkan dengan obat Sulfasalazine sebagai *gold standard* dilihat dari gambaran histopatologinya?

1.3 Tujuan

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

1. Mengidentifikasi perbedaan senyawa alkaloid yang terdapat pada ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dan Filipina serta menentukan apakah secara *in silico* memiliki kemampuan sebagai antiinflamasi.
2. Mengamati ekspresi COX-2 lambung tikus model IBD yang diberi ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dan Filipina yang

dibandingkan dengan pengobatan dengan Sulfasalazine sebagai *gold standard*.

3. Mengamati ekspresi PGE₂ lambung tikus model IBD yang diberi ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dan Filipina yang dibandingkan dengan pengobatan dengan Sulfasalazine sebagai *gold standard*.

4. Mengamati perbaikan lambung tikus model IBD yang diberi ekstrak daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dan Filipina yang dibandingkan dengan pengobatan dengan Sulfasalazine sebagai *gold standard* dilihat dari gambaran histopatologi.

1.4 Batasan Masalah

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

1. Analisis LC-MS digunakan untuk mengetahui adanya senyawa alkaloid golongan *azafluorene* dan *aporphine* sebagai bioaktif untuk anti-inflamasi pada IBD dilihat dari hambatan COX-2 secara *in silico*.
2. Hewan coba yang digunakan merupakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar, umur 8-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram berasal dari Institut Pertanian Bogor. Penggunaan hewan coba telah mendapatkan sertifikat Laik Etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No. 1035-KEP-UB.
3. Pembuatan hewan model IBD dilakukan dengan induksi obat NSAID, Indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB, sekali induksi. Indometasi diberikan secara oral dan diinkubasi selama sehari. Inflamasi kronik pada lambung ditunjukkan dengan adanya kerusakan mukosa pada lambung saat pembedahan.
4. Daun *polyalthia longifolia* Indonesia yang digunakan diperoleh dari wilayah Malang pada bulan Agustus 2018. Sedangkan untuk daun *polyalthia longifolia* Filipina diperoleh dari Dr. Ma. Asuncion G. Beltran.
5. Ekstrak daun *polyalthia longifolia* diperoleh dengan metode maserasi dengan etanol 70% dan proses evaporasi pelarut dilakukan pada suhu 60°C.

6. Dosis terapi ekstrak etanol *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina sebesar 300 mg/kg BB. Pemberian ekstrak etanol dilakukan secara per oral sehari sekali selama 14 hari.
7. Sulfasalazine sebagai *gold standard* obat IBD diberikan dengan dosis 10 mg/kg BB secara oral sekali sehari. Terapi dilakukan selama 14 hari berturut-turut.
8. Pengamatan ekspresi COX-2 dan PGE₂ dilakukan dengan metode *Immunohistochemistry* (IHC).
9. Pengamatan perbaikan jaringan mukosa di lambung dilakukan dengan pewarnaan hemaktosilin eosin dan diamati secara mikroskopis.

1.5 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi mengenai pemanfaatan ekstrak daun *Polyalthia longifolia* yang berasal dari Indonesia dan Filipina sebagai alternatif terapi herbal IBD. Selain itu, dapat digunakan sebagai acuan dasar lokasi yang memiliki efektivitas terbaik untuk digunakan sebagai obat herbal IBD. Efektivitas terbaik dimungkinkan karena adanya faktor-faktor seperti kandungan tanah, intensitas cahaya dan kondisi iklim yang baik untuk menghasilkan senyawa aktif untuk pengobatan IBD. Dengan demikian, dapat dilakukan pembudidayaan tanaman *Polyalthia longifolia* pada lokasi tersebut.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Polyalthia Longifolia*

Polyalthia Longifolia merupakan tanaman hias jalan untuk memerangi polusi suara. Tanaman ini tersebar di banyak negara tropis di seluruh dunia dan sering kali disebut dengan berbagai nama seperti glodokan, Ashoka, pohon buddha, champa hijau, pohon tiang India, dan pohon api India. *Polyalthia Longifolia* telah digunakan untuk pengobatan seperti demam, penyakit kulit, diabetes, dan hipertensi (Dixit *et al.*, 2014). Klasifikasi tanaman glodokan adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Magnoliales
Famili	: Annonaceae
Genus	: <i>Polyalthia</i>
Spesies	: <i>Polyalthia longifolia</i>

Polyalthia Longifolia, memiliki karakteristik pohon tinggi, hijau, seperti piramid, berbentuk kolom, batang utama lurus, tidak terbagi, tumbuh hingga 12 m atau lebih. Cabang ramping, pendek, sekitar 1-2 m panjang, gundul, dan terjumbai. Daun bergantian, distika, aromatik ringan, 7,5-23 dengan 1,5-3,8 cm, bersinar, lanset, meruncing ke apex, marjin yang berombak-ombak, berurat-berurat, kasar atau suborius, pendek petiolate, tangkai daun sekitar 6 mm. Bunga muncul dari cabang di bawah daun, nonfragrant, 2,5-3,5 cm, berwarna kuning ke hijau, di fasik; kelopak 6, 2 berseri, datar, dari dasar yang luas, lanset, panjang menumpuk, menyebar; dan sepal 3, lebar, pendek, segitiga, ujungnya refleks. Benang sari banyak, cuneate; Otot ikat melebar di luar

sel. Ovarium tidak terbatas; ovula 1-2; gaya lonjong. Buah matang berbentuk bulat telur, panjang 1,8-2 cm, banyak, menggantung, gundul, 1 biji; tangkai panjang 1,3 cm, pendek, gundul. Biji halus, bersinar. Berbunga dan berbuah: Februari-Juni (Katkar, Suthar and Chauhan, 2010).



Gambar 2.1 *Polyalthia longifolia*

Keterangan:

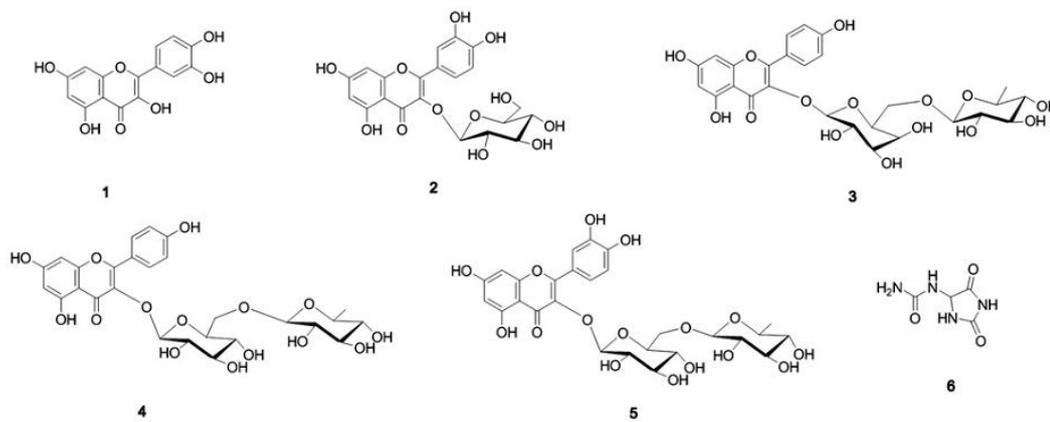
(A) pohon

(B) daun

(C) bunga

Beberapa penelitian penggunaan *Polyalthia longifolia* sebagai obat, diketahui bahwa memiliki senyawa aktif berupa flavonoid, alkaloid, seskuiterpen, diterpen, saponin, alkaloid, dan lain-lain. Ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* memiliki kemampuan sebagai antioksidan. Berdasarkan penelitian (Sashidhara *et al.*, 2011) identifikasi senyawa antioksidan ekstrak etanol *Polyalthia longifolia* ditemukan senyawa meliputi: quarcetin, quarcetin-3-O- β -glucopyrnsoside, kaempferol-3-O- α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6) β -galactopyranoside, kaemferol-3-O- α -rhamnopyranosyl 1-(1 \rightarrow 6) β -glucopyranoside, rutin dan allantoin. Optimasi antioksidasi ekstrak daun *Polyalthia longifolia* menggunakan etanol 80% dengan pengocokan 200 rpm

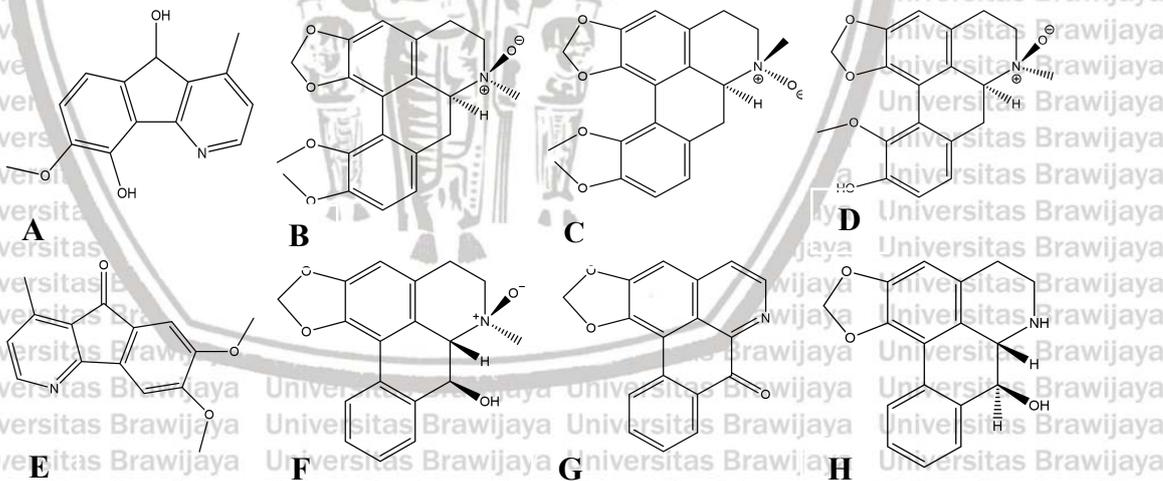
selama 10 menit, rasio 1:10 (Sampath and Vasanthi, 2013) dan etanol 75% dengan suhu 65°C selama 2 Jam, rasio 1:10 (Kumar *et al.*, 2009).



Gambar 2.2 Struktur senyawa flavonoid

Keterangan:

- | | |
|--|--|
| (1) quercetin | (4) kaempferol-3-O- α -rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 6) β -galactopyranoside |
| (2) quercetin-3-O- β -glucopyranoside | (5) rutin |
| (3) kaempferol-3-O- α -rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 6) β -galactopyranoside | (6) allantoin |



Gambar 2.3 Senyawa alkaloid

Keterangan:

- | | |
|---|----------------------------------|
| (A) polylongine | (E) Polyfothine |
| (B) (+)-O-methylbulbocapnine- β -N-oxide | (F) oliveroline β -N-oxide |
| (C) (+)-O-methylbulbocapnine- α -N-oxide | (G) liriodenine |
| (D) (+)-N-methylnandigerine- β -N-oxide | (H) noroliveroline. |

Kandungan alkaloid pada *Polyalthia longifolia* terdiri dari azafluorene dan aporphine. Azafluorene baru yaitu polylongine (5-hydroxy-6-methoxy-1-methyl-4-azafluoren-9-ol), dan 3 aporphine baru berupa (+)-O-methylbulbocapnine- β -N-oxide, (+)-O-methylbulbocapnine- α -N-oxide, dan (+)-N-methylnandigerine- β -N-oxide diisolasi dari daun *Polyalthia longifolia* (Sonn.) Thwaites (Annonaceae) (Wu, 1989; Wang, 1990). Senyawa alkaloid lain dalam tanaman *Polyalthia longifolia* diantaranya liriodenine, oliveroline β -N-oxide, noroliveroline, polyfothine (Wang, 1990), 8-oxopolyalthiane, N-pendulamine A, N-pendulamine B (Katkar, Suthar and Chauhan, 2010). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa alkaloid memiliki aktivitas anti-inflamasi untuk penyakit IBD dengan menghambat NF- κ B, COX-2 dan iNOS (Cristina *et al.*, 2017).

2.2 Inflammatory Bowel Disease (IBD)

Inflammatory Bowel Disease merupakan inflamasi kronis pada saluran pencernaan termasuk lambung, usus halus (duodenum, jejunum, ileum) dan usus besar (kolon). IBD terbagi menjadi dua yaitu Penyakit Crohn (PC) dan Kolitis Ulseratif (KU) (Firman, 2013). Istilah PC digunakan untuk inflamasi yang terjadi pada mulut, estrofagus, lambung dan usus halus. Sedangkan KU digunakan terbatas pada inflamasi usus besar dan rektum (Krzystek-Korpacka, Neubauer and Matusiewicz, 2009).

Penyakit Crohn merupakan salah satu bentuk peradangan yang paling sering di seluruh dunia, ditandai dengan pembentukan striktur, fistula, bisul dan granuloma di mukosa. Meskipun gastrointestinal PC terutama dapat memengaruhi daerah terminal ileum, tetapi juga dapat membahayakan setiap daerah dari mulut ke dubur. Sedangkan KU, ditandai dengan ulserasi superfisial, granularitas dan pola vaskular (De Mattos *et al.*, 2015).

Terdapat beberapa gejala IBD seperti, pendarahan dubur, sakit perut, diare, penurunan berat badan dan panas. Selain itu, terdapat gejala seperti mata merah atau buram, luka pada kulit di bawa kali, sakit pada persendian, luka di

mulut. Terjadinya kerusakan regulasi protein *tight junction* penyusun mukosa juga merupakan tanda pada IBD. (Neuman and Nanau, 2012). *Inflammatory Bowel Disease* ditandai dengan proses inflamasi kronis pada saluran gastrointestinal (GI) (Klein and Eliakim, 2010).

Terdapat 2 kategori utama terapi untuk mengobati IBD yaitu agen anti-inflamasi atau immunosupresif, dan agen biologis. Secara klasik, obat antiinflamasi, seperti 5-aminosalisilat (5-ASAs), digunakan untuk mengobati UC. 5-ASAs efektif untuk pemeliharaan remisi di UC dan juga mengurangi perkembangan tumor dengan menghambat sintesis PG, mengurangi kadar sitokin pro-inflamasi, menghalangi tarik neutrofil dan mengaktifkan sel mast dengan menghambat NF- κ B dalam sel imun, dan mempromosikan ekspresi PPAR- γ dan translokasi nuklear (Lee, Kwon and Cho, 2018). Sulfasalazine merupakan obat IBD golongan 5-ASAs yang paling sering digunakan.

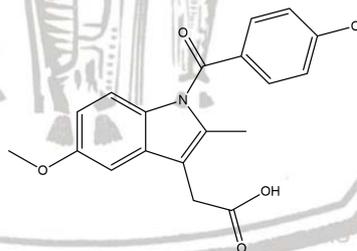
Penyebab IBD belum diketahui secara pasti, namun diduga dapat disebabkan dari dalam seperti imunologis dan genetik, maupun faktor luar seperti merokok, infeksi dan obat-obatan (Klein and Eliakim, 2010; Yosy and Salwan, 2014). Secara umum, IBD diawali dengan infeksi, toksin, produk bakteri, faktor genetik, defek imun sehingga terjadi kaskade inflamasi (Firmansyah, 2013). Penggunaan obat-obatan khusus golongan NSAID juga mampu menyebabkan IBD dengan menghambat kerja enzim *cyclooxygenase* (COX) (Ari dan Makmun, 2014).

Frekuensi pemakaian NSAID masih sangat tinggi untuk antiinflamasi, namun obat tersebut memiliki efek buruk untuk gastrointestinal. Penggunaan NSAID menimbulkan efek toksik berupa kerusakan sel-sel mukosa lambung dan memengaruhi pertahanan mukosa seperti penurunan aliran darah, sintesis lendir dan sekresi bikarbonat (Voutilanen *et al.*, 1998). Obat-obat tersebut mempunyai efek iritasi pada mukosa lambung yang berakibat timbulnya tukak lambung (Tarigan, 2006). Salah satu jenis NSAID yang dapat menyebabkan IBD yaitu Indometasin.

2.3 Indometasin

Non-Steroid Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) merupakan obat yang banyak diresepkan di seluruh dunia (Gosal, Paringkoan and Wenas, 2012; Mardhiyah, Fauzi and Syam, 2015; Zahra *et al.*, 2017). Hampir seluruh pengobatan inflamasi menggunakan NSAIDs (Klein and Eliakim, 2010). Penggunaan obat ini sangat luas karena memiliki sifat analgesik, anti-inflamasi dan antipiretik. Akan tetapi, penggunaan obat ini memiliki efek samping terhadap perlindungan mukosa pencernaan. Obat ini dapat menginduksi kerusakan mukosa saluran pencernaan seperti pendarahan, ulcer dan perforasi (Ilone and Simadibrata, 2017; Bjarnason *et al.*, 2018). Salah satu NSAIDs yang mampu menyebabkan inflamasi pada gastrointestinal adalah Indometasin

Indometasin atau asam 1-(*p*-klorobenzoil)-5-metoksi-2-metilindola-3-asetat memiliki rumus molekul $C_{19}H_{16}ClNO_4$ dengan berat molekul 357,79. Secara fisik, berbentuk serbuk hablur, polimorf, berwarna kuning pucat hingga kuning kecoklatan, tidak berbau, peka terhadap cahaya dan memiliki titik leleh $\pm 162^{\circ}C$. Tidak larut dalam air dingin, kelarutan dalam air hanya 0,937mg/l. Kelarutan dalam kloroform 1 g/30 ml dan larut dalam etanol serta *Castol oil*.



Gambar 2.4 Struktur Indometasin

Indometasin adalah salah satu obat antiinflamasi non-steroid derivat asam indolasetat yang antiinflamasi dan analgetik-antipiretik yang kira-kira sebanding dengan aspirin. Absorpsi indometasin 92-99% dengan terikat pada protein plasma. Indometasin mengalami *first pass metabolism* dan waktu paruh pendek 2-4 jam. Metabolisme terjadi di dalam hati, dalam bentuk tak berubah,

obat ini diekskresikan ke dalam empedu dan urin (Wilmana, 1995). Walaupun obat ini efektif tetapi karena toksik maka penggunaan obat ini dibatasi.

Indometasin menghambat COX-1 dan COX-2 tetapi lebih selektif terhadap penghambatan COX-1. Penghambatan Indometasin terhadap COX-2 mampu menghilangkan tanda dan gejala radang. Namun, penghambatan COX-1 oleh Indometasin akan mengakibatkan penurunan sintesis prostaglandin (Sholichah, Aulanni'am and Mahdi, 2012). Pada lambung penurunan sintesis prostaglandin akan menyebabkan penurunan aliran darah mukosa, penurunan sekresi mukus dan bikarbonat yang mengakibatkan sekresi HCl meningkat. Peningkatan HCl menyebabkan kerusakan mukosa lambung dan meningkatnya *reactive oxygen species* (ROS) (Suleyman *et al.*, 2010).

Peningkatan ROS oleh Indometasin disebabkan karena adanya kebocoran elektron dari sisi spesifik rantai transport elektron. Selain itu, proses oksidasi metabolit Indometasin menjadi imonokuinon serta neutrofil dan makrofaq juga memengaruhi ROS (proses fagositosis) (Maity *et al.*, 2009). Imonokuinon juga menginduksi proses inflamasi dengan mengaktifkan NF- κ B yang mampu melepaskan sitokin seperti Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) dari mukosa lambung. TNF- α mengaktifkan neutrofil, serta melepaskan enzim protease yang mengakibatkan kerusakan lambung (Fornai., dkk 2011). Tikus model IBD dapat dilakukan dengan menggunakan Indometasin 15 mg/kg BB dengan inkubasi selama 24 jam (Aulanni'am, Rosdiana and Rahmah, 2011; Sholichah, Aulanni'am and Mahdi, 2012).

2.4 Lambung

Lambung merupakan bagian dari sistem pencernaan yang memiliki bentuk kantung, berfungsi mencerna makanan dibantu dengan asam klorida (HCl) dan enzim-enzim pencernaan seperti pepsin, renin, dan lipase. Anatomi lambung terbagi menjadi beberapa bagian yaitu kardial, fundus, korpus atau *body*, antrum-pilorik dan pilorus. Dinding lambung terdiri dari lapisan mukosa, sub mukosa, muskularis propia, lapisan sub-serosa dan serosa. Penentuan

kelainan patogenik pada lambung diidentifikasi dari kerusakan lapisan-lapisan pada dinding lambung.

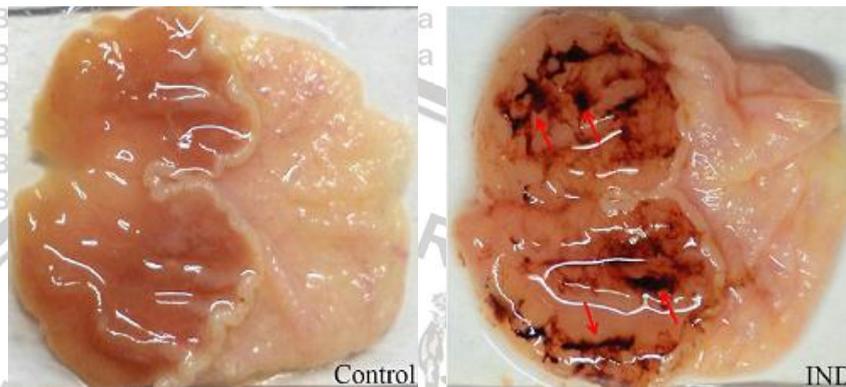
Sitoproteksi prostaglandin dalam lambung dilakukan dengan cara menjaga aliran darah pada mukosa serta meningkatkan sekresi mukosa dan ion bikarbonat. Prostaglandin memperkuat sawar mukosa lambung dengan cara meningkatkan kadar fosfolipid mukosa lambung, sehingga hidrofobisitas permukaan mukosa meningkat, selanjutnya akan mengurangi difusi balik ion hidrogen (Amrulloh and Utami, 2016).

Non-Steroid Anti-Inflammatory Drugs merusak mukosa lambung melalui 2 mekanisme utama yaitu topikal dan sistemik. Kerusakan mukosa secara topikal terjadi karena NSAIDs bersifat lipofilik dan asam, sehingga mempermudah *trapping* ion hidrogen masuk mukosa dan menimbulkan ulserasi. Efek sistemik OAINS lebih penting yaitu kerusakan mukosa lambung terjadi akibat produksi prostaglandin yang menurun (Gosal, Paringkoan and Wenas, 2012; Amrulloh and Utami, 2016).

Sebagian besar NSAIDs bersifat asam lemah dan amfipilik. Interaksi NSAIDs yang amfipilik akan mengurangi integritas dari epitel mukosa. Sedangkan sifat asam lemah NSAIDs akan menyebabkan partikel NSAIDs tidak terionisasi dalam lambung yang memiliki pH asam. Kondisi tersebut menyebabkan partikel NSAIDs mudah berdifusi bersama dengan ion H^+ dalam membran lipid ke sel epitel mukosa. Sebagian obat yang berdifusi akan terjebak dalam epitel mukosa lambung sehingga suasana menjadi netral. Penumpukan NSAIDs menyebabkan epitel mukosa lambung menjadi sembab, terhambatnya pembentukan prostaglandin sebagai proteksif mukosa, dan proses inflamasi. Selain itu, terjadi kerusakan sel akibat *uncoupling* dari fosforilasi oksidatif mitokondria. *Uncoupling* dari fosforilasi oksidatif mitokondria yang mengakibatkan penurunan ATP, meningkatkan ADP dan AMP, meningkatnya radikal bebas serta perubahan Na^+/K^+ (Gosal, Paringkoan and Wenas, 2012; Amrulloh and Utami, 2016; Bjarnason *et al.*, 2018).

Kehadiran NSAIDs akan menurunkan prostaglandin (PGE_2) sebagai unsur penting terhadap perlindungan mukosa lambung. NSAIDs akan

menghambat kerja enzim COX pada reaksi asam arakidonat menjadi prostaglandin. Enzim COX memiliki dua isoform yaitu COX-1 dan COX-2. Penghambatan COX-1 akan memiliki dampak yang buruk terhadap perlindungan mukosa pencernaan. Sebaliknya, pada jaringan inflamasi, penghambatan COX-2 oleh NSAID akan menurunkan inflamasi jaringan (Gosal, Paringkoan and Wenas, 2012; Amrulloh and Utami, 2016).

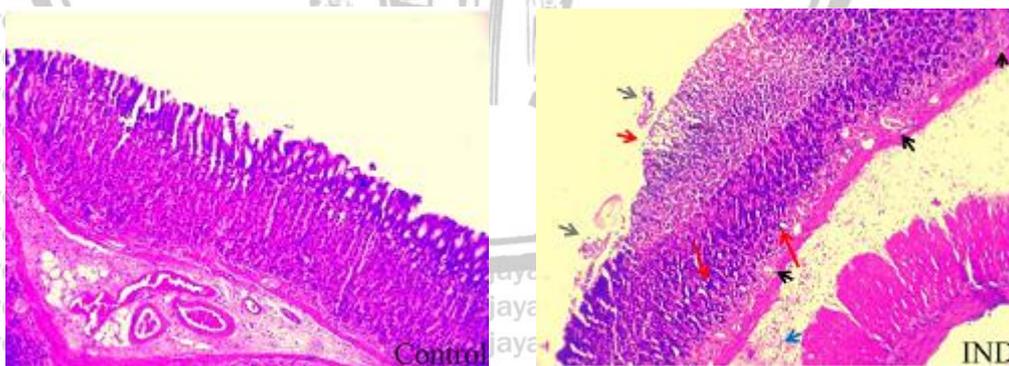


Gambar 2.5. Penampakan lambung tikus yang dibuka (Sinha *et al.*, 2015).

Keterangan:

Control : Lambung normal

IND : Lambung yang terinduksi
Indometasin



Gambar 2.6 Histplog lambung tikus yang diwarnai dengan hematoxylin-eosin (Sinha *et al.*, 2015)

Keterangan:

Control :Histologi lambung tikus normal

IND :Histologi lambung tikus yang diinduksi Indometasin

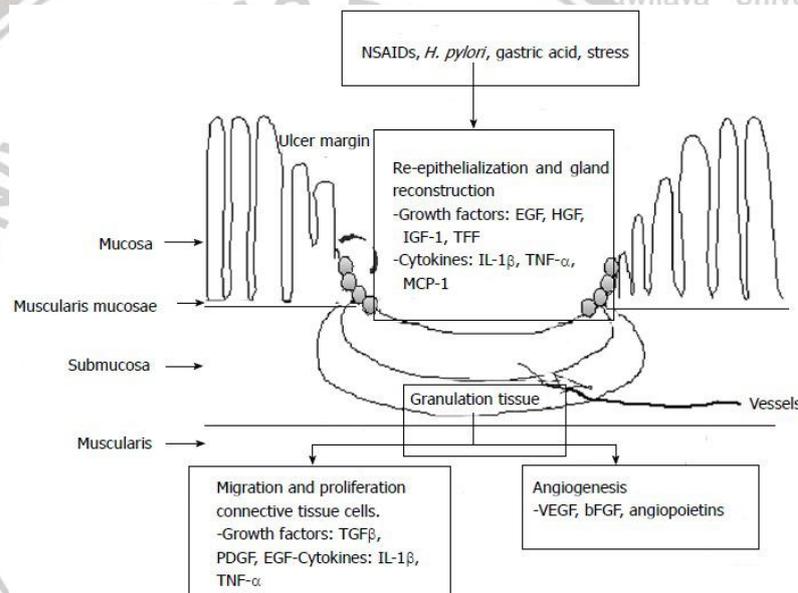
→ :Kerusakan luar mukosa

→ :Adanya eksudat inflamasi

→ :Vasokongestion yang luas

→ :Submukosa yang rusak

Penyembuhan luka adalah proses yang dirancang untuk mengisi defek mukosa dengan sel-sel jaringan epitel dan ikat, termasuk proliferasi sel, migrasi, diferensiasi, regenerasi, angiogenesis aktif dan deposisi matriks ekstraseluler, yang mengarah ke pembentukan bekas luka. Struktur luka lambung terdiri dari margin yang merupakan jaringan epitel yang dibentuk oleh mukosa non-nekrotik yang berdekatan, dan jaringan granulasi yang merupakan jaringan ikat, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.7. Pada margin ulkus, sel-sel epitel berkembang biak dan berpindah ke jaringan granulasi untuk menutupi (re-epithelialize) dan memulai rekonstruksi kelenjar dalam bekas luka (Kangwan *et al.*, 2014).



Gambar 2.7 Skema jalur intraseluler pada mekanisme penyembuhan luka lambung (Kangwan *et al.*, 2014)

Proses re-epitelisasi dan rekonstruksi kelenjar dikontrol oleh faktor pertumbuhan, termasuk EGF, faktor pertumbuhan hepatosit dan insulin seperti faktor pertumbuhan-1 (IGF-1), serta faktor trefoil, termasuk pS2, Trefoil factor family II (TFF II) dan faktor trefoil usus, prostaglandin dihasilkan melalui COX-2, dan sitokin lain yang diproduksi secara lokal oleh sel regenerasi secara teratur dan terintegrasi. Faktor-faktor ini, terutama EGF dan prostaglandin,

memicu proliferasi sel *melalui* jalur transduksi sinyal yang melibatkan aktivasi langsung dan transaktivasi reseptor EGF. Jaringan granulasi berkembang di dasar luka. Ini terdiri dari fibroblas, makrofag dan sel endotel yang berkembang biak membentuk microvessels di bawah kendali faktor pertumbuhan angiogenik, termasuk faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF), bFGF dan angiopoietins. Angiogenesis sangat penting untuk pemulihan mikrosirkulasi darah di mukosa dan dengan demikian penting untuk oksigen dan suplai nutrisi (Kangwan *et al.*, 2014).

Mekanisme utama yang mendasari aktivasi faktor pertumbuhan angiogenik dan ekspresi reseptornya adalah hipoksia, yang mengaktifkan faktor transkripsi, hipoksia-faktor yang dapat diinduksi 1 (HIF-1 α). HIF-1 α , pada gilirannya, up-mengatur ekspresi transkripsi VEGF dan dengan demikian meningkatkan produksi lokal VEGF penting untuk angiogenesis. Hasil akhir dari proses penyembuhan mencerminkan interaksi dinamis antara komponen epitel dari zona "penyembuhan" di margin ulkus dan komponen jaringan ikat (termasuk microvessels) yang berasal dari jaringan granulasi dan dari sel induk berasal sumsum tulang tertarik ke situs cedera (Kangwan *et al.*, 2014).

2.5 Cyclooxygenase (COX)

Cyclooxygenase (COX) merupakan enzim yang berperan terhadap sintesis prostaglandin. Asam arakidonat akan dikatalisis oleh COX menjadi Plostaglandin. COX memiliki dua isoform yaitu COX-1 (*cyclooxygenase-1*) dan COX-2 (*cyclooxygenase-2*). COX-1 disintesis hampir diseluruh tubuh menghasilkan prostanoid yang berperan sebagai *house keeper* diberbagai jaringan, terutama pada selaput lendir gastrointestinal, ginjal, platelet dan epitel pembuluh darah. Sedangkan, COX-2 hanya disintesis pada kondisi tertentu seperti pada saat stimuli radang, mitogenesis atau onkogenesis. Kandungan COX-2 akan meningkat apabila terjadi proses inflamasi (Masbuchin, Putu and Suryana, 2014). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa COX-1 membentuk prostaglansin baik yaitu bersifat protektif akan tetapi, COX-2 membentuk prostaglandin jahat yang menyebabkan inflamasi (Prasetya, 2015).

Kedua isoform siklooksigenase, COX-1 dan COX-2, adalah target dari NSAIDs. Obat-obatan ini adalah inhibitor aktif di kedua COX yang kompetitif. Meskipun kedua COX ada sebagai homodimer, hanya satu pasangan yang digunakan pada suatu waktu untuk pengikatan substrat (Yuan *et al.*, 2009). *Inhibition* COX-1 akan menurunkan proktetifitas sedangkan *inhibition* COX-2 akan mengurangi inflamasi dan rasa sakit (Sholichah, Aulanni'am and Mahdi, 2012).

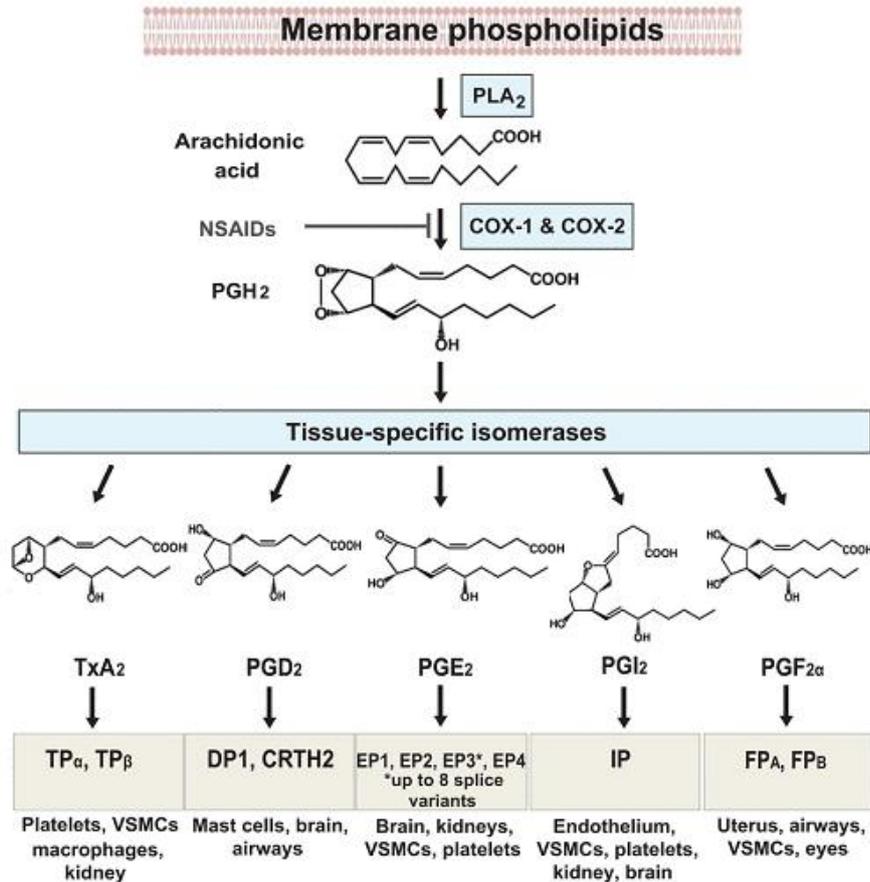
Cyclooxygenase-2 tidak hanya bersifat inducibel, tetapi juga konstitutif pada beberapa jaringan. Ekspresi konstitutif COX-2 ditemukan sangat sedikit pada ginjal pembuluh darah, tulang, pankreas, paru-paru, sumsum tulang dan selaput lendir mukosa lambung (Prasetya, 2015).

2.6 Prostaglandin

Prostaglandin adalah autakoids lipid yang berasal dari asam arakidonat. Prostaglandin memainkan peran penting dalam pembentukan respons inflamasi. Prostaglandin dan tromboksan A₂ (TXA₂), secara kolektif disebut prostanoid, terbentuk ketika asam arakidonat (AA), asam lemak tak jenuh 20-karbon, dilepaskan dari membran plasma oleh fosfolipase (PLA) dan dimetabolisme oleh tindakan sekuens prostaglandin G/H sintase, atau *cyclooxygenase* (COX), dan masing-masing sintase. Ada empat prostaglandin bioaktif utama yang dihasilkan *in vivo*: prostaglandin (PG)E₂ (PGE₂), prostasiklin (PGI₂), prostaglandin D₂ (PGD₂), dan prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}). Selama respon inflamasi, baik tingkat dan profil produksi prostaglandin berubah secara dramatis. Produksi prostaglandin umumnya sangat rendah pada jaringan yang tidak terinflamasi, tetapi segera meningkat pada peradangan akut sebelum perekrutan leukosit dan infiltrasi sel imun (Ricciotti and Fitzgerald, 2013).

Produksi prostaglandin (Gambar 2.8) tergantung pada COX, enzim bifungsional yang mengandung aktivitas *cyclooxygenase* dan peroxidase dan yang ada sebagai isoform berbeda yang disebut COX-1 dan COX-2 (Smith, DeWitt and Garavito, 2000). PGH₂ diproduksi oleh isoform COX dan

merupakan substrat umum untuk serangkaian enzim isomerase dan sintase spesifik yang menghasilkan PGE_2 , PGI_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ dan TXA_2 . Mereka diproduksi di mana-mana - biasanya masing-masing tipe sel menghasilkan satu atau dua produk dominan - dan bertindak sebagai mediator mediasi autocrine dan paracrine untuk mempertahankan homeostasis lokal di tubuh (Ricciotti and Fitzgerald, 2013).



Gambar 2.8 Biosintesis prostaglandin (Ricciotti and Fitzgerald, 2013)

PGE_2 adalah salah satu PG yang paling melimpah yang diproduksi di dalam tubuh, paling banyak dikarakterisasi pada spesies hewan, dan menunjukkan aktivitas biologis yang serbaguna. Di bawah kondisi fisiologis, PGE_2 adalah mediator penting dari banyak fungsi biologis, seperti pengaturan respon imun, tekanan darah, integritas gastrointestinal, dan kesuburan. PGE_2 dapat memodulasi berbagai langkah peradangan dengan cara yang

bergantung pada konteks dan mengoordinasikan seluruh proses di kedua arah pro-inflamasi dan anti-inflamasi (Ricciotti and Fitzgerald, 2013).

Prostaglandin merupakan substansi sitoproteksi yang sangat penting bagi mukosa lambung. Sitoproteksi itu dilakukan dengan cara menjaga aliran darah pada mukosa serta meningkatkan sekresi mukosa dan ion bikarbonat. Prostaglandin memperkuat sawar mukosa lambung dengan cara meningkatkan kadar fosfolipid mukosa lambung, sehingga hidrofobisitas permukaan mukosa meningkat, selanjutnya akan mengurangi difusi balik ion hidrogen (Amrulloh and Utami, 2016).

Prostaglandin E₂(PGE₂) merupakan mediator utama IBD. PGE₂ memiliki efek ganda pada IBD. Kadar PGE₂ yang tinggi akan memperburuk proses inflamasi. Akan tetapi, PGE₂ juga diperlukan untuk menekan gejala colitis dan melindungi kerusakan mukosa dengan mempertahankan integritas dinding epitel (Wang and DuBois, 2011).

2.7 Tikus Putih

Hewan coba merupakan hewan yang dipergunakan pada penelitian biologis dan biomedis yang dipilih berdasarkan syarat atau standar yang diperlukan. Hewan coba memiliki karakteristik yang relatif serupa dengan manusia (aspek fisiologi metabolisme), yang paling sering digunakan adalah tikus putih. Beberapa hewan coba strain tikus di Indonesia yaitu Sprague-Dawley dan Wistar (Ridwan, 2013). Keunggulan tikus sebagai hewan coba yaitu kelengkapan organ, metabolisme biokimianya cukup dekat dengan manusia, kemampuan berkembangbiak tinggi, dan bentuk badan tikus lebih besar daripada mencit (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

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

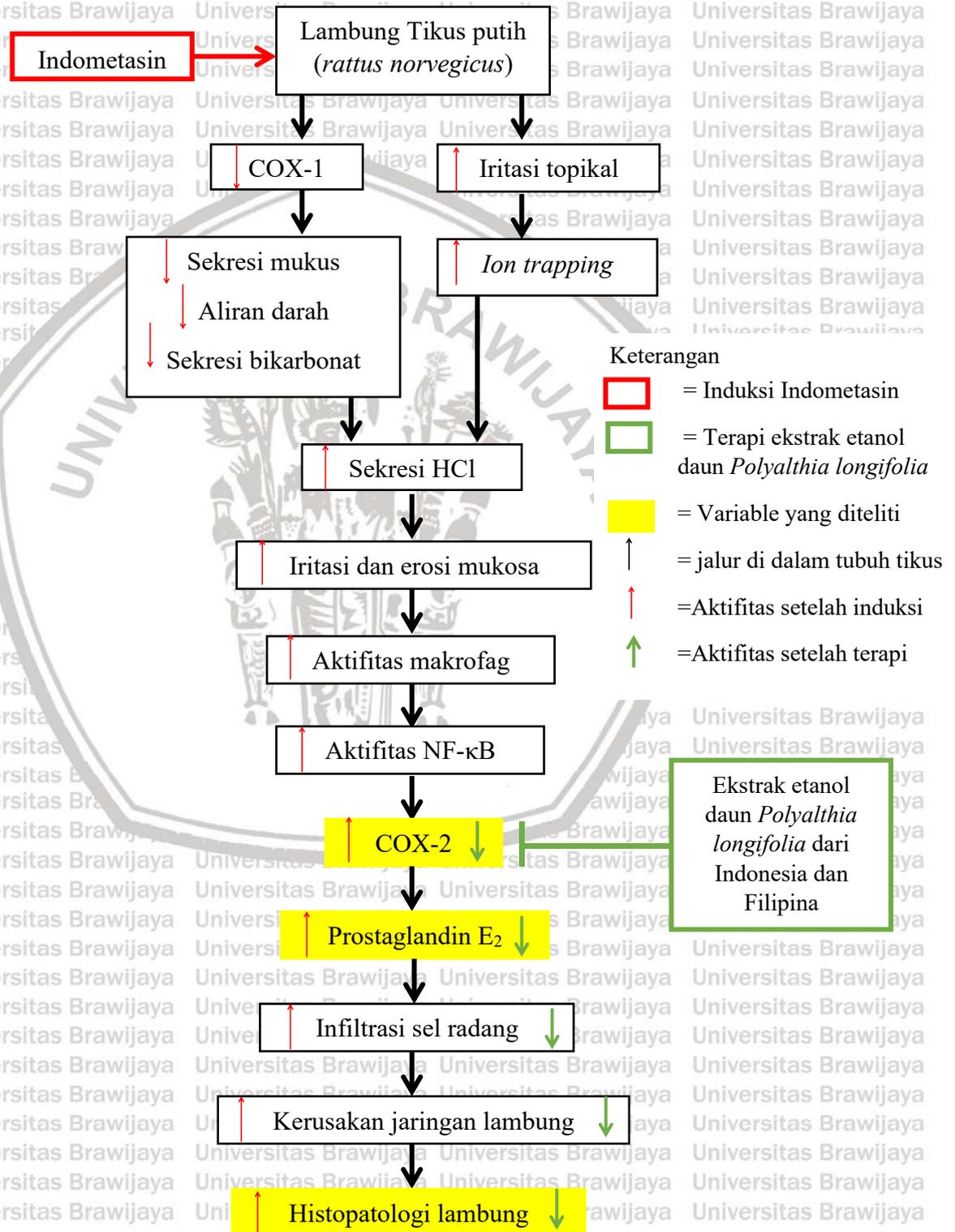
(*Rattus norvegicus*) galur Wistar memiliki klasifikasi sebagai berikut (Amitage, 2004):

Kingdom : Animal
Phylum : Chordata
Ordo : Rodentia
Kelas : Mammalia
Subordo : Sciurognathi
Famili : Muridae
Genus : *Rattus*
Spesies : *Rattus norvegicus*

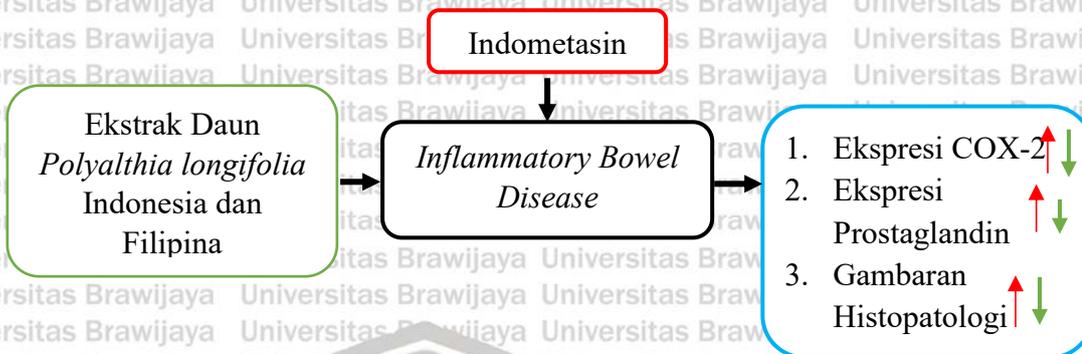


BAB III KERANGKA KONSEP

3.1. Kerangka Teori



3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Kerangka konsep

Kondisi *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dibuat dengan memberikan Indometasin secara oral pada tikus putih. Indometasin merupakan NSAID yang bekerja dengan cara menghambat *cyclooxygenase* 1 (COX-1). Indometasin merusak epitel mukosa dengan dua mekanisme yaitu topical dan sistemik. Kerusakan secara topical terjadi karena bersifat lipofilik dan asam. Asam lemah menyebabkan Indometasin tidak terionisasi dan mudah berdifusi melalui membrane lipid ke dalam sel epitel mukosa bersama ion hidrogen. Indometasin yang berdifusi akan terjebak (*trapping*) dan terjadi penumpukan. Hal tersebut meningkatkan difusi ion hidrogen balik yang selanjutnya membuat suasana lambung semakin asam.

Mekanisme sistemik yaitu dengan penghambatan COX-1. Penghambatan mengakibatkan penurunan prostaglandin E₂ sebagai sitoprotektif pada lambung. Penurunan sintesis prostaglandin akan menyebabkan penurunan aliran darah mukosa, penurunan sekresi mukus dan bikarbonat yang mengakibatkan sekresi HCl meningkat. Peningkatan HCl dan menurunnya sistem pertahanan mukosa lambung menyebabkan erosi atau kerusakan mukosa lambung. Hal tersebut dapat memicu aktifitas makrofag dalam memfagositosis sel debris dari nekrosis dan meginduksi NF- κ B untuk mengaktifkan sitokin proinflamsi seperti (Interleukin-1) IL-1 dan (Tumor Necrosis Factor α) TNF- α . IL1 dan TNF- α menyebabkan lepasnya fosfolipid dari membrane sel epitel sehingga terjadi metabolisme asam arakhidonat. Enzim COX-2 akan mensintesis

PGE₂ dari asam arakhidonat. Pada kondisi inflamasi, ekspresi COX-2 semakin meningkat sehingga sintesis PGE₂ juga semakin tinggi. Peningkatan PGE₂ akan meningkatkan permeabilitas vasodilatasi yang berakibat meningkatkan infiltrasi sel inflamasi. Selain itu, tingginya prostaglandin akan memperparah proses inflamasi dan meningkatkan kerusakan jaringan lambung.

Selain itu, Penghambatan COX-1 akan menyebabkan pendarahan pada mukosa. Pendarahan terjadi akibat berkurangnya proses pembekuan darah yang berhubungan dengan sintesis COX-1. Berkurangnya ekspresi COX-1 juga akan memengaruhi ekspresi COX-2 yang bersifat berkebalikan. Saat proses inflamasi, ekspresi COX-1 menurun sedangkan COX-2 meningkat. Saat kondisi normal atau penyembuhan, ekspresi COX-1 akan meningkat dan COX-2 menurun.

Ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* memiliki berbagai metabolit sekunder yang memiliki potensi sebagai antiinflamasi. Golongan senyawa alkaloid memiliki potensi sebagai antiinflamasi. Kandungan alkaloid pada *Polyalthia longifolia* terdiri dari polylongine, O-methylbulbocapnine-N-oxide, polyfothine, N-methylnandigerine-N-oxide, oliveroline-N-oxide, pendulamine A, N-pendulamine B, 8-oxopolyalthiane, 16-oxo-5, 13-halimadien-15-oic acid, 16-Oxo-3, 13-clerodadien-15-oic acid, 16-hydroxycleroda-3, 13-dien-16, dan 15-olide.

Meningkatnya sekresi COX-2 merupakan tanda inflamasi. Selektif penghambatan COX-2 memiliki keuntungan menurunkan prostaglandin saat inflamasi dan mengurangi toksisitas untuk lambung. Penggunaan *In silico* secara molekular docking antara COX-2 dengan senyawa aktif mampu memperkirakan kemampuan sebagai antiinflamasi. Senyawa tersebut diharapkan mampu sebagai obat inflamasi pada penyakit IBD. Selain itu, perbedaan wilayah dapat menyebabkan memiliki perbedaan senyawa aktif yang dapat memengaruhi efektivitas sebagai obat inflamasi pada penyakit IBD.

3.3. Hipotesis

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

1. Ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina memiliki kemampuan bioaktif sebagai obat antiinflamasi dilihat secara *in silico*.
2. Ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina mampu menurunkan ekspresi COX-2 pada lambung tikus model IBD yang diinduksi Indometasin.
3. Ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina mampu meningkatkan ekspresi prostaglandin E₂ pada lambung tikus model IBD yang diinduksi Indometasin.
4. Pemberian ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina mampu memperbaiki jaringan lambung pada tikus model IBD yang diinduksi Indometasin dilihat dari gambaran histopatologi.



BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan mulai pada bulan Agustus 2018 sampai April 2019. Pelaksanaan preparasi dan ekstraksi dilakukan di Laboratorium Biokimia jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya Malang. Pemeliharaan, induksi Indometasin, dan pembedahan dilakukan pada Laboratorium Hewan, lembaga Biosains. Analisis *cyclooxygenase 2*, prostaglandin E₂ dan pemeriksaan histopatologi dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE) dilaksanakan di Laboratorium Patologi dan Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini antara lain: alat gelas, *rotary evaporator*, spatula, neraca analitik, kandang, sonde, spuit, pinset, vortex, sentrifuge, mikrotip, mikro pipet, pastel, mortal, mikroskop (Olympus CX31), aluminium foil, single pipet, *Freezer*, *rotary microtome*, Inter® Core™ i3-4005U CPU @ 1,70GHz RAM 6,00GB, ChemDraw Ultra 12, PDB (*Protein Data Bank*), PyMol, PyRx 0.8, LigPlot+ v.2, dan lain-lain.

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain: Daun *Polyalthia longifolia* yang berasal dari Indonesia dan Filipina, aquades, etanol, Tikus putih (*Rattus norvegicus*) stain *Wistar* jantan berumur 8-12 bulan dengan berat badan 150-200 gram, Indometasin, minyak jagung, NaCl fisiologis 0,9 %, *Phosphate buffer salin* (PBS) pH 7,4, buffer formalin 10%, xilol, etanol, DAB (*Diamino Benzidine*), anti *Rat COX-2* (Santa Cruz), *SA-HRP(strep-Avidin Horse Radis Peroxidase)*, anti *Rat PGE₂* (Santa Cruz), anti p-PGE₂, dan lain-lain.

4.3 Rancangan Penelitian

Hewan coba yang digunakan merupakan tikus wistar jantan dengan usia 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 gram. Tikus diperoleh dari Institut Biosains Universitas Brawijaya. Hewan coba terbagi atas tiga kelompok yang masing-masing kelompok terbagi menjadi dua dengan masing-masing perlakuan seperti Tabel 4.1. Penentuan jumlah ulangan disetiap kelompok dihitung berdasarkan rumus Ferderer:

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

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

$$(n-1) 5 \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

t = jumlah kelompok

n = jumlah tikus yang diperlukan tiap kelompok uji

Berdasarkan hasil perhitungan di atas, setiap kelompok dibutuhkan ulangan sebanyak 4 ekor. Sehingga diperlukan 24 ekor tikus putih jantan

Tabel 4.1 Pembagian kelompok berdasarkan perlakuan

No.	Kelompok	Pembedahan	Jumlah Ulangan	Perlakuan
1	Sulfasalazine	Hari ke-7 Hari ke-14	4 4	Dibuat IBD, diberi obat Sulfasalazine 10 mg/kg BB
2	Ekstrak Indonesia	Hari ke-7 Hari ke-14	4 4	Dibuat IBD, diberi ekstrak etanol daun <i>Polyalthia longifolia</i> Indonesia 300 mg/kg BB
3	Ekstrak Filipina	Hari ke-7 Hari ke-14	4 4	Dibuat IBD, diberi ekstrak etanol daun <i>Polyalthia longifolia</i> Filipina 300 mg/kg BB

Hewan coba diaklimatisasi selama seminggu. Selanjutnya, pada hari ke-1 dilakukan induksi Indometasin 15 mg/kg BB dan diinkubasi selama 24 jam.

Pada hari ke-2 kelompok obat, ekstrak Indonesia dan ekstrak Filipina mulai diterapi sesuai perlakuan tiap kelompok selama 7 hari dan 14 hari. Pada hari ke-9 dan 16, dilakukan pembedahan untuk mengambil organ lambung untuk dilakukan analisis COX-2, prostaglandin dan HE.

Tabel 4.1 Rumus perhitungan

Perlakuan	Ulangan				Total	Rata-rata
	1	2	3	4		
S7	S7.1	S7.2	S7.3	S7.4	$\sum_1^4 S7$	$\frac{\sum_1^4 S7}{4}$
S14	S14.1	S14.2	S14.3	S14.4	$\sum_1^4 S14$	$\frac{\sum_1^4 S14}{4}$
I7	I7.1	I7.2	I7.3	I7.4	$\sum_1^4 I7$	$\frac{\sum_1^4 I7}{4}$
I14	I14.1	I14.2	I14.3	I14.4	$\sum_1^4 I14$	$\frac{\sum_1^4 I14}{4}$
F7	F7.1	F7.2	F7.3	F7.4	$\sum_1^4 F7$	$\frac{\sum_1^4 F7}{4}$
F14	F14.1	F14.2	F14.3	F14.4	$\sum_1^4 F14$	$\frac{\sum_1^4 F14}{4}$

Keterangan:

- S7 : Kelompok perlakuan dengan Sulfasalazine selama 7 hari
- S14 : Kelompok perlakuan dengan Sulfasalazine selama 14 hari
- I7 : Kelompok perlakuan dengan Ekstrak Indonesia selama 7 hari
- I14 : Kelompok perlakuan dengan Ekstrak Indonesia selama 14 hari
- F7 : Kelompok perlakuan dengan Ekstrak Filipina selama 7 hari
- F14 : Kelompok perlakuan dengan Ekstrak Filipina selama 14 hari

Tabel 4.2 ANOVA (*Analysis of Variance*)

S.V.	df ^x	SS	SM ^{xx}	F ^{xxx}	F5%	F1%
Treatment	5	SST	MST		2,77	4,25
Error	18	SSE	MSE			
Total	23					

Keterangan:

- x). df *varietas (treatment)* = t-1 = 6-1 = 5
- df total = nt-1 = 24-1 = 23
- df error = df total-df var. = 23-5 = 18

$$MS_{Varietas} = \frac{SS_{Varietas}}{df_{Error}}$$

$$MS_{Error} = \frac{SS_{Error}}{df_{Error}}$$

$$F_{Calculated} (F \text{ dihitung}) = \frac{MS_{Varietas}}{MS_{Error}}$$

xxx).

4.4 Variabel Penelitian

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

Variabel terikat : ekspresi COX-2, Plostaglandin E₂ (PGE₂), dan Gambaran histopalologi lambung.

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

4.5 Tahap Peneliatian

1. Preparasi sampel simplisia dan ekstraksi daun *Polyalthia longifolia*.
2. Uji LC-MS (*Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy*)
3. Uji *in silico* simulasi molecular docking bioaktif dari daun *Polyalthia longifolia*
4. Perlakuan hewan coba
5. Induksi Indometasin sebagai pemodelan tikus IBD
6. Perbandingan terapi menggunakan *Polyalthia longifolia* dari Indonesia, *Polyalthia longifolia* Filipina dan obat Sulfasalazine
7. Pembedahan dan pengambilan organ lambung
8. Pengukuran Ekspresi COX-2
9. Pengukuran Ekspresi PGE₂
10. Pengamatan Hematoksinilin Eosin Organ Lambung
11. Analisis

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Preparasi Sampel Simplisia dan Ekstraksi Daun *Polyalthia longifolia*

Daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dikumpulkan dari wilayah kota Malang, Jawa Timur, sedangkan daun *Polyalthia longifolia* Filipina diperoleh dari Dr. Ma. Asuncion G. Beltran. Daun yang diperoleh dicuci dengan air bersih dan mengalir. Daun yang sudah bersih, dikering anginkan lalu dihaluskan hingga diperoleh serbuk dan diayak dengan ayakan 60 mesh.

Ekstraksi daun *Polyalthia longifolia* dilakukan dengan metode maserasi dingin. Serbuk daun *Polyalthia longifolia* sebanyak 250 gram direndam dengan 1250 ml etanol 70% selama 2-3 hari. Hasil maserasi disaring menggunakan kertas Whatman dan diulangi kembali proses ekstraksi dua kali (tiga kali maserasi). Memekatkan filtrat dilakukan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 60°C.

4.6.2 Analisa LC-MS (*Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy*)

Ekstrak etanol *Polyalthia longifolia* sebanyak 0,05 g dilarutkan dalam 5 mL campuran metanol:air:asam formiat 80% (8:2:1). Larutan disonifikasi selama 5 menit dan dipanaskan selama 3 jam pada 65°C. Supernatan diambil setelah dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 4500rpm. Supernatan yang diperoleh diekstraksi kembali dengan petroleum eter. Larutan disaring dengan saringan 0,2 mikron. Filtrat yang diperoleh diinjeksikan pada instrument LC-MS untuk identifikasi senyawa.

Senyawa alkaloid diidentifikasi menggunakan molekul target dari 7 senyawa dengan menggunakan m/z $[M]^+$ sampai $[M+H]^+$. Kolom pemisahan yang digunakan yaitu Kinetex 1,7 μ m EVO (50 x 21 mm). Fase gerak berupa air (A) dan asetonitril (B) dengan laju 300 μ L/menit. Perbandingan eluen 90%(A) dan 10%(B) pada menit 0.00 sampai 0.60, 25%(A) dan 75%(B) pada menit 5.00 sampai 5.50. pada menit 6.00 sampai 7.50 menggunakan perbandingan eluen 90%(A) dan 10%(B).

4.6.3 Uji *in silico* secara Simulasi Molecular Docking Bioaktif dari Daun *Polyalthia longifolia*

Persiapan ligan dan reseptor. Ligan adalah senyawa alkaloid yang teridentifikasi hasil LC-MS dan ditambahkan senyawa *gold standard* IBD (Sulfasalazine). Preparasi ligan dilakukan dengan menggambar senyawa dengan ChemDraw Ultra 12 dan disimpan dalam bentuk .sdf. Reseptor COX-2 (PDB: 3LN1) berupa protein dan ligan (Ceoxib) yang diperoleh dari <http://rcsb.org>. Preparasi reseptor menggunakan program Pymol dengan menghilangkan ligan dan air yang telah berikatan dengan protein yang akan didocking. Selain itu, protein dihilangkan chain B, C dan D. Optimasi ligan dilakukan dengan program “babel” sedangkan *specific docking* dilakukan dengan program Autodock Vina pada software PyRx 0.8. *Specific docking* dilakukan pada Center (X:31,2552; Y:-23,4834; Z:-16,1872) Dimensions (Angstrom)(X: 17,4839; Y:17,3785; Z:21,3620). Hasil *docking* berupa kekuatan ikatan interaksi antara ligan dan reseptor. Analisis interaksi dengan asam amino digunakan program Ligplot+ v.2.

4.6.4 Perlakuan Hewan Coba

Hewan coba merupakan tikus putih jantan, diaklimatisasi di laboratorium selama 1 minggu dalam kandang khusus untuk menyeragamkan cara hidup, makan dan kondisi kandang percobaan. Semua tikus diberi pakan komersial dan air secara *ad libitum*. Alas dalam kandang tikus menggunakan sekam kayu yang dilakukan penggantian sekam kayu selama 3 hari sekali. Menggunakan pencahayaan alami yang masuk melewati jendela dengan suhu ruang.

Hewan coba diinduksi dengan Indometasin dosis 15 mg/Kg BB pada hari ke-1. Pada hari ke-2 hewan coba mulai diterapi, kelompok obat diberi obat Sulfasalazine 10 mg/kg BB, kelompok ekstrak Indonesia diberi ekstrak *Polyalthia longifolia* Indonesia dosis 300 mg/kg BB dan kelompok ekstrak Filipina diberi ekstrak *Polyalthia longifolia* Filipina dosis 300 mg/kg BB.

Terapi dilakukan sehari 1x selama 7 dan 14 hari sampai hari ke-8 dan ke-15. Pembedahan dilakukan pada hari ke-9 dan ke-16 untuk diambil organ lambung dan dilakukan analisis.

4.6.5 Pembedahan dan Pengambilan Organ Lambung

Hewan coba dieuthanasi dengan menggunakan dislokasi leher. Selanjutnya, hewan coba diletakkan pada papan bedah, diposisikan rebahan dorsal menggunakan pin. Pembedahan dimulai dari bagian perut (*linea alba*) menggunakan gunting. Organ lambung yang diinginkan diambil dan dipisahkan dari organ yang lainnya. Organ lambung dibilas dengan NaCl fisiologis dingin dan dibagi menjadi tiga bagian. Ketiga bagian dimasukkan dalam larutan buffer *formalin*.

4.6.6 Pengukuran Ekspresi COX-2 dan PGE₂

4.6.6.1 Pembuatan Parafin Block Jaringan

Organ lambung yang telah difiksasi dengan buffer formalin 105 didehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96% dan absolut) masing-masing 60 menit. Lambung clearing menggunakan xilol 2 kali masing-masing 60 menit. Kemudian organ lambung diinfiltrasi dengan parafin lunak selama 60 menit pada suhu 48°C. Organ lambung dilakukan block dalam parafin keras pada cetakan dan didiamkan selama sehari. Keesokan harinya, block lambung ditempelkan pada holder dan dilakukan pemotongan setebal 4-6 µm dengan rotary microtome. Potongan irisan lambung dipindahkan dengan kuas ke dalam air hangat 38-40°C. Irisan selanjutnya diambil dengan objek gelas dan diletakkan di atas *hot plate* 38-40°C samapai kering. Dan yang terakhir, preparat disimpan dalam inkubator pada suhu 38-40°C selama sehari.

4.6.6.2 Proses Deparafinasi

Gelas obyek hasil paraffin block direndam dalam xilol 3 kali masing-masing selama 15 menit. Setelah itu slide lambung direhidrasi menggunakan

alkohol berseri (absolut, 96%, 80%, 70%) masing-masing selama 55 menit. Kemudian slide didiamkan dalam lemari es dengan suhu 4°C selama semalam. Slide dilakukan pencucian dengan aquades sebanyak 3 kali selama 3 menit

4.6.6.3 Pewarnaan Imonohistokimia COX-2

Pertama, slide dicuci dengan PBS selama 5 menit. Hidrogen peroksida 3% digunakan untuk *bloking endogenous peroksida* yang diinkubasi selama 40 menit. Pencucian slide digunakan larutan PBS dengan 3x pencucian selama 3 menit. Unspesifik protein dibloking dengan serum albumin yang mengandung FBS 1% dan 0,2% Triton X). Proses blocking dilakukan selama semalam. Slide preparat dicuci tiga kali selama 3 menit dengan larutan PBS. Antibodi primer (*rat COX-2 polyclonal*) ditambahkan dan diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Setelah inkubasi, slide preparat dicuci kembali sebanyak tiga kali selama 3 menit. Selanjutnya, antibodi sekunder universal biotin conjugated ditambahkan pada preparat dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu ruang. Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 3x selama 3 menit. SA-HRP ditambahkan dan diinkubasi selama 40 menit. Pencucian preparat dengan larutan PBS sebanyak tiga kali. DAB (Diamino Benzidine) diteteskan pada preparat dan inkubasi selama 10 menit. Preparat dicuci menggunakan PBS kembali sebanyak tiga kali pencucian, selama 3 menit tiap pencucian. Mayer Hematoxilen digunakan untuk Counterstaining. Mayer didiamkan selama 5 menit dan ditambahkan air pH 8 dan diinkubasinya selama 10 menit dan pencuciannya menggunakan tap water. Kemudian, preparat dibilas menggunakan aquades dan dikering anginkan. Preparat selanjutnya dilakukan mounting entellan dan ditutup dengan cover glass. Kemudian dilakukan pengamatan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x, ekspresi enzim COX-2 ditunjukkan dengan warna coklat pada jaringan lambung.

4.6.6.4 Pewarnaan Imonohistokimia PGE₂

Pertama, slide IHK yang telah dilakukan deparafinisasi dicuci dengan PBS selama 5 menit. Hidrogen peroksida 3% digunakan untuk *bloking endogenous peroksida* yang diinkubasi selama 40 menit. Slide dicuci sebanyak 3x dengan larutan selama 3 menit. Unspesifik protein dibloking dengan serum

albumin yang mengandung FBS 1% dan 0,2% Triton X). Proses blocking diinkubasi selama semalam. Dilanjutkan dengan pencucian dilakukan sebanyak 3x selam 3 menit dengan PBS. Antibodi primer (*rat PGE₂ polyclonal*) ditambahkan dan diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Setelah inkubasi, slide preparat dicuci dengan PBS tiga kali selama 3 menit. Selanjutnya, antibodi sekunder universal biotin conjugated ditambahkan pada preparat dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu ruang. Preparat dicuci kembali dengan PBS sebanyak tiga kali, selama 3 menit. SA-HRP ditambahkan dan diinkunasi selama 40 menit. Pencucian kembali dengan PBS selama 3 menit sebanyak 3x. DAB (Diamino Benzidine) diteteskan pada preparat dan inkubasi selama 10 menit. Preparat dicuci kembali menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 3 menit. Mayer Hematoxilen digunakan untuk Counterstaining. Mayer hematoxilen didiamkan selam 5 menit dan ditambahkan air pH 8 dan didiamkan kembali selama 10 menit dan pencuciannya menggunakan tap water. Kemudian, preparat dibilas menggunakan aquades dan dikeringanginkan. Preparat selanjutnya dilakukan mounting entellan dan ditutup dengan cover glass. Selanjutnya dilakukan pengamatan preparat diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x, ekspresi enzim PGE₂ ditunjukkan dengan warna coklat pada jaringan lambung.

4.6.7 Pengamatan Hematoksin Eosin Organ Lambung

4.6.7.1 Fiksasi, Dehidrasi, *Clearing* dan *Embedding*

Fiksasi dengan merendam organ lambung dalam larutan buffer formalin 10% selama 24 jam untuk mencegah kerusakan jaringan, mengawetkan komponen sitologi dan histologi, mengeraska materi yang lunak agar jaringan, dan menghentikan proses metabolisme. Proses dehidrasi dilakukan untuk mengeluarkan air dari jaringan lalu diisi parafin sehingga dapat diiris tipis. Alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%) dilakukan untuk dehidrasi, dehidrasi dilakukan selama 5 menit tiap konsentrasi.

Proses *clearing* dilakukan dengan memindahkan organ lambung ke larutan penjernih mulai dari xylol I ke xylol II selama 1 jam pada suhu kamar

dan inkubator masing-masing selama 30 menit. Organ lambung dilakukan *embedding* dengan memasukan organ lambung ke dalam parafin cair pada suhu 65 °C selama 2 jam. Organ lambung diambil dengan menggunakan pinset blok yang ukurannya sesuai dengan tempat blok *microtome*.

Lambung tikus diembedding dengan merendam organ lambung dalam larutan fiksasi (buffer formalin). Kemudian direndam dengan etanol 70% selama 24 jam. Kemudian organ lambung dipindahkan dalam 80% selama 2 jam, etanol 90%, 95% dan absolut masing-masing selama 20 menit. Proses ini dilakukan sebanyak 3x dan dilanjutkan dengan memasukkan kembali ke dalam larutan xilol dan dilakukan pada suhu 60-63°C.

4.6.7.2 Pembuatan Preparat

Pembuatan preparat lambung dengan memasukkan hasil *embedding* pada penjepit (*block holder*). Block tersebut dipasang pada *microtome* dan diatur agar posisinya sejajar dengan posisi pisau. *Sectioning* (pemotongan) dengan ukuran irisan 5 µm. Hasil irisan dipindahkan dan direndam pada *water bath* dengan suhu 38-40°C untuk membuka lipatan. Irisan diletakkan pada *object glass* dan disimpan dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 38-40°C.

4.6.7.3 Pewarnaan dengan Hematoksilin Eosin

Pewarnaan dilakukan dengan melakukan deparafinasi yaitu dengan memasukkan preparat xylol bertingkat dari xylol I-III masing-masing selama 5 menit. Rehidrasi dilakukan dengan memasukkan preparat ke dalam alkohol mulai dari 95%, 90%, 80%, 70% masing-masing selama 5 menit. Pewarnaan preparat dilakukan dengan pewarna hematoxyline selama 10 menit lalu dicuci dengan aquades selama 5 menit dan dimasukkan ke dalam pewarna eosin selama 5 menit lalu dicuci kembali dengan aquades.

Preparat didehidrasi dalam alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%). Selanjutnya dilakukan *cleaning* dengan memasukkan dalam xylol I dan II lalu dikeringkan. Proses *mounting* dengan menggunakan entellan serta ditutup menggunakan *coverglass*. Proses terakhir yaitu pengamatan dengan mikroskop dengan perbesaran 40x.

4.7 Analisis Hasil

Hasil pemisahan menggunakan LC-MS diidentifikasi berdasarkan pola puncak pemisahan pada tiap senyawa target. Potensi antiinflamasi senyawa alkaloid dilihat dari hasil *molecular docking* berdasarkan nilai energi ikat yang rendah dan banyak terikat dengan asam amino pada sisi aktif yang sama dengan inhibitor reference. Data ekspresi COX-2 dan PGE₂ dilakukan deskripsi dan dilakukan konversi menggunakan immono rasio. Data hasil konversi dilakukan uji normalitas dan homogenitas dengan uji *One Way ANOVA* untuk melihat beda nyata terkecil dengan kepercayaan 0,01. Selanjutnya dilakukan uji lanjutan menggunakan *Tukey test*. Gambaran histopatologi organ lambung dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan perubahan jaringan dan pembentukan epitel pada mukosa.



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Skrining Fitokimia dan Identifikasi Senyawa Alkaloid Ekstrak Etanol Daun *Polyalthia longifolia*

Hasil maserasi ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* (EEDPL) dari Indonesia dan Filipina yang telah dievaporasi menghasilkan ekstrak kental berwarna hijau gelap kecoklatan. Kedua ekstrak yang telah diperoleh di lakukan uji golongan senyawa yang meliputi saponin, tanin, alkaloid, terpenoid dan flavonoid. Hasil uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 5.1.

5.1 Hasil uji golongan senyawa pada EEDPL yang berasal dari Indonesia dan Filipina.

<i>Polyalthia longifolia</i>	Golongan Senyawa				
	Flavonoid	Tanin	Alkaloid	Saponin	Terpenoid
Indonesia	+	+	+	+	+
Filipina	+	+	+	+	+

Keterangan: (-)=tidak terdeteksi, (+)= terdeteksi

Berdasarkan Tabel 5.1, kedua ekstrak teridentifikasi golongan senyawa yang sama yang meliputi flavonoid, tanin, alkaloid, saponin dan terpenoid. Hasil uji golongan senyawa tersebut sama dengan penelitian sebelumnya yang mengatakan bahwa ekstrak etanol mengandung golongan senyawa saponin (Soemarie *et al.*, 2018), tanin, alkaloid, terpenoid, dan flavonoid (Thenmozhi and Sivaraj, 2010). Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan geografis tidak memengaruhi golongan senyawa ekstrak tanaman *Polyalthia longifolia*.

Alkaloid merupakan golongan senyawa kimia utama pada tanaman *Polyalthia longifolia* selain terpenoid (Dixit *et al.*, 2014). Berdasarkan Katkar, Suthar and Chauhan (2010) tanaman *Polyalthia longifolia* memiliki kandungan alkaloid berupa: polylongine, polyfothine, liriodenine, noroliveroline, oliveroline β -N-oxide, N-methylnandingerine β -N-Oxide dan O-

methylbolbocapni-N-oxide. Identifikasi senyawa alkaloid dari EEDPL dilakukan dengan menggunakan instrument LC-MS. *Ion source* yang digunakan berupa *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI).

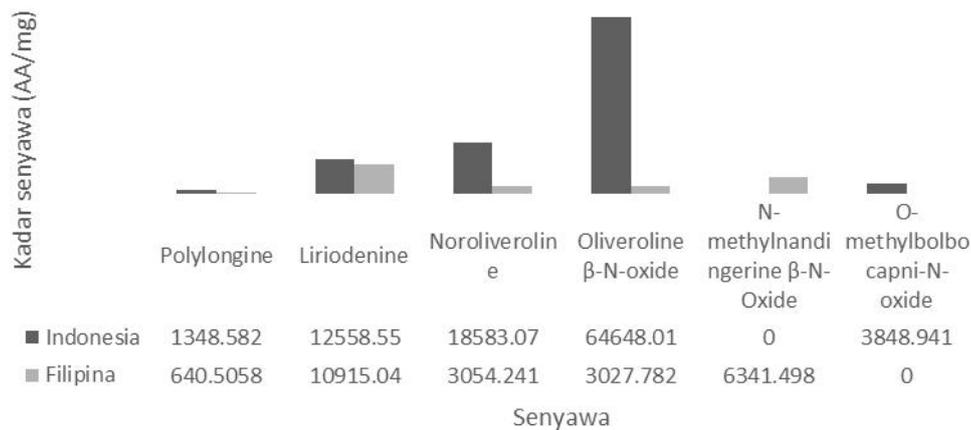
Identifikasi senyawa berdasarkan berat molekul target menggunakan m/z M^+ - $[M+H]^+$. Hasil identifikasi senyawa alkaloid ditunjukkan pada Tabel 5.1.

Tabel 5.2 Identifikasi senyawa alkaloid

Prediksi Senyawa	BM	Asal	RT	Kadar *(AA/mg)
Polylongine	243	Indonesia	0.68	1348.582
		Filipina	0.71	640.5058
Polyfothine	255	Indonesia	0	0
		Filipina	0	0
Liriodenine	275	Indonesia	3.09	12558.550
		Filipina	3.09	10915.040
Noroliveroline	281	Indonesia	2.75	18583.070
		Filipina	2.75	3054.241
Oliveroline β -N-oxide	311	Indonesia	2.99	64648.010
		Filipina	2.99	3027.782
N-methylnandingerine β -N-Oxide	341	Indonesia	-	0
		Filipina	4.87	6341.498
O-methylbolbocapni-N-oxide	355	Indonesia	4.92	3848.941
		Filipina	-	0

Keterangan: (*) Kadar dihitung berdasarkan luas area (AA) per berat ekstrak (mg)

Berdasarkan Tabel 5.2, diketahui bahwa EEDPL yang berasal dari Indonesia mengandung senyawa polylongine, liriodenine, noroliveroline, oliveroline β -N-oxide, dan O-methylbolbocapni-N-oxide. Sedangkan, pada EEDPL yang berasal dari Filipina mengandung senyawa polylongine, liriodenine, noroliveroline, oliveroline β -N-oxide dan N-methylnandingerine β -N-Oxide. Urutan kepolaran senyawa polylongine > noroliriodenine > oliveroline- β -N-oxide > liriodenine > N-methylnandingerine β -N-Oxide > O-methylbolbocapni-N-oxide. Kadar senyawa EEDPL yang berasal dari Indonesia lebih tinggi dibandingkan dengan kadar EEDPL dari Filipina. Selain dapat diurutkan secara kepolarannya, dapat pula diurutkan berdasarkan kadar senyawa alkaloid (Gambar 5.1).



Gambar 5.1 Grafik kadar senyawa alkaloid

Gambar 5.1 menunjukkan bahwa senyawa oliveroline β-N-Oxide memiliki kadar yang paling tinggi pada EEDPLI. Sedangkan pada EEDPLF kadar tertinggi adalah senyawa liriodenine. Kedua ekstrak memiliki senyawa terendah yang sama yaitu polylongine.

Berdasarkan uraian di atas, perbedaan lokasi asal tanaman *Polyalthia longifolia* menyebabkan perbedaan senyawa aktif beserta kadarnya. Perbedaan geografis akan memengaruhi kandungan senyawa aktif (Colegate and Molyneux, 2007; Liu *et al.*, 2016). Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa perbedaan geografis memengaruhi kadar senyawa aktif (Aparecida *et al.*, 2016) dan aktivitasnya secara *in vitro* maupun *in vivo* (Kanungo, Rout and Sahoo, 2013).

5.2 Molecular Docking Senyawa Alkaloid Sebagai Antiinflamasi

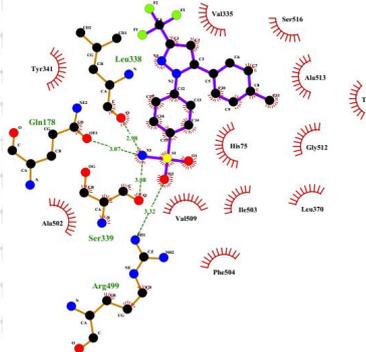
Senyawa alkaloid dari daun *Polyalthia longifolia* diduga memiliki efek antiinflamasi. Enzim COX akan mengkatalisis pembentukan PGE dari asam arakhidonat. Enzim COX-2 merupakan enzim yang inducibel yang disebabkan oleh inflamasi. Penghambatan COX-2 secara klinikal efektif sebagai agen antiinflamasi yang tidak memberikan efek buruk bagi gastrointestinal. Uji *in silico* dilakukan untuk mengetahui interaksi senyawa yang berasal dari EEDPL dengan sisi aktif COX-2. *Molecular docking* dilakukan dengan program PyRx

untuk mengkaji kemampuan senyawa sebagai antiinflamasi. Visualisasi dengan *Ligplot+* digunakan untuk melihat interaksi dan ikatan pada asam amino (Gambar 5.1). Senyawa alkaloid yang terdiri dari polylongine, liriiodenine, noroliveroline, oliveroline- β -N-oxide, N-methylnandingerine- β -N-oxide, dan O-methylbulbocapi-N-Oxide didocking dengan sisi aktif COX-2 dapat dilihat pada Tabel 5.3

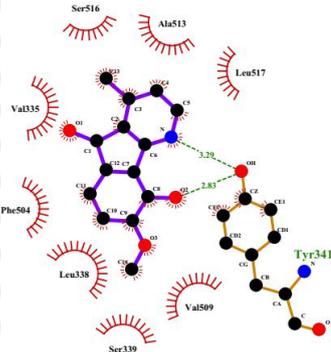
Tabel 5.3 Hasil *molecular docking* senyawa alkaloid

Senyawa/ Ligan	Energi ikatan (kkal/ mol)	Jarak atomik (Å) ikatan hidrogen	Residu asam amino ikatan hidrogen	Residu asam hidrofobik amino ikatan
Polylongine	-8,7	3,29 2,83	Tyr341	Leu517; Ala513 ;Ser516;Val335; Phe504 ;Leu338; Ser339 ;Val509 Val335 ;Ala513;Ser516;Leu338; Val509 ; Phe504 ; Ser339 ; Tyr341 ; Leu517
Liriiodenine	-10,9			Val335;Leu338; Phe504 ; Ser339 ; Val509 ; Tyr341 ;Leu517;Arg106 Phe504 ; Val509 ; Met508 ; Leu338 ;Tyr371; Trp373 ;Ser516;Leu517; Val335 ; Ala513 ; Tyr341 ; Ser339 Leu517; Val335 ; Ala513 ; Gly512 ; Leu338 ; Ser339 ; Phe504 ; Val509 ; Tyr341 ;Leu345
Noroliveroline	-10,7	3,27 3,12	Ala513 Ser516	
Oliveroline- β -N-oxide	-9,3			
N-Methylnandingerine- β -N-Oxide	-7,4	3,05	Ser516	
O-Methylbulbocapi-N-oxide	-8,2			Tyr371; Trp373 ; Phe504 ; Leu338 ; Tyr341 ;Ser516; Ala513 ; Val509 ; Arg106; Ser339 ; Val335 ;Leu517; Leu345;Val102 Ile98; Phe343 ; Tyr341 ; Ala513 ; Met508 ; Trp373 ; Phe367 ; Yyr371 ; Gly512 ; Leu370; Val335 ; Leu338 ; Leu517 ; Arg106;Leu78;Tyr101;Val1102
Sulfasalazine	-7,1	3,07	Ser516	

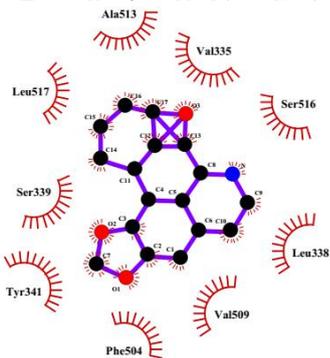
Keterangan: **bold** = asam amino yang sama dengan *inhibitor reference* (*Celoxib*).



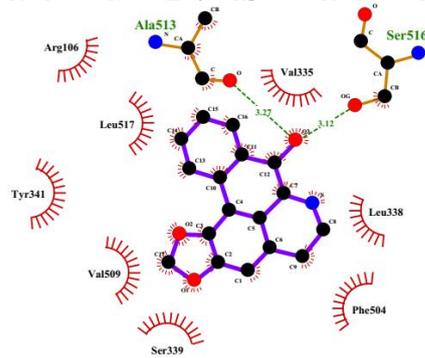
Inhibitor reference (Celoxib)



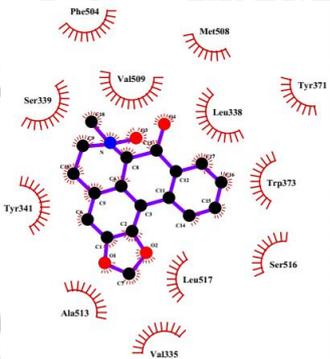
Polylongine



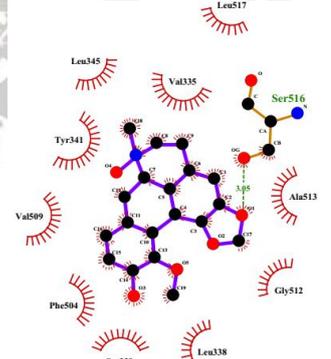
Liriodenine



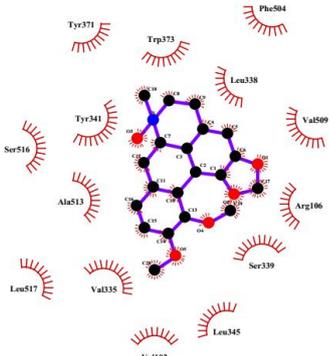
Noroliveroline



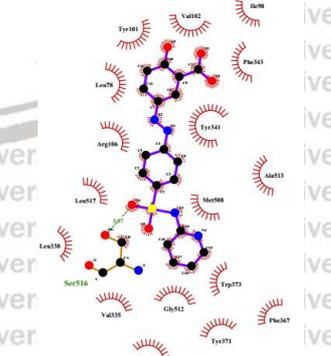
Oliveroline-β-N-oxide



N-Methylnandingerine-β-N-Oxide



O-Methylbulbocapni-N-oxide



Sulfasalazine

Gambar 5.2 Interaksi senyawa dengan asam amino

Berdasarkan Tabel 5.3, diketahui potensi masing-masing senyawa sebagai antiinflamasi dilihat dari energi ikat dan interaksi asam amino. Keseluruhan energi ikat senyawa yang didocking memiliki nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*) < 2 yaitu 0. RMSD merupakan perbedaan antara nilai prediksi dan pengamatan eksperimen, semakin kecil nilai RMSD yang diperoleh maka posisi senyawa yang diprediksi semakin mendekati *native* (Agistia *et al.*, 2013). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa *molecular docking* ini valid untuk memprediksi penghambatan COX-2.

Energi ikat merupakan parameter kestabilan konformasi antara reseptor (COX-2) dengan ligan (senyawa). Semakin rendah energi ikat, maka semakin stabil dan kuat ikatannya (tidak mudah lepas) (Laksmiani, Paramita and Wirasuta, 2016). Semua senyawa alkaloid yang telah didocking memiliki energi ikat yang rendah yaitu berkisar dari -7,4 sampai -10,9 kkal/mol dan Sulfasalazine sebagai kontrol obat IBD memiliki energi ikat -7,1 kkal/mol. Keseluruhan senyawa memiliki energi ikat yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol obat Sulfasalazine. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa-senyawa tersebut memiliki potensi sebagai antiinflamasi. Berdasarkan energi ikatannya dapat diurutkan kemampuan sebagai senyawa antiinflamasi sebagai berikut: liriodenin $>$ noroliveroline $>$ oliveroline- β -N-oxide $>$ polylongine $>$ O-methibulbocapi-N-Oxide $>$ N-methylnanderingine- β -N-oxide.

Selain energi ikat, membandingkan dengan asam amino pengikat dari *inhibitor reference* perlu dilakukan untuk mengetahui apakah senyawa telah terikat pada sisi aktif reseptor (COX-2) (Ekowati and Diyah, 2013). *Redocking* celoxib sebagai *inhibitor reference* didapatkan asam amino yang mengikat meliputi: Ser339, Gln178, Leu338, Arg499, Met508, Ala513, Gly512, Val509, Trp373, Leu370, Try341, Val335, His75, Phe504, Ile503, dan Ala502. Berdasarkan asam amino yang berikatan dengan senyawa pada Tabel 5.3 didapatkan bahwa seluruh senyawa alkaloid dan kontrol obat berinteraksi pada sisi aktif reseptor (COX-2). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa senyawa alkaloid dari EEDPL memiliki kemampuan sebagai antiinflamsi dengan selektif penghambatan COX-2.

Berdasarkan Gambar 5.2 dan Tabel 5.3, dapat dilihat hal-hal yang mempengaruhi energi ikat. Pengaruh energi ikat diamati berdasarkan jumlah ikatan hidrogen, panjang ikatan hidrogen, jumlah residu ikatan hidrogen, jumlah residu asam amino ikatan hidrofobik dan jumlah asam amino yang sama dengan *inhibitor reference*.

Senyawa Oliveroline- β -N-oxide memiliki jumlah residu asam amino ikatan hidrofobik lebih sedikit yaitu 12 dibandingkan O-methylbulbocapnine-n-oxide yang memiliki residu asam amino ikatan hidrofobik 14. Akan tetapi, residu asam amino yang sama dengan *inhibitor reference* senyawa oliveroline- β -N-oxide lebih banyak daripada O-methylbulbocapnine-n-oxide. Sedangkan energi ikat senyawa oliveroline- β -N-oxide memiliki energi ikat lebih rendah daripada senyawa O-methylbulbocapnine-n-oxide. Oleh karena itu, dapat diketahui bahwa jumlah residu asam amino hidrofobik tidak mempengaruhi energi. Namun, energi ikatan dapat dipengaruhi oleh jumlah asam amino yang sama dengan *inhibitor reference*.

Senyawa N-methylnandingerin- β -N-oxide memiliki energi ikat yang lebih rendah daripada Sulfasalazine. Kedua senyawa memiliki jumlah ikatan hidrogen dan jumlah residu asam amino ikatan hidrogen yang sama. Namun, senyawa tersebut memiliki panjang ikatan hidrogen yang berbeda. Senyawa N-methylnandingerin- β -N-oxide memiliki panjang ikatan hidrogen yang lebih pendek daripada Sulfasalazine. Panjang ikatan hidrogen tersebut memungkinkan mempengaruhi energi ikat, karena semakin pendek ikatan, maka konformasi akan semakin stabil.

Energi ikat senyawa polylongine lebih rendah daripada N-methylnandingerine- β -N-oxide. Kemungkinan perbedaan energi ikat yang terjadi akibat jumlah ikatan hidrogen yang berbeda. Polylongine memiliki 2 ikatan hidrogen, sedangkan N-methylnandingerine- β -N-oxide hanya 1.

Senyawa polylongine dan noroliveroline memiliki jumlah ikatan hidrogen yang sama. Akan tetapi, energi ikat yang dihasilkan berbeda. Hal tersebut terjadi karena jumlah residu asam amino ikatan hidrogennya berbeda. Dimana, senyawa noroliveroline memiliki 2 residu yang mana salah satu

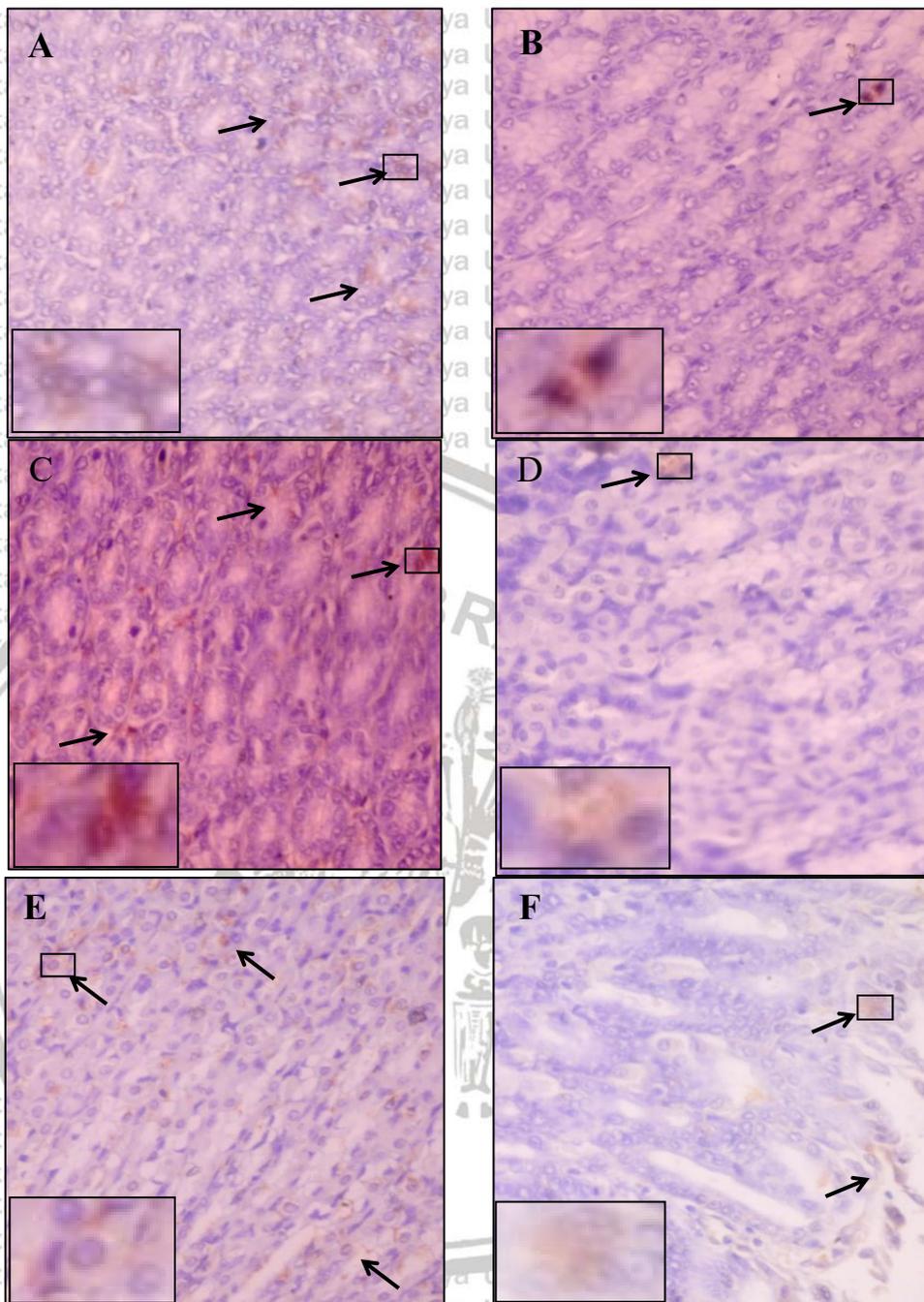
residunya yaitu Ala513 merupakan residu asam amino yang sama dengan *inhibitor reference*. Sedangkan senyawa polylongine hanya memiliki satu residu asam amino dan tidak sama dengan residu asam amino *inhibitor reference*.

Berdasarkan uraian di atas, dapat diketahui bahwa energi ikatan dipengaruhi oleh jumlah asam amino yang sama dengan *inhibitor reference*, panjang ikatan hidrogen, jumlah ikatan hidrogen, dan jumlah residu asam amino ikatan hidrogen. Semakin banyak ikatan hidrogen, maka kekuatan ikatan akan semakin besar hal tersebut ditandai dengan energi ikatan yang semakin rendah. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa jumlah ikatan hidrogen akan mempengaruhi kekuatan ikatan antara senyawa/ligan dengan sisi aktif enzim (Rollando, 2018). Semakin banyak asam amino yang sama dengan *inhibitor reference* pada ikatan hidrogen maupun ikatan hidrofobik maka energi ikatan akan semakin. Hal tersebut terjadi akibat semakin tepat posisi ligan/senyawa dengan sisi aktif.

5.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun *Polyalthia longifolia* Terhadap Ekspresi COX-2 pada Lambung Tikus IBD

Inflammatory bowel disease (IBD) merupakan suatu kondisi inflamasi kronis yang terjadi pada gastrointestinal. Penggunaan NSAIDs mampu memicu terjadinya proses inflamasi pada lambung. Saat terjadi proses inflamasi biasanya ditandai dengan adanya ekspresi COX-2 yang meningkat pesat.

Pengamatan dilakukan dengan metode *imunohistokimia* (IHK). Ekspresi COX-2 yang diberi perlakuan ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* Indonesia (EEDPLI) 300 mg/kg BB dan ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* Filipina (EEDPLF) 300 mg/kg BB yang diperoleh dibandingkan dengan Sulfasalazine 10 mg/kg BB sebagai *gold standard*.



Gambar 5.2 Gambaran Imunohistokimia *Cyclooxygenase 2* lambung hasil perlakuan pada perbesaran 400x.

Keterangan:

A : Sulfasalazine 7 hari

B : Sulfasalazine 14 hari

C : Ekstrak etanol daun *Polyalthi longifolia* Indonesia 7 hari

D : Ekstrak etanol daun *Polyalthi longifolia* Indonesia 14 hari

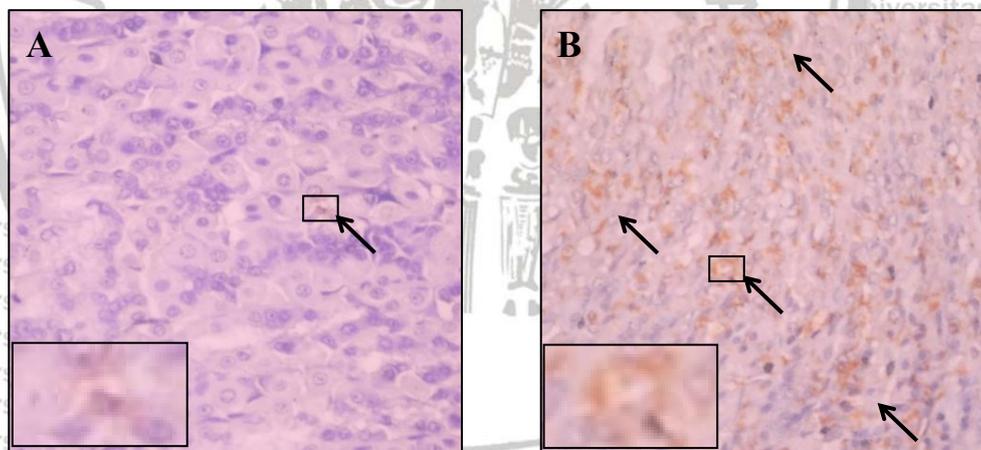
E : Ekstrak etanol daun *Polyalthi longifolia* Filipina 7 hari

F : Ekstrak etanol daun *Polyalthi longifolia* Filipina 14 hari

→ : menunjukkan ekspresi COX-2

Pemeriksaan ekspresi COX-2 pada lambung ditandai dengan terbentuknya warna coklat. Warna tersebut dihasilkan dari kromagen DAB yang terikat pada reaksi kompleks antigen dan antibodi. Reaksi antara antigen dan antibodi bersifat spesifik sehingga kenaikan ekspresi COX-2 mengindikasikan adanya perubahan patologi pada lambung. Berdasarkan hasil pemeriksaan menunjukkan adanya ekspresi COX-2 pada setiap kelompok perlakuan, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.3.

Warna coklat sebagai ekspresi COX-2 sangat banyak ditemukan pada kelompok perlakuan pemberian Indometasin saja (kontrol positif) (Gambar 5.4 B). Pemberian perlakuan dengan sulfasalazine dan EEDPL menunjukkan adanya penurunan intensitas ekspresi COX-2 dibandingkan dengan kontrol positif. Sedangkan pada kelompok perlakuan normal atau tidak diberikan Indometasin, hampir tidak ditemukan ekspresi COX-2 (Gambar 5.4 A).



Gambar 5.3 Gambaran Imunohistokimia *Cyclooxygenase-2* lambung kontrol perbesaran 400x.

Keterangan:

A : Normal

B : Positif

Analisis ekspresi COX-2 secara kuantitatif dilakukan dengan menghitung persen area ekspresi menggunakan aplikasi *Immunoratio* dengan lima lapang pandang. Berdasarkan hasil yang diperoleh dan dilanjutkan dengan uji statistik *One Way Anova* (Tabel 5.4) dan dilanjutkan *Tukey test* dengan

kepercayaan 99% menunjukkan adanya pengaruh perlakuan terhadap ekspresi COX-2 pada lambung ($F_{\text{Hitung}} > F_{1\%}$). Hasil *Tukey test* menunjukkan adanya perbedaan antar perlakuan yang ditunjukkan dengan perbedaan notasi, yang disajikan pada Tabel 5.5.

Tabel 5.4 Hasil uji *One Way Anova* ekspresi COX-2 pada lambung

S.V.	D f	Sum of Squares (SS)	Mean Square (MS)	F_{Hitung}	F5%	F1%
Treatment	5	3,533	0,707	183,530	2,77	4,25
Error	18	0,069	0,004			
Total	23	3,602				

Keterangan:

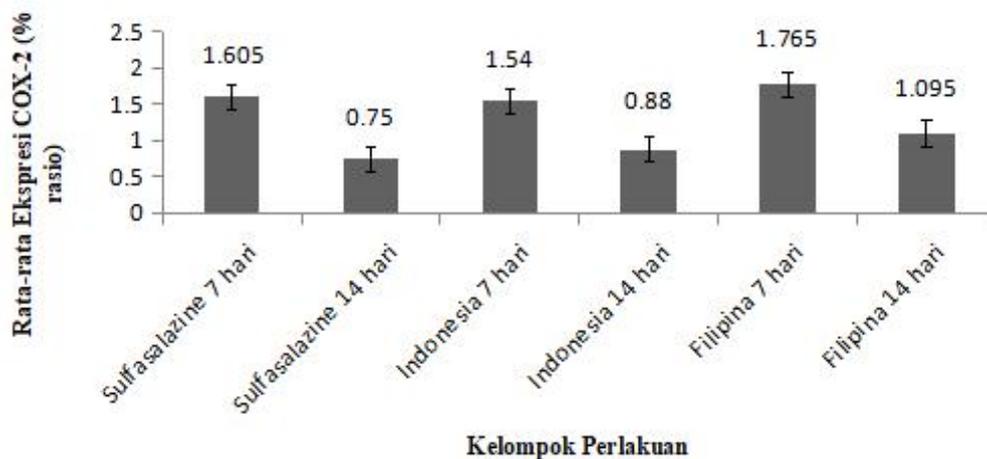
F5% : $F_{\text{tabel}} 5\%$

F1 : $F_{\text{tabel}} 1\%$

Tabel 5.5 Presentase jumlah ekspresi COX-2 pada lambung

Kelompok	Rata-Rata ekspresi COX-2 (%)
Sulfasalazine 7 hari	1.605 ^a ± 0,3416
Sulfasalazine 14 hari	0.75 ^b ± 0,02582
Indonesia 7 hari	1,54 ^{a,d} ± 0,08165
Indonesia 14 hari	0,88 ^b ± 0,07303
Filipina 7 hari	1,765 ^d ± 0,05262
Filipina 14 hari	1,095 ^c ± 0,8062

Keterangan: Notasi a,b,c dan d menunjukkan adanya pengaruh yang berbeda signifikan antar kelompok perlakuan (signifikansi < 0,01). Sedangkan notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan.



Gambar 5.5 Grafik ekspresi COX-2 pada lambung tikus IBD yang telah diterapi

Cyclooxygenase 2 sebagai sitokin proinflamasi dapat memperparah inflamasi yang kemudian menyebabkan kerusakan pada lambung. Pemberian perlakuan dengan Sulfasalazine dan EEDPL mampu menurunkan ekspresi COX-2 kontrol positif yang mencapai 3,32% (Lampiran 5.3). Pemberian perlakuan dengan Sulfasalazine dan EEDPL memengaruhi ekspresi COX-2 pada lambung tikus IBD hasil induksi Indometasin. Berdasarkan rerata ekspresi COX-2 (Tabel 5.5 Dan Gambar 5.5), dapat diurutkan kelompok perlakuan terbaik yaitu Sulfasalazine selama 14 hari > EEDPLI selama 14 hari > EEDPLF selama 14 hari > EEDPLI selama 7 hari > Sulfasalazine selama 7 hari > EEDPLF selama 7 hari.

Tabel 5.5 memperlihatkan jumlah presentase ekspresi COX-2 yang telah diberikan terapi. Setiap kelompok perlakuan selama 7 hari dan 14 hari menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,01$), di mana presentase ekspresi COX-2 selama 14 hari lebih kecil dibandingkan selama 7 hari. Perlakuan dengan sulfasalazine dan EEDPLI tidak memiliki menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($p > 0,01$) baik selama 7 hari maupun 14 hari. Perlakuan dengan EEDPLF selama 7 hari tidak berbeda nyata dengan EEDPLI selama 7 hari. Akan tetapi, perlakuan perlakuan EEDPLF dengan EEDPLI menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,01$), di mana ekspresi EEDPLI lebih kecil daripada EEDPLF. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian Sulfasalazine sama dengan EEDPLI dan EEDPLI lebih baik dibandingkan dengan EEDPLF dalam menurunkan ekspresi COX-2. Tidak hanya itu, rerata ekspresi COX-2 hasil perlakuan Sulfasalazine dan EEDPLI selama 14 hari sebesar 0,75% dan 0,88% mendekati rerata ekspresi COX-2 kontrol normal yaitu 0,625% (Lampiran 5.3). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penghambatan atau penurunan ekspresi COX-2 memberikan efek anti-IBD (Saxena *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2019).

Pemberian perlakuan dengan Sulfasalazine dan EEDPL mampu menurunkan ekspresi COX-2 dibandingkan saat kondisi IBD. Penurunan ekspresi COX-2 dengan perlakuan obat dan EEDPL diyakini karena keduanya memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi dengan cara penghambatan enzim COX-2. Sulfasalazine dan EEDPL memiliki kemampuan untuk menghambat enzim

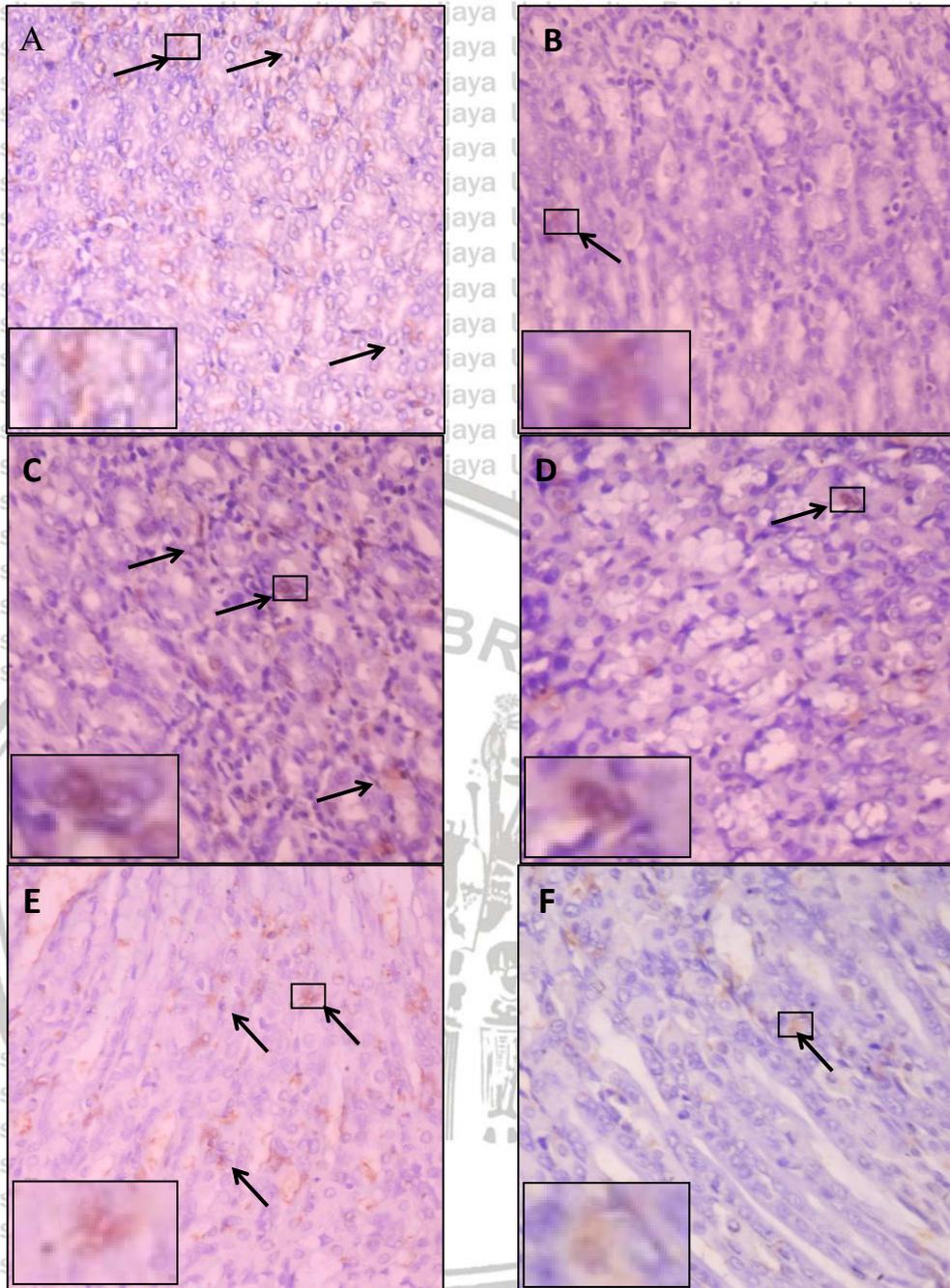
COX-2 secara *molecular docking*. Senyawa aktif dari EEDPL yang memiliki aktifitas penghambatan COX-2 meliputi polylongine, liriodenine, noroliveroline, oliveroline- β -N-oxide, N-methylnandingerine- β -N-oxide, dan O-methylbulbocapni-N-Oxide.

Efektivitas EEDPLI lebih baik daripada EEDPLF dimungkinkan karena kadar EEDPLI lebih besar EEDPLF. Selain itu, pada EEDPLI mengandung O-Methylbulbocopni-N-Oxide sedangkan EEDPLF mengandung N-mehylnandingerine-N- β -Oxide. O-Methylbulbocopni-N-Oxide secara *molecular docking* memiliki kemampuan hambatan COX-2 lebih besar daripada N-mehylnandingerine-N- β -Oxide.

5.4 Pengaruh Ekstrak Etanol Daun *Polyalthia longifolia* terhadap Ekspresi PGE₂ pada Lambung Tikus IBD

Prostaglandin E₂ (PGE₂) merupakan mediator utama pada IBD. PGE₂ memiliki efek ganda yaitu PGE₂ diperlukan untuk melindungi dari kerusakan mukosa namun, ketika PGE₂ tinggi akan memperburuk proses inflamasi (Wang and DuBois, 2011). Metode *imunohistokimia* (IHK) dilakukan untuk mengamati pengaruh pemberian EEDPL 300 mg/kg BB terhadap ekspresi PGE₂ pada tikus IBD hasil induksi indometasin. Ekspresi PGE₂ EEDPL kemudian dibandingkan dengan Sulfasalazine 10 mg/kg BB sebagai *gold standard*.

Warna coklat menunjukkan adanya ekspresi PGE₂ pada lambung. Berdasarkan hasil pemeriksaan di bawah mikroskop dapat dilihat gambaran ekspresi PGE₂ pada setiap kelompok perlakuan seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.6.



Gambar 5.5 Gambaran Imunohistokimia Prostaglandin E₂ (PGE₂) lambung hasil perlakuan pada perbesaran 400x.

Keterangan:

A : Sulfasalazine 7 hari

B : Sulfasalazine 14 hari

C : Ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* Indonesia 7 hari

D : Ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* Indonesia 14 hari

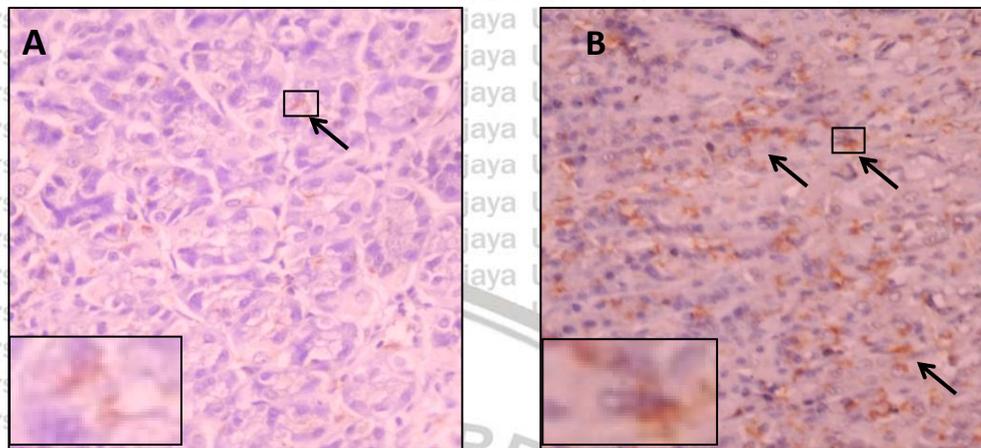
E : Ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* Filipina 7 hari

F : Ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* Filipina 14 hari

→ : Menunjukkan ekspresi COX-2

Gambaran ekspresi PGE₂ di bawah mikroskop hasil perlakuan sulfasalazine, EEDPLI dan EEDPLF diperlihatkan pada Gambar 5.6. Warna

coklat menunjukkan adanya ekspresi PGE₂ pada lambung. Hasil pengamatan menunjukkan penurunan ekspresi dibandingkan kontrol negatif (Gambar 5.7 B).



Gambar 5.6 Gambaran Imunohistokimia Prostaglandin E₂ lambung kontrol pada perbesaran 400x.

Keterangan:

A: Normal

B: Positif.

Analisis ekspresi PGE₂ secara kuantitatif dilakukan dengan menghitung persen area ekspresi menggunakan aplikasi *Immunoratio* dengan lima lapang pandang. Hasil yang diperoleh dan dianalisis uji statistik *One Way Anova* (Tabel 5.6) dengan kepercayaan 99% menunjukkan adanya pengaruh perlakuan terhadap ekspresi PGE₂ pada lambung ($F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$). Hasil dengan *Tukey test* menunjukkan adanya perbedaan antar perlakuan yang ditunjukkan dengan perbedaan notasi, yang disajikan pada Tabel 5.7.

Tabel 5.6 Hasil uji *One Way Anova* ekspresi PGE₂ pada lambung

S.V.	D	Sum of Squares	Mean Square	F _{Hitung}	F5%	F1%
	f	(SS)	(MS)			
Treatment	5	4,540	0,908	612,092	2,77	4,25
Error	18	0,027	0,001			
Total	23	4,566				

Keterangan:

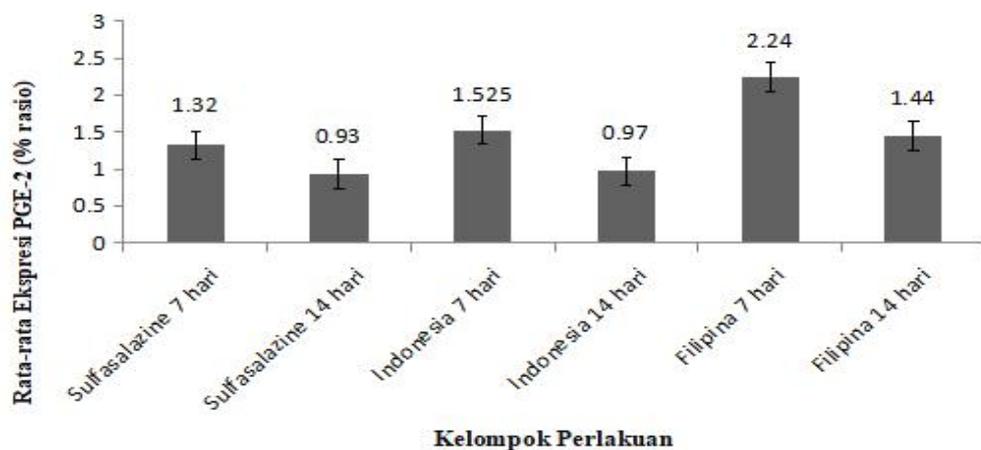
F5% :F_{tabel} 5%

F1 :F_{tabel} 1%

Tabel.5.7 Presentase jumlah ekspresi PGE₂ pada lambung tikus

Kelompok	Rata-Rata ekspresi PGE ₂ (%)
Sulfasalazine 7 hari	1,32 ^a ± 0,0432
Sulfasalazine 14 hari	0,93 ^b ± 0,02582
Indonesia 7 hari	1,525 ^c ± 0,050
Indonesia 14 hari	0,97 ^b ± 0,04163
Filipina 7 hari	2,24 ^d ± 0.03651
Filipina 14 hari	1,40 ^c ± 0,02828

Keterangan: Notasi a,b,c dan d menunjukkan adanya pengaruh yang berbeda signifikan antar kelompok perlakuan (signifikansi < 0,01). Sedangkan notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan.

**Gambar 5.8** Grafik ekspresi PGE₂ pada lambung tikus IBD yang diterapi

Prostaglandin E₂ pada lambung dalam kondisi normal akan ada untuk memelihara dan menjaga mukosa dari kerusakan yang diakibatkan oleh faktor agresif eksogen maupun endogen. Rerata ekspresi PGE₂ dalam kondisi normal sebesar 0,9% (Lampiran 6.3). Pemberian Indometasin 15 mg/kg BB tanpa terapi (kontrol positif) menyebabkan peningkatan ekspresi PGE₂ hingga mencapai 3,36% (Lampiran 6.3). Tingginya PGE₂ akan memperparah inflamasi dan menyebabkan kerusakan jaringan lambung. Berdasarkan grafik pada Gambar 5.8 menunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan menunjukkan penurunan ekspresi PGE₂ dibandingkan kontrol positif.

Berdasarkan Tabel 5.6, diketahui bahwa seluruh pemberian perlakuan selama 7 hari dan 14 hari menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,01$) terhadap ekspresi PGE₂. Pemberian EEDPLI selama 14 hari menunjukkan pengaruh

yang sangat baik. Hal tersebut diperlihatkan dengan tidak adanya perbedaan nyata dengan perlakuan sulfasalazine selama 14 hari ($p < 0,01$). Tidak ada perbedaan nyata antara pemberian EEDPLF selama 14 hari dengan pemberian EEDPLI selama 7 hari menunjukkan bahwa EEDPLI lebih baik dalam menurunkan ekspresi PGE₂ tikus IBD. Selain itu, ekspresi PGE₂ dengan pemberian EEDPLI dan sulfasalazine sebesar 0,97% dan 0,93% yang mana mendekati ekspresi normal PGE₂ tikus yaitu 0,9%.

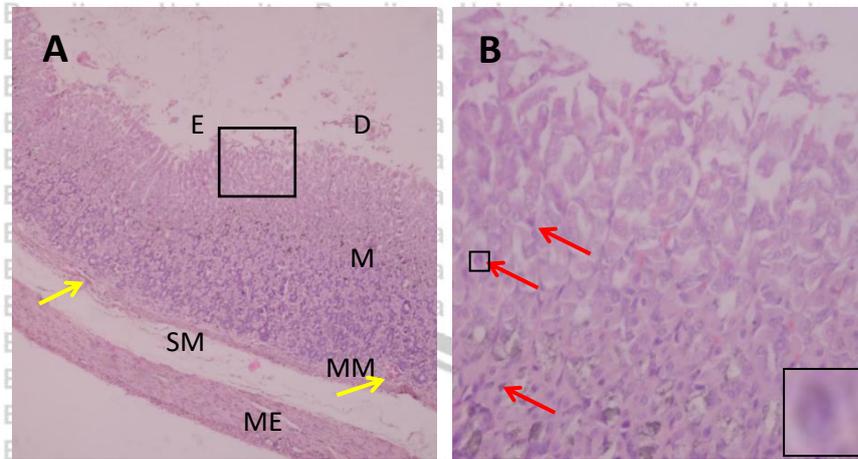
Prostaglandin E₂ (PGE₂) adalah mediator lipid proinflamasi yang diproduksi secara berlebihan pada penyakit radang usus (IBD). Tingginya PGE₂ akan memperparah inflamasi. Pada penelitian ini overekspresi PGE₂ mencapai 3,36% (Lampiran 6.3). PGE₂ yang diproduksi selama inflamasi mukosa mencegah penyerapan elektrolit seperti natrium dan klorida, menginduksi hiperpermeabilitas pembuluh darah, dan meningkatkan pergerakan usus, menyebabkan diare dan kotoran berdarah (Arai *et al.*, 2016).

Penurunan ekspresi PGE₂ mengendalikan inflamasi yang terjadi. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa penurunan PGE₂ memberikan pengaruh sebagai anti-IBD. Selain itu, penurunan PGE₂ juga mencegah agar inflamasi tidak berkembang menjadi kanker. Penurunan terjadi karena kemampuan selektifitas penghambatan COX-2 terhadap PGE₂ yang bersifat proinflamasi.

5.5 Pengaruh Ekstrak Etanol Daun *Polyalthia longifolia* Terhadap Perbaikan Histopatologi Lambung Tikus IBD

Gambaran histopatologi lambung merupakan salah satu parameter untuk mengetahui keberhasilan terapi. Pengamatan histopatologi dengan mikroskop bertujuan untuk melihat pengaruh pemberian EEDPL terhadap perbaikan jaringan lambung yang dibandingkan dengan pemberian sulfasalazine. Gambaran histologi lambung IBD menggunakan metode pewarnaan Hemaktosilin-Eosin (HE). Perubahan yang diamati meliputi deskamuasi epitel, erosi, kongesti dan infiltrasi sel radang sebagai penanda terjadinya inflamasi.

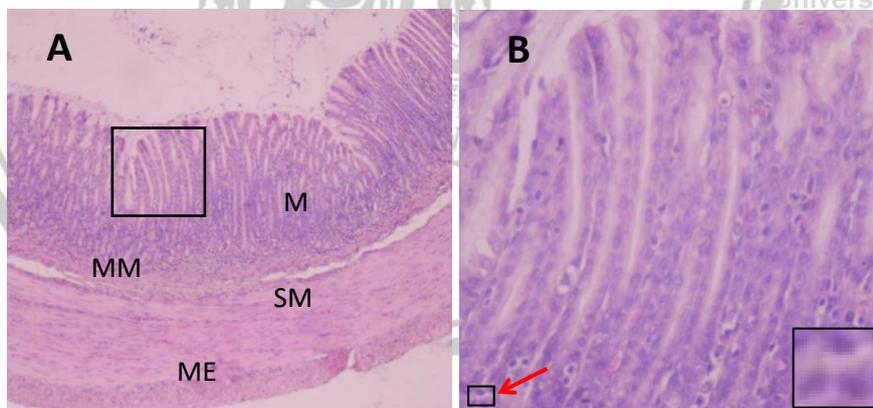
Gambaran histopatologi lambung pada tiap perlakuan ditampilkan pada Gambar 5.9 sampai Gambar 5.14.



Gambar 5.9 Histopatologi lambung tikus IBD dengan pemberian sulfasalazine selama 7 hari.

Keterangan:

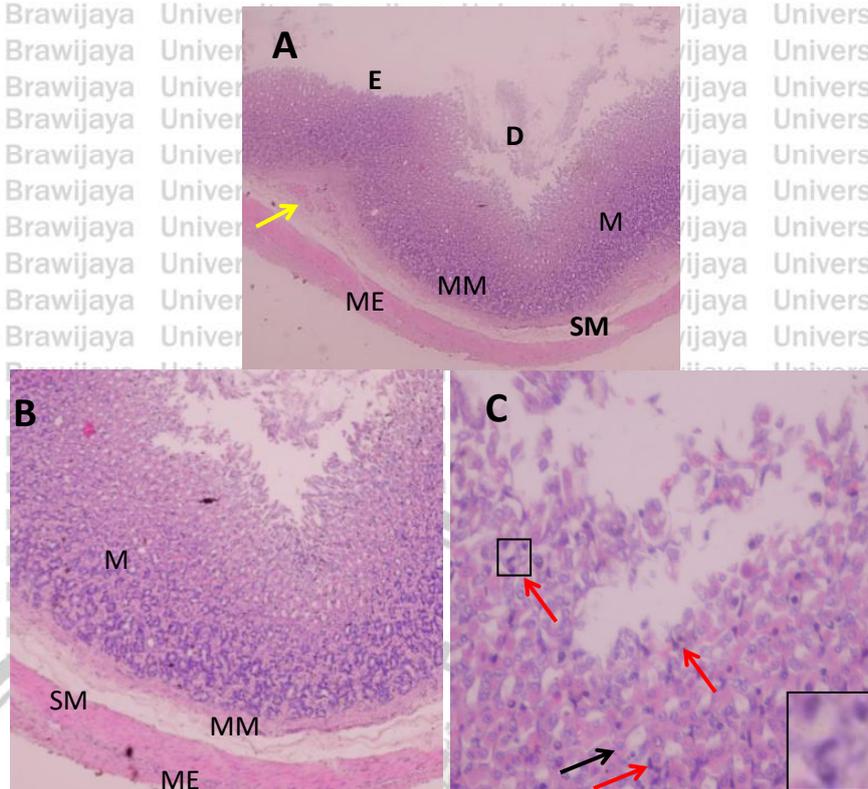
M : Mukosa	ME :Muskularis eksternal	→ : Kongesti
MM : Muskularis mukosa	D : Deskvamasi epitel	→ : Infiltrasi sel radang
SM : Submukosa	E : Erosi	
A :Pewarnaan HE, perbesaran 100x	B :Pewarnaan HE, Perbesaran 400x	



Gambar 5.10 Histopatologi lambung tikus IBD dengan pemberian sulfasalazine selama 14 hari.

Keterangan:

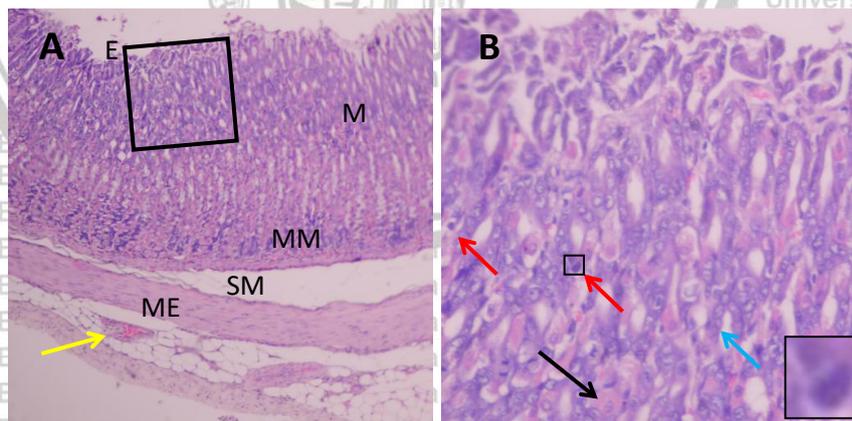
M : Mukosa	SM : Submukosa	→ : Infiltrasi sel radang
MM : Muskularis mukosa	ME :Muskularis eksternal	
A :Pewarnaan HE, perbesaran 100x	B :Pewarnaan HE, Perbesaran 400x	



Gambar 5.13 Histopatologi lambung tikus IBD dengan pemberian EEDPLF selama 7 hari.

Keterangan:

M : Mukosa	ME :Muskularis eksternal	→ : Kongesti
MM :Muskularis mukosa	D : Deskumasi epitel	→ : Infiltrasi sel radang
SM : Submukosa	E : Erosi	→ : Sel Parietal
A :Pewarnaan HE, perbesaran 40x	C : Pewarnaan HE, Perbesaran 400	
B :Pewarnaan HE, Perbesaran 100x		



Gambar 5.14 Histopatologi lambung tikus IBD dengan pemberian EEDPLF selama 14 hari.

Keterangan:

M : Mukosa	ME :Muskularis eksternal	→ : Infiltrasi sel radang
MM :Muskularis mukosa	E : Erosi	→ : Sel Parietal
SM : Submukosa	→ : Kongesti	→ : Sel Chief
A : Pewarnaan HE, perbesaran 100x	B : Pewarnaan HE, Perbesaran 400	

Gambaran histopatologi lambung yang diberi perlakuan Sulfasalazine selama 7 hari menunjukkan masih adanya deskuamasi, erosi, kongesti dan banyak infiltrasi sel radang (Gambar 5.9). Namun, perlakuan selama 14 hari menunjukkan respon patologi yang jauh lebih baik. Epitel mukosa lambung dalam keadaan utuh dan teratur, tidak ditemukannya erosi namun masih ada sel radang (Gambar 5.10).

Perlakuan dengan EEDPLI selama 7 hari masih menunjukkan adanya erosi dan ditemukannya banyak infiltrasi sel radang (Gambar 5.11). Histopatologi EEDPLI selama 14 (Gambar 5.12), memperlihatkan keteraturan epitel mukosa yang sangat baik dan penurunan infiltrasi sel radang yang cukup besar. Akan tetapi, masih ditemukannya deskuamasi epitel pada histopatologi tersebut.

Gambaran histologi EEDPLF selama 7 hari juga masih menunjukkan adanya deskuamasi epitel, erosi, kongesti dan banyaknya infiltrasi sel radang (Gambar 5.13). Pemberian EEDPLF selama 14 hari (Gambar 5.14) juga tidak menunjukkan banyak perubahan. Secara histologi, masih ditemukannya kongesti, erosi dan infiltrasi sel radang walaupun tingkat erosi dan infiltrasi sel radangnya berkurang. Pemberian perlakuan selama 14 hari memberikan perubahan patologi menjadi semakin mendekati histologi lambung normal. Gambaran histologi lambung normal (Gambar 5.15) menampilkan keteraturan dan keutuhan sel, tidak ditemukannya kongesti, erosi dan sel radang. Berbeda dengan gambaran histopatologi lambung IBD, ditemukannya deskuamasi epitel, erosi mukosa, dan infiltrasi sel radang (Gambar 5.16).

Deskuamasi epitel merupakan kondisi lepasnya sel epitel dari permukaan jaringan. Induksi Indometasin menyebabkan deskuamasi epitel karena menurunnya pertahanan mukosa sehingga terjadi pengikisan mukosa. Pemberian sulfasalazin dan EEDPLI mengurangi deskuamasi epitel (Gambar 5.9 dan Gambar 5.13). Deskuamasi epitel dapat terjadi pada kondisi normal karena adanya pergantian sel-sel epitel akibat regenerasi (Windari *et al.*, 2017). Deskuamasi epitel yang terjadi pada Gambar 5.12 dimungkinkan terjadi bukan karena efek indometasin lagi, namun karena terjadinya regenerasi sel epitel.

dalam mikrosirkular lokal. Pembuluh darah yang sebelumnya kosong atau yang sebelumnya meregang akan terisi penuh oleh darah (Gambar 5.9, 5.13 dan 5.14).

Di dalam lambung, sel parietal dan chief saling bekerjasama untuk mencerna zat-zat makanan. Sel chief akan mensikresikan enzim-enzim untuk mencerna lemak dan protein seperti lipase dan pepsin. Enzim-enzim tersebut berkerja dalam kondisi asam yang diatur oleh sel parietal. Erosi mukosa akan menghilangkan sel chief dan parietal pada daerah tersebut. Hal itu menyebabkan terjadinya penurunan kemampuan lambung dalam memproses makanan.

Erosi terjadi karena penurunan pertahanan mukosa lambung yang diakibatkan oleh penurunan PGE₂ yang dihasilkan oleh COX-1. Penurunan pertahanan mukosa menyebabkan ketidakseimbangan antar faktor agresif dan defensif. Ketidakseimbangan tersebut mengakibatkan hancurnya epitel lambung. Difusi balik ion hidrogen (asam) secara terus menerus akan menghancurkan mukosa lambung dan meningkatkan reaksi inflamasi. Erosi pada kontrol positif (Gambar 5.16) terlihat sangat lebar dan dalam. Kedalaman erosi hampir mencapai submukosa. Pemberian EEDPL mengurangi lebar dan kedalaman erosi.

Mukosa yang mengalami erosi ditemukannya sel radang. Infiltrasi sel radang adalah indikator terjadinya inflamasi mukosa pada lambung karena sel radang merupakan mediator inflamasi yang mampu menarik datangnya neutrofil ke arah perusak mukosa. Kerusakan yang diakibatkan Indometasin dapat mengaktifkan NF- κ B. NF- κ B yang aktif menyebabkan terjadinya metabolisme prostaglandin dari asam arakhidonat yang dibantu COX-2. Peningkatan PGE₂ akan meningkatkan infiltrasi sel radang (Prasetya, Haniastuti and Purwanti, 2013). Sel radang ditemukan sangat banyak pada tikus IBD tanpa perlakuan (Gambar 5.16). Pemberian EEDPL dan Sulfasalazine mengurangi kedalaman erosi dan jumlah sel radang.

Pemberian obat sulfasalazine sebagai *gold standard* akan memelihara remisi IBD (PERKENI, 2011). Sedangkan pemberian EEDPL memiliki kemampuan sebagai antiinflamasi (Sharma *et al.*, 2016) akan mengurangi

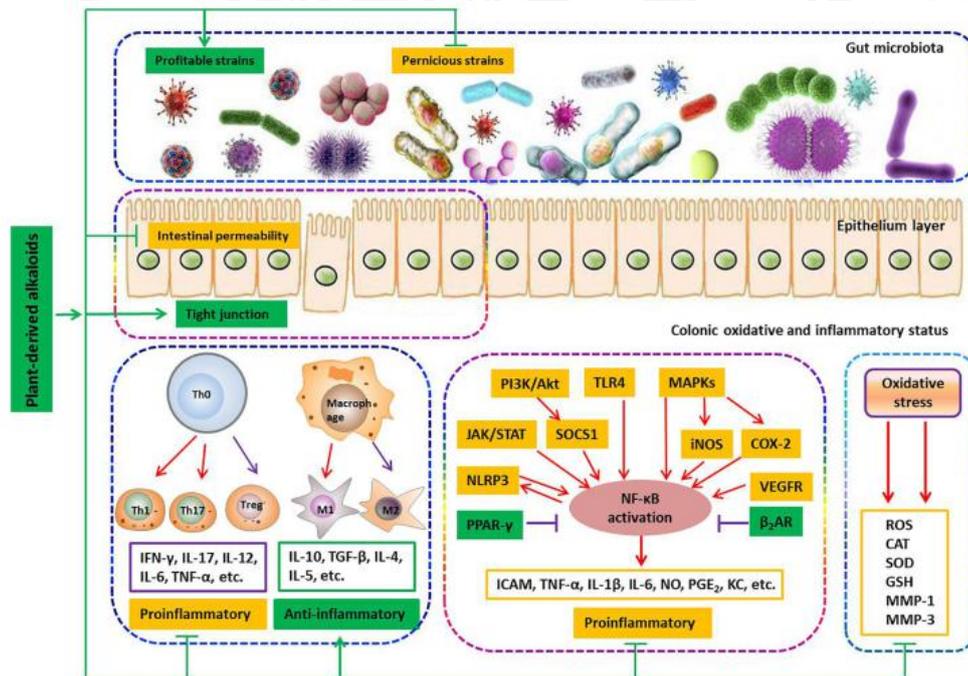
gejala inflamasi dengan menghambat produksi PGE₂. Berdasarkan hasil *molekular docking* yang telah dilakukan, senyawa yang memiliki kemampuan sebagai antiinflamasi meliputi: polylongine, liriodenine, noroliveroline, oliveroline-β-N-oxide, N-methylnandingerinβ-N-oxide dan O-methylbulbocapni-N-oxide. Selain itu, EEDPL juga memiliki aktivitas antioksidan (Sashidhara *et al.*, 2011; Sampath, 2013; Sampath and Vasanthi, 2013), salah satu senyawa dari EEDPL yang memiliki kemampuan antioksidan adalah liriodenine (Obaid *et al.*, 2018). Aktivitas antiinflamasi dan antioksidan tersebut mampu menurunkan peradangan dan memperbaiki kerusakan jaringan sebagaimana dilihat pada gambaran histopatologi.

5.6 Hubungan Ekstrak Etanol Daun *Polyalthia longifolia* dari Indonesia dan Filipina Terhadap Ekspresi COX-2, PGE₂ dan Gambaran Histopatologi Lambung Sebagai *Anti Inflammatory Bowel Disease*

Kondisi IBD, akan meningkatkan berbagai mediator proinflamasi seperti COX-2 dan Prostaglandin E₂ sebagai marker IBD. Kenaikan COX-2 dan PGE₂ akan meningkatkan kerusakan mukosa lambung sebagai salah satu organ pencernaan. Berdasarkan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa EEDPL dari Indonesia dan Filipina mampu menurunkan ekspresi COX-2, PGE₂ dan memperlihatkan perbaikan mukosa lambung dilihat dari gambaran histopatologinya. Kemampuan EEDPL untuk IBD diduga dipengaruhi oleh adanya senyawa aktif alkaloid yang mampu menghambat ekspresi COX-2 berdasarkan hasil *molekular docking* yang telah dilakukan. Penghambatan COX-2 akan menurunkan kadar PGE₂ yang bersifat proinflamasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi penurunan ekspresi PGE₂. Efek penghambatan COX-2 dan penurunan PGE₂ dapat dilihat dengan mengamati perbaikan gambaran histopatologi lambungnya.

Selain senyawa alkaloid, kedua EEDPL mengandung golongan senyawa terpenoid, flavonoid, tanin dan saponin. Oleh karena itu, kemampuan EEDPL sebagai *anti inflammatory bowel disease* ini berhubungan dengan berbagai senyawa aktif yang ada di dalam kedua ekstrak.

Alkaloid sebagai kandungan senyawa utama tanaman ini telah teridentifikasi berbagai senyawa meliputi: polylongine, liriodenine, noroliveroline dan oliveroline β -N-oxide pada kedua ekstrak. N-methylnandingerine β -N-oxide pada ekstrak Filipina dan O-methylnandingerine N-oxide ada ekstrak Indonesia. Selain alkaloid, telah diidentifikasi senyawa golongan flavonoid yang ada. Senyawa-senyawa tersebut ialah quarcetin, leucocyanidi-(+)-2,3,3,4-cis-3,4,5,7,3',4'-hexahydroxyl flavan, quarcetin-3-O-glucoside, vicenin-2, rutin dan quarcetin-O-O-galloyl hexoside. Penelitian sebelumnya telah mengidentifikasi senyawa golongan terpenoid pada EEDPL yang meliputi 16 α -hydroxycleroda-3,13(14) Z-dien-15,16-olide dan 16-oxocleroda-3,13(14)E-dien-15-oic acid (Dixit *et al.*, 2014). Senyawa tanin dan saponin sejauh ini belum teridentifikasi senyawa spesifiknya. Namun, diperkirakan memiliki kemampuan yang sinergis dengan senyawa lainnya.



Gambar 5.17 Mekanisme senyawa turunan alkaloid pada pengobatan IBD (Peng *et al.*, 2019)

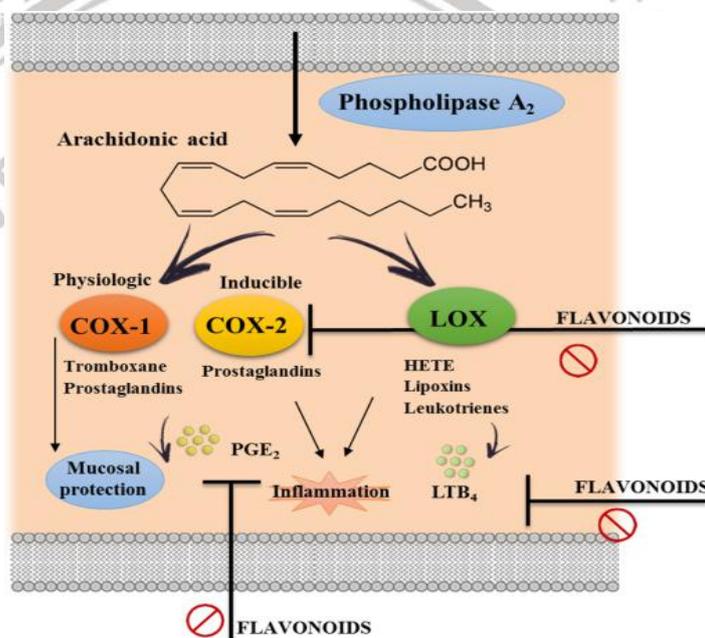
Keterangan:

↑ : Peningkatan

↓ : Penghambatan

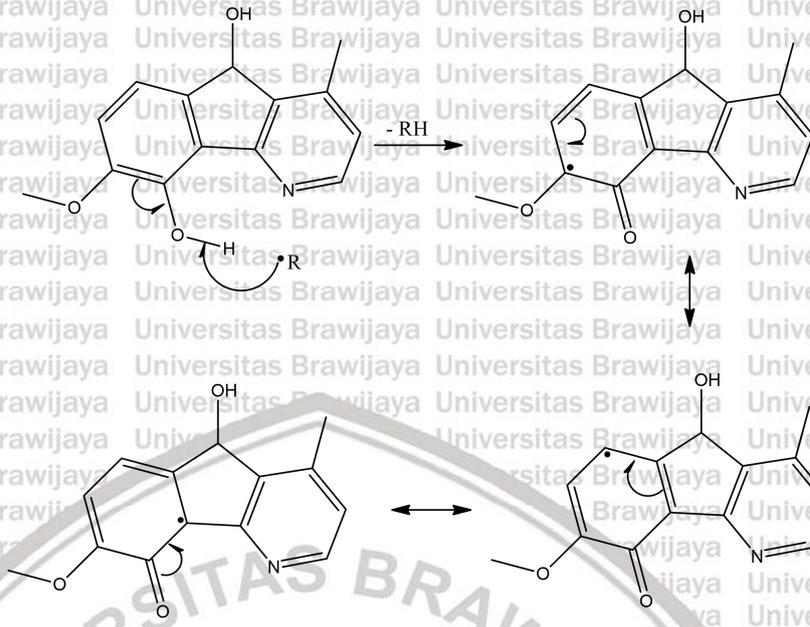
Sebagian besar penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa berbagai senyawa aktif golongan alkaloid dan flavonoid memiliki kemampuan sebagai

obat IBD. Mekanisme pengobatan terjadi dengan menghambat produksi proinflamasi, meningkatkan produksi antiinflamasi dan menghambat pembentukan stress oksidatif. Mekanisme pengobatan alkaloid untuk IBD digambarkan pada Gambar 5.16. Sedangkan golongan senyawa flavonoid memiliki mekanisme dengan menghambat aktivitas COX-2 dan menghambat *release* PGE₂. Gambaran mekanismenya dapat dilihat pada Gambar 5.18. flavonoid memiliki kemampuan untuk menurunkan produksi mediator proinflamasi, meningkatkan barrier epitel, menurunkan pembentukan reaktif nitrogen spesies dan menghambat jalur MAPK dan STAT.



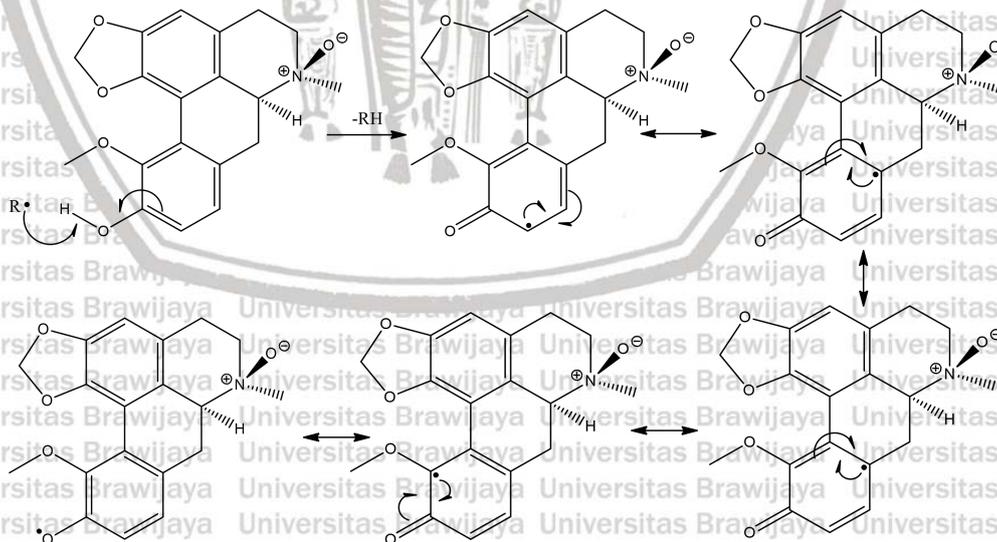
Gambar 5.18 Mekanisme penghambatan Inflamasi melalui jalur sintesis Eicosanoid (VeZZa *et al.*, 2016).

Senyawa aktif dalam EEDPL memiliki kemampuan untuk menurunkan stress oksidatif. Senyawa-senyawa tersebut diantaranya polylongine dan N-methylnandingerine- β -N-oxide dari golongan senyawa alkaloid. Querceti beserta turunannya pada golongan senyawa flavonoid. Senyawa 16-oxo-cleroda-3,13(14)E-dien-15-oic acid dari golongan terpenoid (Chang *et al.*, 2008). Reaksi senyawa polylongine sebagai antioksidan dengan meredam radikal bebas diperlihatkan pada Gambar 5.19.



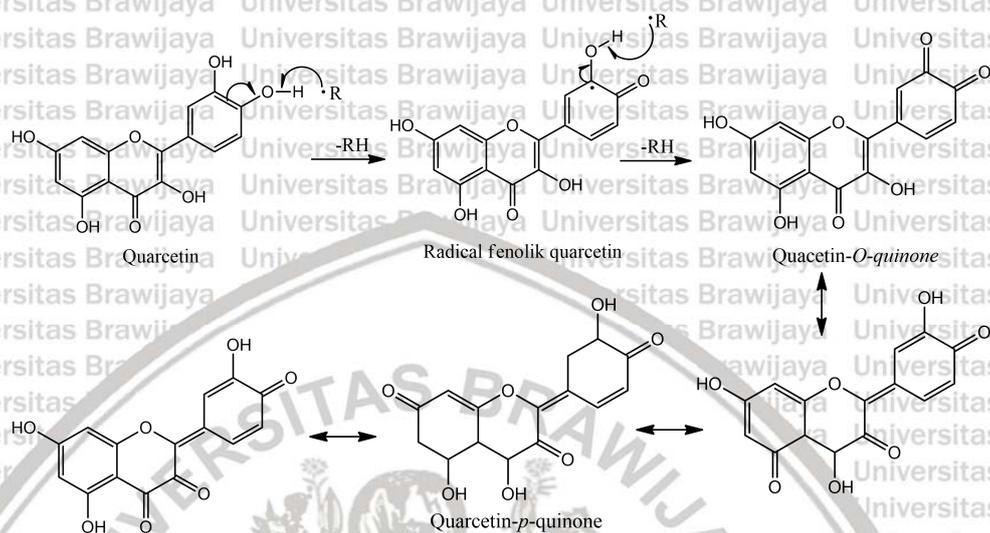
Gambar 5.19 Mekanisme penangkapan radikal bebas senyawa polylongine

Reaksi peredaman radikal bebas oleh senyawa N-methylnandingerine- β -N-oxide digambarkan pada Gambar 5.20.



Gambar 5.20 Mekanisme penangkapan radiakal bebas N-methylnandingerine- β -N-oxide

Golongan senyawa flavonoid dalam EEDPL teridentifikasi beberapa senyawa yang memiliki struktur utama quarcetin. Reaksi quarcetin dengan radikal bebas digambarkan pada Gambar 5.21.



Gambar 5.21 Mekanisme penangkapan radikal bebas senyawa quarcetin beserta bentuk tautomernya

Senyawa-senyawa di atas dikatakan senyawa antioksidan karena mampu mendonorkan proton terhadap radikal bebas dan membentuk senyawa yang stabil atau senyawa radikal yang kurang reaktif. Kestabilan senyawa terjadi akibat karena terjadi resonansi atau perpindahan radikal dalam siklik.

BAB VI PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang telah diperoleh, dapat disimpulkan bahwa :

1. Identifikasi senyawa aktif dengan LC-MS menunjukkan bahwa Ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* Indonesia mengandung senyawa polylongine, liriodenine, noroliveroline, oliveroline- β -N-oxide dan O-methylbulbocapnine-N-oxide. Sedangkan Ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* Filipina mengandung senyawa polylongine, liriodenine, noroliveroline, oliveroline- β -N-oxide dan N-methylnandingerine- β -N-oxide. Hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa polylongine, liriodenine, noroliveroline, oliveroline- β -N-oxide, N-methylnandingerine- β -N-oxide dan O-methylbulbocapnine-N-oxide berpotensi sebagai antiinflamasi.
2. Ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* Indonesia memiliki kemampuan untuk menurunkan ekspresi *Cylooxygenase 2* lebih baik daripada ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia*. Kemampuan menurunkan ekspresi *Cylooxygenase 2* ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* sebanding dengan Sulfasalazine.
3. Ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* Indonesia memiliki kemampuan untuk menurunkan ekspresi prostaglandin E₂ lebih baik daripada ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* Filipina. Kemampuan menurunkan ekspresi prostaglandin E₂ ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* sebanding dengan Sulfasalazine pada perlakuan selama 14 hari.
4. Ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina mampu memperbaiki gambaran histopatologi lambung tikus IBD.

6.2 Saran

Perlu dilakukan analisis LC-MS dengan menggunakan standar untuk mengetahui kadar pasti dari tiap senyawa aktif dalam ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia*. Selain itu, perlu dilakukan uji penggunaan ekstrak etanol daun *Polyalthia longifolia* dalam jangkau yang lebih lama dibandingkan dengan penggunaan obat *gold standard*.



DAFTAR PUSTAKA

Agistia, Dany Dwi, Hari Purnomo, Maulana Tegar, and Agung Endro Nugroho. 2013. 'Interaction Between Active Compounds From Aegle Marmelos Correa as Anti Inflammation Agent With COX-1 and COX-2 Receptor'. *Traditional Medicine Journal* 18(2):80–87.

Amrulloh, Fathan Muhi and Nurul Utami. 2016. 'Hubungan Konsumsi OAINS Terhadap Gastritis The Relation of NSAID Consumption to Gastritis'. *Majority* 5:18–21.

Aparecida, Bruna, Souza Machado, Rejane Pina, Dantas Silva, and Gabriele De. 2016. 'Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown , Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil'. *PLoS ONE* 1–26.

Arai, Yoshinori, Tomokazu Matsuura, Masaaki Matsuura, Mutsunori Fujiwara, Isao Okayasu, Satoru Ito, and Seiji Arihiro. 2016. 'Prostaglandin E-Major Urinary Metabolite as a Biomarker for Inflammation in Ulcerative Colitis : Prostaglandins Revisited'. *Digestion* 8461:32–39.

Ari, Fransiscus and Dadang Makmun. 2014a. 'Current Prevention And Management of Non-Steroid Anti Inflammatory Drugs Associated Gastroenteropathy'. *The Indonesia Journal of Gastroenterology , Hepatology and Digestive Endoscopy* 15(3):161–69.

Ari, Fransiscus and Dadang Makmun. 2014b. 'Current Prevention and Management of Non-Steroid Anti Inflammatory Drug Associated Gastroenteropathy'. *The Indonesian Journal of Gastroenterology, Hepatology and Digestive Endoscopy* 15(3):161–69.

Aryani, Dhita Evi, Agri Kaltaria Anisa, and Wawid Purwatiningsih. 2018. 'Profile Histopathology Analysis of Gastric , Duodenum , Ileum , and Colon of Inflammatory Bowel Disease (IBD) Rat Model'. Pp. 113–17 in *Advances in Health Sciences Research (AHSR)*. Vol. 5.

Aulanni'am, Anna Rosdiana, and Nur Lailatul Rahmah. 2011. 'Potency of Brown Seaweed (Sargassum Duplicatum Bory) Ethanol And Ethyl Acetic Fraction To Malondialdehyde Concentration Decreasing And Histomogical Retrival Of IBD (Inflamatory Bowel Disease) Rat Small Intestinal Jejunum'. *Jurnal Ilmiah Kedokteran* 4(1):57–64.

Bjarnason, Ingvar, Carmelo Scarpignato, Erik Holmgren, Michael Olszewski, Kim D. Rainsford, and Angel Lanas. 2018. 'REVIEWS IN BASIC AND CLINICAL GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY: Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs'. *Gastroenterology* 154:500–514.

Chanda, Sumitra, Yogesh Baravalia, and Mital Kaneria. 2011. 'Protective

Effect of Polyalthia Longifolia Var. Pendula Leaves on Ethanol And Ethanol/HCl Induced Ulcer In Rats and Its Antimicrobial Potency'. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 4(9):673–79.

Chang, Han-lin, Fang-rong Chang, Jin-shan Chen, Hui-po Wang, Yi-hsiu Wu, Chien-chiao Wang, Yang-chang Wu, and Tsong-long Hwang. 2008. 'Inhibitory Effects of 16-Hydroxycyclohexa-3, 13 (14) E -Dien-15-Oic Acid on Superoxide Anion and Elastase Release in Human Neutrophils through Multiple Mechanisms'. *European Journal of Pharmacology* 586:332–39.

Colegate, Steven M. and Russell J. Molyneux. 2007. 'BIOACTIVE NATURAL PRODUCTS: Detection, Isolation, and Structural Determination Second Edition'.

Cristina, Ana, Alves De Almeida, Felipe Meira, Ricardo José Dunder, Luis Paulo, Bognoni Manzo, Alba Regina Monteiro Souza-brito, and Anderson Luiz-ferreira. 2017. 'Recent Trends in Pharmacological Activity of Alkaloids in Animal Colitis : Potential Use for Inflammatory Bowel Disease'. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2017:1–24.

Dixit, Prateek, Tripti Mishra, Mahesh Pal, T. S. Rana, and D. K. Upreti. 2014. 'Polyalthia Longifolia and Its Pharmacological Activities : Review'. *International Journal of Scientific and Innovative Research* 2(1):17–25.

Ekowati, Juni and Nuzul W. Diyah. 2013. 'Aktivitas Antinociceptiv Dan Uji In Silico Terhadap Cyclooxygenase Dari Asam P-Metoksisinamat Dan Asam M-Metoksisinamat'. *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi* 1:33–40.

Firmansyah, Mohammad Adi. 2013. 'Perkembangan Terkini Diagnosis Dan Penatalaksanaan Imflammatory Bowel Disease'. *CDK-203* 40(4):247–52.

Gosal, Fandy, Bram Paringkoan, and Nelly Tendean Wenas. 2012. 'Patofisiologi Dan Penanganan Gastropati Obat Antiinflamasi Nonsteroid'. 444–49.

Ihone, Stella and Marcellus Simadibrata. 2017. 'Diagnosis and Management of Gastroenteropathy Associated to Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs'. *The Indonesian Journal of Gastroenterology, Hepatology, and Digestive Endoscopy* 17(2):116.

Kangwan, Napapan, Jong-min Park, Eun-hee Kim, Ki Baik Hahm, Napapan Kangwan, Jong-min Park, Eun-hee Kim, and Ki Baik. 2014. 'Quality Of Healing Of Gastric Ulcers : Natural Products Beyond Acid Suppression'. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiol* 5(1):40–47.

Kanungo, Satyajit, Jyoti Ranjan Rout, and Santi Lata Sahoo. 2013. 'Evaluation of Antioxidant Enzyme Activities in Withania Somnifera L. in Vitro and in Vivo Grown Explants'. *Iranian Journal of Biotechnology* 11(4):260–64.

- Katkar, K. V, A. C. Suthar, and V. S. Chauhan. 2010. 'The Chemistry, Pharmacologic, and Therapeutic Applications of Polyalthia Longifolia'. *Pharmacognosy Reviews* 4(7):62–68.
- Klein, Amir and Rami Eliakim. 2010. 'Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Inflammatory Bowel Disease'. *Pharmaceuticals* 2010, 3(Cd):1084–92.
- Krzystek-Korpacka, Malgorzata, Katarzyna Neubauer, and Malgorzata Matusiewicz. 2009. 'Platelet-Derived Growth Factor-BB Reflects Clinical, Inflammatory And Angiogenic Disease Activity And Oxidative Stress In Inflammatory Bowel Disease'. *Clinical Biochemistry* 42(16–17):1602–9.
- Kumar, T.Sathish, M. Sampath, S. V Sivachandran, S. Shanmugam, and P. Rajasekaran. 2009. 'Optimal Process For The Extraction And Identification Of Flavonoids From The Leaves Of Polyalthia Longifolia Using L 16 Orthogonal Design Of Experiment'. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 3(4):736–45.
- Laksmiani, N. P.Lind., N. L. P.Vidy. Paramita, and I. M. A. Wirasuta. 2016. 'In Vitro and In Silico Antioxidant Activity of Purified Fractions From Purple Sweet Potato Ethanolic Extract'. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 8(8):177–81.
- Lee, Seung Hoon, Jeong Kwon, and Mi-la Cho. 2018. 'Immunological Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease'. *Interstinal Research* 16(1):26–42.
- Lejeune, Manigandan, Pearl Leung, Paul L. Beck, and Kris Chadee. 2010. 'Role of EP4 Receptor and Prostaglandin Transporter in Prostaglandin E 2 -Induced Alteration in Colonic Epithelial Barrier Integrity'. *J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299:1097–1105.
- Liu, Wei, Y. Dongxue, Na Li, H. Xiaogai, W. Dongmei, Dengwu Li, and Jianjun Liu. 2016. 'Influence of Environmental Factors on the Active Substance Production and Antioxidant Activity in Potentilla Fruticosa L. and Its Quality Assessment'. *Nature* (July):1–18.
- Maity, Pallab, Samik Bindu, Sumanta Dey, Manish Goyal, Athar Alam, Chinmay Pal, Kalyan Mitra, and Uday Bandyopadhyay. 2009. 'Indomethacin, A Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug, Develops Gastropathy By Inducing Reactive Oxygen Species-Mediated Mitochondrial Pathology And Associated Apoptosis In Gastric Mucosa: A Novel Role Of Mitochondrial Aconitase Oxidation'. *Journal of Biological Chemistry* 284(5):3058–68.
- Mardhiyah, Radhiyatam, Achmad Fauzi, and Ari Fahrial Syam. 2015. 'Diagnosis Dan Tata Laksana Enteropati Akibat Obat Anti Inflamasi Non Steroid (OAINS)'. *Jurnal Penyakit Dalam Indonesia* 2(3):190–97.
- Masbuchin, Ainun Nizar, Bagus Putu, and Putra Suryana. 2014.

‘Gastroprotective Effect of Welsh Onion (*Allium Fistulosum*) Toward Gastropathy in Indomethacin-Induced Rat’. *Majalah Kesehatan FKUB* 1:178–89.

De Mattos, Bruno Rafael Ramos, Maellin Pereira Gracindo Garcia, Julia Bier Nogueira, Lisiery Negrini Paiatto, Cassia Galdino Albuquerque, Caique Lopes Souza, Luis Gustavo Romani Fernandes, Wirla Maria Da Silva Cunha Tamashiro, and Patricia Ucelli Simioni. 2015. ‘Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms And Biological Treatments’. *Mediators of Inflammation* 2015:1–11.

Miedany, Yasser El, Sally Youssef, M. Sc, Ihab Ahmed, Maha El Gaafary, and El Miedany. 2006. ‘The Gastrointestinal Safety and Effect on Disease Activity of Etoricoxib , a Selective Cox-2 Inhibitor in Inflammatory Bowel Diseases’. *American Journal of Gastroenterology* (4):311–17.

Mustaqim, Alan, Aswiyanti Asri, and Almurdi. 2017. ‘Artikel Penelitian Pengaruh Pemberian Gel Lidah Buaya (*Aloe Vera*) Terhadap Gambaran Histopatologi Gaster Tikus Wistar Yang Diinduksi Indometasin’. *Jurnal Kesehatan Andalas* 3(3):641–46.

Neal, M. .. 2006. *At a Glance Famakologi Medis Edisi Kelima*. Erlangga Medical Series.

Neuman, Manuela G. and Radu M. Nanau. 2012. ‘Inflammatory Bowel Disease: Role of Diet, Microbiota, Life Style’. *Translational Research* 160(1):29–44.

Obaid, Ahmed Kareem, Saripah Salbiah, Syed Abdul, Yuhanis Mhd Bakri, Mohd Azlan Nafiah, Khalijah Awang, Saadon Abdulla Aowda, Norazian Mohd Hassan, Yumi Zuhanis Has-yun Hashim, and Fauziah Abdullah. 2018. ‘Antioxidative and Cytotoxic Activities of Crude and Isolated Compounds of *P . Lateriflora* (*Bl .*) King’. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 10(11):2718–21.

Peng, Jiao, Ting-ting Zheng, Xi Li, Yue Liang, Li-jun Wang, Yong-can Huang, and Li-jun Wang. 2019. ‘Plant-Derived Alkaloids : The Promising Disease-Modifying Agents for Inflammatory Bowel Disease’. *Frontiers in Pharmacology* 10(April):1–15.

PERKENI. 2011. *Konsensus Nasional Penatalaksanaan IBD Di Indonesia 2011*. Jakarta: PERKENI.

Prasetya, Rendra Chriestedy. 2015. ‘Ekspresi Dan Peran Siklooksigenase-2 Dalam Berbagai Penyakit Di Rongga Mulut’. *Stomatognatic (J. K. G Unej)* 12(1):16–20.

Prasetya, Rendra Chriestedy, Tetiana Haniastuti, and Nunuk Purwanti. 2013. ‘Ekspresi COX-2 Setelah Pemberian Ekstrak Etanolik Kulit Manggis (*Garcinia Mangostana* Linn) Pada Tikus Wistar’. *Majalah Kedokteran Gigi* 46(4):173–78.

Pratama, Nata, Murdani Abdullah, and Dolly Dolven Kansera. 2011.

‘Prevalence of Crohn’s Disease in Endoscopic Unit Cipto Mangunkusumo Hospital’. *The Indonesian Journal of Gastroenterology, Hepatology, and Digestive Endoscopy* 2(12):85–88.

Ricciotti, Emanuela and Garret A. Fitzgerald. 2013. ‘Prostaglandins and Inflammation’. *Acta Médica Portuguesa* 26(2):154–60.

Rollando, Rollando. 2018. ‘Pendekatan Struktur Aktivitas Dan Penambatan Molekul Senyawa 2-Iminoethyl 2-(2-(1-Hydroxypentan-2-Yl) Phenyl)acetate Hasil Isolasi Fungi Endofit Genus *Fusarium* Sp Pada Enzim β -Ketoasil-ACP KasA Sintase Dan Enzim Asam Mikolat Siklopropana Sintase’. *Pharmaceutical Journal of Indonesia* 3(2):45–51.

Sampath, M. 2013. ‘Optimization of The Extraction Process of Phenolic Antioxidant from *Polyalthia Longifolia* (Sonn .) Thawaites’. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 3(2):148–52.

Sampath, M. and M. Vasanthi. 2013. ‘Isolation, Structure Elucidation of Flavonoids From *Polyalthia Longifolia* (Sonn.) Thaiwaites and Evaluation of Antibacterial, Antioxidant and Anticancer Potential’. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5(1):336–41.

Sashidhara, Koneni V., Suriya P. Singh, Anuj Srivastava, and Anju Puri. 2011. ‘Identification of The Antioxidant Principles of *Polyalthia Longifolia* Var. *Pendula* Using TEAC Assay’. *Natural Product Research* 25(9):918–26.

Saxena, Arpit, Kamaljeet Kaur, Shweta Hegde, Faizan M. Kalekhan, Manjeshwar Shrinath Baliga, and Raja Fayad. 2014. ‘Dietary Agents and Phytochemicals in the Prevention and Treatment of Experimental Ulcerative Colitis’. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 4(4):203–17.

Sharma, Rk, S. Mandal, Rajani Gp, N. Gupta, and Srivastava Dp. 2016. ‘Antiulcer And Antiinflammatory Activity Of Fresh Leave Extracts Of *Polyalthia Longifolia* In Rats International Journal of Drug Development & Research Available Online Http://www.ijddr.in Covered in Official Product of Elsevier , The Netherlands Antiulcer’. *International Journal of Drug Development & Research* 3(March 2011):351–59.

Sholichah, Ninik Afrizatus, Aulanni’am, and Chanif Mahdi. 2012. ‘Therapeutic Effect of Water Extract Leaf Kedondong (*Lannea Coromandelica*) to Levels of Malondialdehyde (MDA) and Protease Activity in Ileum Rat (*Rattus Norvegicus*) Inflammatory Bowel Disease (IBD) Induced by Indomethacin’. *Veterinaria Medika* 5(3):187–94.

Siew, C. N., Hai Yun Shi, Nima Hamidi, Fox E. Underwood, Whitney Tang, Eric I. Benchimol, Remo Panaccione, Subrata Ghosh, Justin C. Y. Wu, Francis K. L. Chan, Joseph J. Y. Sung, and Gilaad G. Kaplan. 2017. ‘Worldwide Incidence And Prevalence Of Inflammatory Bowel Disease

In The 21st Century: A Systematic Review Of Population-Based Studies'. *The Lancet* 390(10114):2769–78.

Sinha, Krishnendu, Pritam Sadhukhan, Sukanya Saha, Pabitra Bikash Pal, and Parames C. Sil. 2015. 'Morin Protects Gastric Mucosa from Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug, Indomethacin Induced Inflammatory Damage And Apoptosis By Modulating NF-Kb Pathway'. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1850(4):769–83.

Smith, William L., David L. DeWitt, and R. Michael Garavito. 2000. 'CYCLOOXYGENASES : Structural, Cellular, and Molecular Biology'. *Annual Review of Biochemistry* 69(1):145–82.

Soemarie, Yulistia Budianti, Anita Aprilliana, Meita Indriastuti, Nurul Fatimah, and Heri Wijaya. 2018. 'Antibacterial Activity of Ethanol Extract of Glodokan Tiang Leaves (*Polyalthia Longifolia* S.) Against *Propionibacterium Acnes* Bacteria'. *Jurnal Farmasi Lampung* 7(1):15–27.

Suleyman, Halis, Abdulmecit Albayrak, Mehmet Bilici, Elif Cadirci, and Zekai Halici. 2010. 'Different Mechanisms in Formation and Prevention of Indomethacin-Induced Gastric Ulcers'. *Inflammation* 33(4):224–34.

Takeuchi, Koji. 2015. 'NSAID-Induced Small Intestinal Damage – Roles of Various Pathogenic Factors'. *Digestion* 2144(91):218–32.

Teng, Philip, Carla Kairupan, and Lily Loho. 2013. 'Gambaran Histopatologi Lambung Tikus Wistar Yang Diberi Cabe Rawit (*Capsicum Frutescens*)'. *Jurnal E-Biomedik* 1(November):1109–13.

Thenmozhi, M. and Rajeshwari Sivaraj. 2010. 'Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Polyalthia Longifolia*'. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 1(3):1–7.

Veza, Teresa, Alba Rodríguez-nogales, Francesca Algieri, Maria Pilar Utrilla, Maria Elena Rodríguez-cabezas, and Julio Galvez. 2016. 'Flavonoids in Inflammatory Bowel Disease : A Review'. *Nutrients* 8(211):1–22.

Wang, Dingzhi and Raymond N. DuBois. 2011. 'The Role of COX-2 in Intestinal Inflammation and Colorectal Cancer Dingzhi'. *National Institutes of Health* 29(6):781–88.

Wang, Shang-kwei. 1990. 'Two New Natural Azafluorene Alkaloids And A Cytotoxic'. *Journal of Natural Products* 5(5):1327–31.

Wee, Ng Khoon, Sunny H. Wong, and Siew C. Ng. 2016. 'Changing Epidemiological Trends of Inflammatory Bowel Disease in Asia'. *Intestinal Research* 14(2):111–19.

Windari, Tri, Jurusan Teknologi, Hasil Pertanian, Penulis Korespondensi, and Tukak Lambung. 2017. 'The Role Of Bawang Dayak (*Eleutherine Palmifolia*) Extract As Anti-Peptic Ulcer Agent In Male Wistar Rats (*Rattus Norvegicus*) Induced By Ethanol'. *Jurnal Pangan Dan*

Agroindustri 5(1):61–70.

Wu, Yang Chang. 1989. 'Azafluorene and Aporphine Alkaloids from *Polyalthia Longifolia*'. *Heterocycles* 29(3):463–75.

Yosy, Deny Salverra and Hasri Salwan. 2014. 'Inflammatory Bowel Disease Pada Anak'. *MKS* 46(2):158–63.

Yuan, Chong, Ranjinder S. Sidhu, Dmitry V. Kuklev, Yuji Kado, Masayuki Wada, Inseok Song, and William L. Smith. 2009. 'Cyclooxygenase Allosterism, Fatty Acid-Mediated Cross-Talk Between Monomers of Cyclooxygenase Homodimers'. *Journal of Biological Chemistry* 284(15):10046–55.

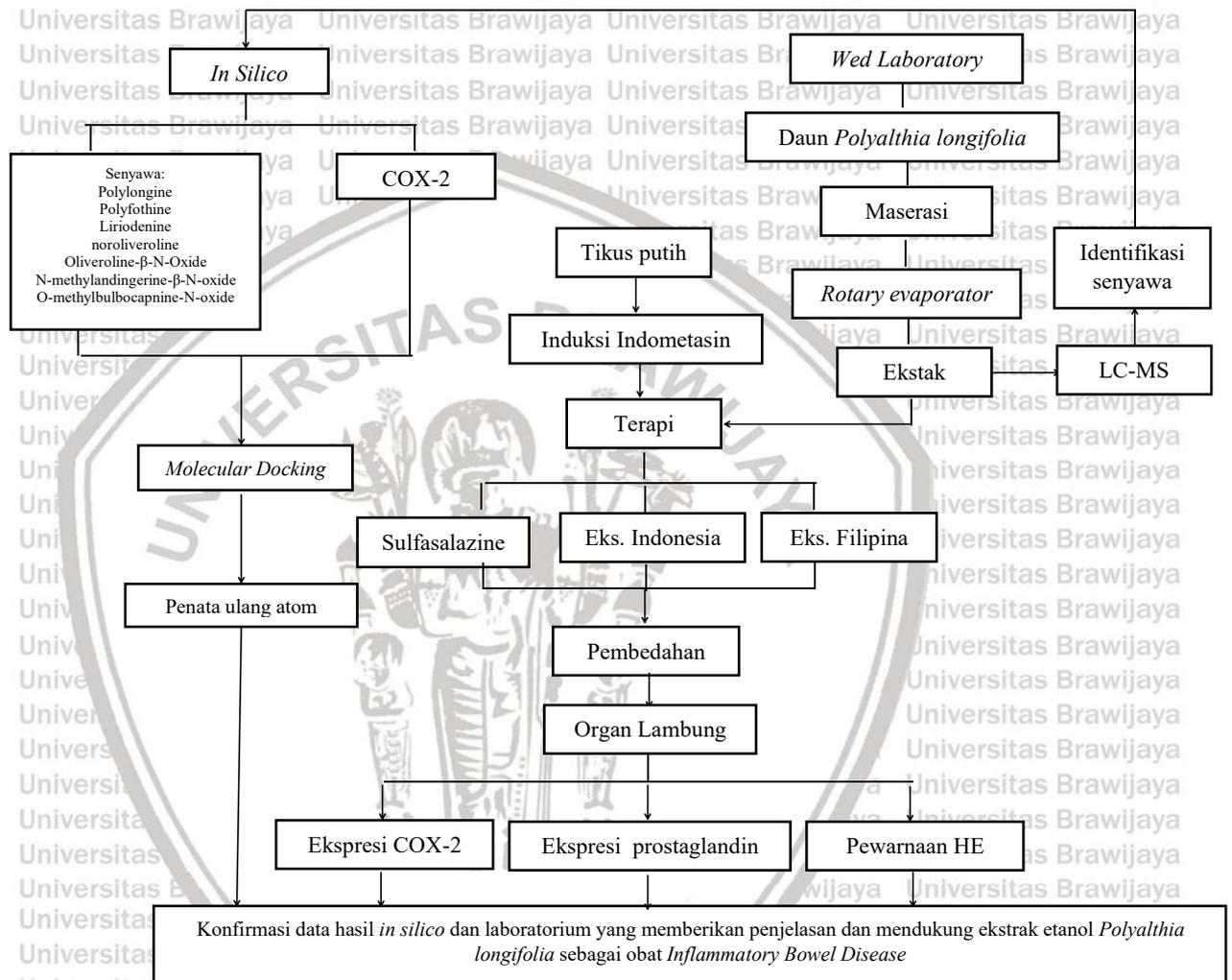
Zahra, Amira Puri, Novita Carolia, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung, Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran, and Universitas Lampung. 2017. 'Obat Anti-Inflamasi Non-Steroid (OAINS): Gastroprotektif vs Kardiotoksik Non-Steroid Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Gastroprotective vs Cardiotoxic'. *Majority* 6:153–58.



LAMPIRAN

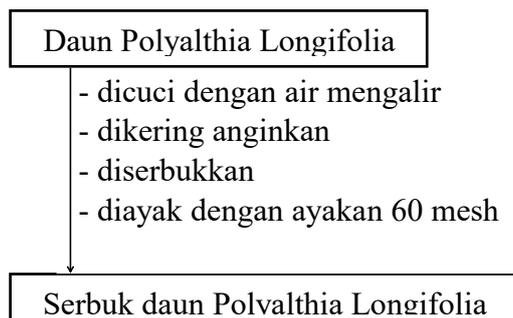
Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian

1.1 Kerangka Operasional

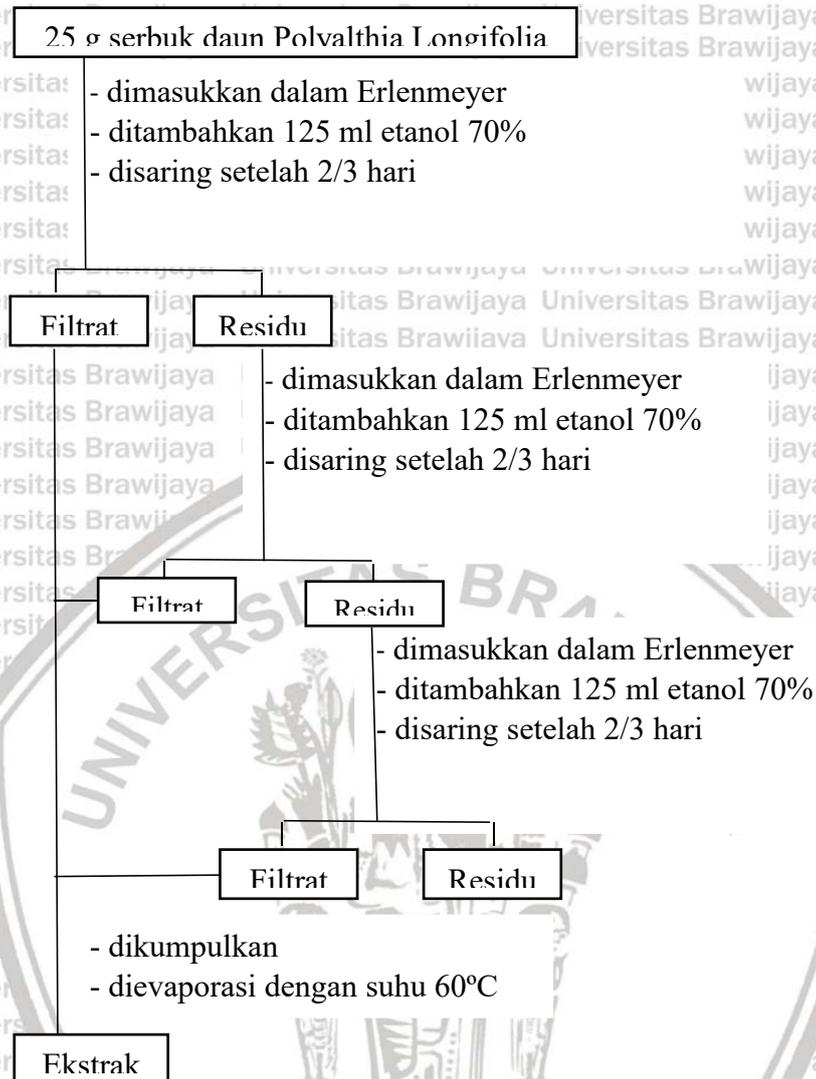


1.2 Diagram Kerja Penelitian

1.2.1 Pembuatan Simplisia Daun Polyalthia longifolia

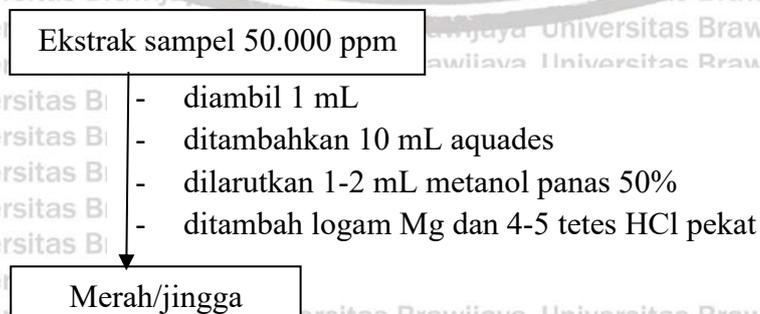


1.2.2 Ekstraksi Daun *Polyalthia longifolia*

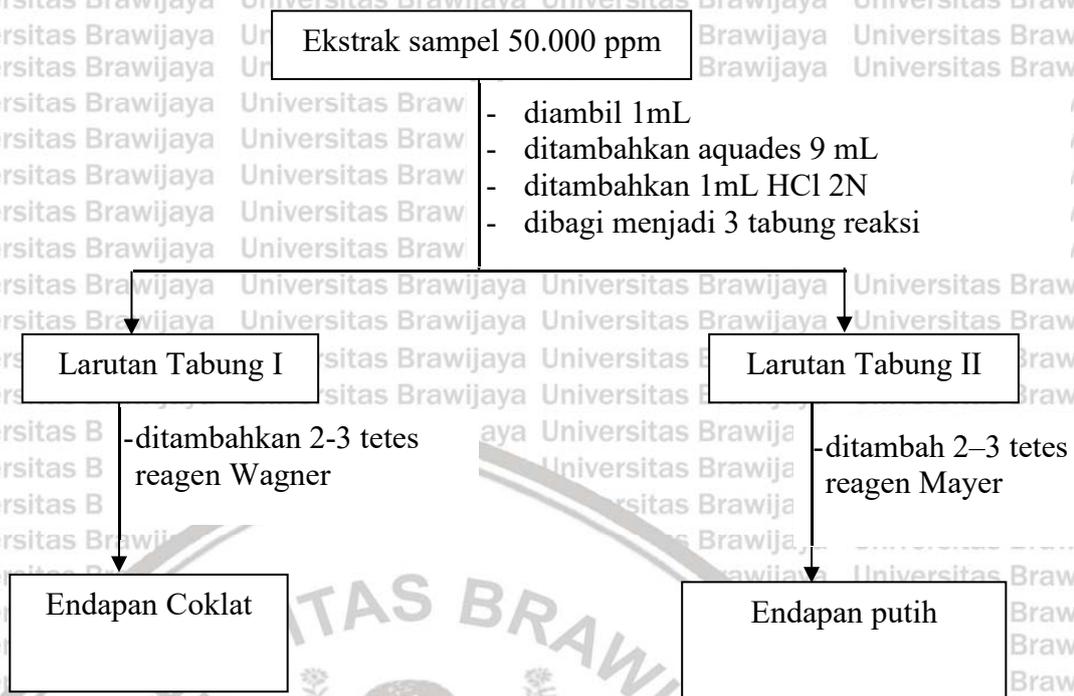


1.2.2 Uji Fitokimia

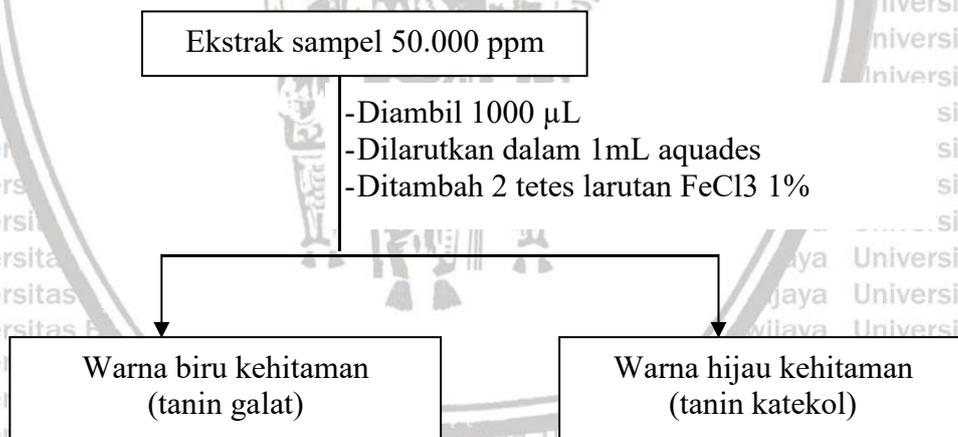
1.2.2.1 Uji Flavonoid



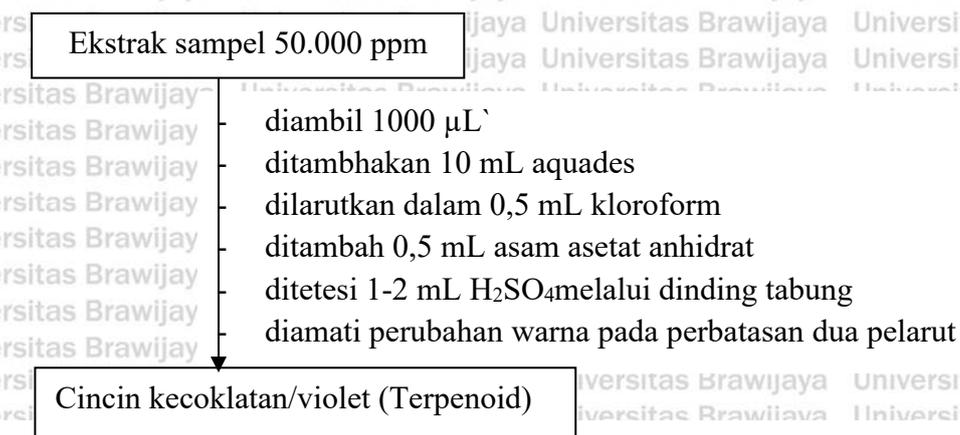
1.2.2.2 Uji Alkaloid



1.2.2.3 Uji Tanin



1.2.2.4 Uji Terpenoid



1.2.3 Persiapan Hewan Coba

Tikus Putih

- diaklimatisasi selama satu minggu
- diberikan makan dan minum secara *adlibitum*
- dilakukan pergantian alas serbuk gergaji kasar, tiga hari sekali

Tikus Putih

1.2.4 Pembuatan *Inflammatory Bowel Disease*

Tikus

- dipuasakan selama 8 jam
- diinduksi dengan Indometasin 15 mg/kg BB secara oral
- didiamkan selama 24 jam

Tikus IBD

1.2.5 Pembedahan Hewan Coba dan Analisi HE, COX-2 dan PGE₂

1.2.5.1 Pembedahan

Tikus Putih

- dislokasi leher
- dibedah
- diambil organ lambung
- dicuci

Hasil

1.2.5.2 Pembuatan Preparat Lambung

Lambung dalam larutan buffer formalin 10%

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

Preparat lambung

1.2.5.5 Pewarnaan HE

Preparat Lambung

- Dideparafinisasi dengan xylol bertingkat dari xylol I-III masing-masing selama 5 menit.
- Didehidrasi dengan alkohol bertingkat mulai dari 95%, 90%, 80%, 70% selama 5 menit
- Diwarnai dengan hematoxyline selama 10 menit
- Dicuci dengan aquades selama 5 menit
- Dimasukkan dalam pewarna eosin selama 5 menit
- Dicuci dengan aquades
- Didehidrasi dengan alkohol bertingkat dari 70%, 80%, 90% dan 95%
- Dilakukan *cleaning* dengan xylol I dan II
- Dikeringkan
- Diberi entellan dan ditutup dengan *coverglass*
- Diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x

Preparat HE

1.2.5.3 Teknik Imonohistokimia COX-2

Preparat Lambung

- Dilakukan deparafinasi preparat (blok parafin) dengan xylol 1, 2 dan 3 masing-masing 15 menit
- Dilakukan rehidrasi preparat dengan menggunakan etanol absolut, 90%, 80%, 70% dan aquades
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 3x3 menit
- Ditambahkan H₂O₂ 3% selama 40 menit pada suhu ruang
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x3 menit
- Bloking unspesifik protein menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X selama semalam
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 3x selama 3 menit
- Ditetesi antibodi primer (rat COX-2 polyclonal) pengenceran 1:50 selama semalam pada suhu 4°C.
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x3 menit
- Diinkubasi dengan antibodi sekunder berlabel biotin selama satu jam pada suhu ruang
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x3 menit
- Diinkubasi menggunakan SA-HRP (*Strep-Avidin Horse RadisPeroxidase*) selama 40 menit
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x3 menit
- Ditetesi kromagen DAB dan diinkubasi selama 10menit
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x3 menit
- Counterstaining menggunakan Mayer Hematoxilen yang diinkubasi selama 10 menit
- Dicuci dengan menggunakan tap water
- Dibilas dengan dH₂O dan dikeringkan
- Mounting menggunakan entellan
- Ditutup dengan cover glass
- Diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x

Ekspresi COX-2

1.2.5.4 Teknik Imonohistokimia PGE₂

Preparat Lambung

- Dilakukan deparafinasi preparat (blok parafin) dengan xylol 1 dan 2 masing-masing 3 menit
- Dilakukan rehidrasi preparat dengan menggunakan etanol absolut, 90%, 80%, 70% dan aquades
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 3x5 menit
- Dicuci dengan H₂O₂ (dalam DI water) selama 20 menit pada suhu ruang
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3x
- Bloking unspesifik protein menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x3 menit
- Ditetesi antibodi primer (rat anti-PGE₂) pengenceran 1:100 selama semalam pada suhu 4°C.
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x3 menit
- Diinkubasi dengan antibodi sekunder berlabel biotin selama satu jam pada suhu ruang
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x3 menit
- Diinkubasi menggunakan SA-HRP (*Strep-Avidin Horse RadisPeroxidase*) selama 40 menit
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x3 menit
- Ditetesi kromagen DAB dan diinkubasi selama 10menit
- Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x3 menit
- Counterstaining menggunakan Mayer Hematoxilen yang diinkubasi selama 10 menit
- Dicuci dengan menggunakan tap water
- Dibilas dengan dH₂O dan dikeringkan
- Mounting menggunakan entellan

Ekspresi PGE₂

Lampiran 2: Pembuatan Larutan

2.1. Pembuatan Larutan NaCl 0,9%

Konsentrasi 0.9 % sama dengan 0,9 g NaCl dalam 100 mL aquades. Jadi, untuk membuat larutan NaCl 0,9% adalah ditimbang sebanyak 0,9 g serbuk NaCl dengan neraca analitik, dimasukkan dalam beaker glass 50 mL untuk dilarutkan dengan 10 mL aquades. Dilakukan pengadukan dengan spatula sampai larut sempurna. Setelah larut, dipindahkan dalam labu takar 100 mL dan ditanda bataskan dengan pelarut aquades. Dikocok hingga homogen.

2.2. Pembuatan FeCl₃ 1 %

Konsentrasi 1 % sma dengan 1 g FeCl₃ dalam 100 mL akuades. Jadi, untuk membuat larutan FeCl₃ 1 % adalah ditimbang sebanyak 1 g serbuk FeCl₃ dengan neraca analitik, dimasukkan dalam beaker glass 50 mL untuk dilarutkan dengan 50 mL akuades. Dilakukan pengadukan dengan spatula sampai larut sempurna. Setelah larut, dipindahkan dalam labu takar 100 mL dan ditandabatkan dengan pelarut akuades. Dikocok hingga homogen.

2.3. Pembuatan Larutan CMC-Na 0,5 %

Serbuk CMC-Na ditimbang sebanyak 0,5 g dengan neraca analitik, dimasukkan dalam beaker glass 50 mL dan dilarutkan dengan akuades hangat \pm 25 mL (dilakukan pengadukan dengan spatula sampai larut sempurna). Setelah larut semua, dimasukkan dalam labu takar 50 mL dan ditandabatkan dengan menambahkan pelarut akuades. Sehingga diperoleh larutan 50 mL CMC-Na 0,5%.

2.4. Pembuatan Larutan Buffer formalin 10%

Na₂HPO₄ sebanyak 0,6 gram dan NaH₂PO₄ sebanyak 0,4 gram dilarutkan dalam 100 mL formalin dalam beker glass. Larutan dimasukan dalam labu ukur 1000 mL dan ditambahkan aquades hingga tanda batas.

Campuran dihomogenkan sehingga diperoleh buffer formalin 10%

Lampiran 3. Perhitungan Ekstrak dan Sulfasalazine

3.1 Indometasin

Tikus dengan BB 200 gram

Dosis Indometasin = 15 mg/kgBB

Dosis Indometasin untuk berat badan 200 gram = BB tikus x dosis

Indometasin

$$= 200 \text{ g} \times 15 \text{ mg/kg}$$

$$= 0,2 \text{ kg} \times 15 \text{ mg/kg}$$

$$= 3 \text{ mg/kg}$$

Jumlah Indometasin yang dibutuhkan = 3 mg x 24 x 1

$$= 72 \text{ mg}$$

Keterangan:

Angka 24 = jumlah tikus yang diinginkan untuk mengalami *Inflammatory Bowel Disease*, sehingga dibuat larutan Indometasin 72 mg.

3.2 Terapi

3.2.1 Ekstrak etanol *polyalthia longifolia* Indonesia

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

$$= 300 \text{ mg/kg} \times 200 \text{ g} \times 8$$

$$= 300 \text{ mg/kg} \times 0,2 \text{ kg} \times 8$$

$$= 480 \text{ mg}$$

Ekstrak yang dibutuhkan selama terapi = 480 mg x lama terapi

$$= 480 \text{ mg} \times 14$$

$$= 6720 \text{ mg}$$

$$= 6,72 \text{ g}$$

3.2.2 Ekstrak etanol *polyalthia longifolia* Filipina

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

$$= 300 \text{ mg/kg} \times 200 \text{ g} \times 8$$

$$= 300 \text{ mg/kg} \times 0,2 \text{ kg} \times 8$$

$$= 480 \text{ mg}$$

Ekstrak yang dibutuhkan selama terapi = $480 \text{ mg} \times \text{lama terapi}$

$$= 480 \text{ mg} \times 14$$

$$= 6720 \text{ mg}$$

$$= 6,72 \text{ g}$$

3.2.3 Sulfasalazin

Sulfasalazin yang dibutuhkan = $\text{dosis} \times \text{BB tikus} \times \text{jumlah tikus}$

$$= 10 \text{ mg/kg} \times 200 \text{ g} \times 8$$

$$= 10 \text{ mg/kg} \times 0,2 \text{ kg} \times 8$$

$$= 16 \text{ mg}$$

Berat obat Sulfasalazine per tablet = $0,6787 \text{ g} = 678,7 \text{ mg}$

Berat obat Sulfasalazine yang dibutuhkan tiap hari = $\frac{16 \text{ mg}}{500 \text{ mg}} \times 678,7 \text{ mg}$

$$= 21,7184 \text{ mg}$$



Lampiran 4. Hasil Ekstraksi

4.1 Rendemen Ekstrak

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

4.1.1 Rendemen ekstrak etanol *Polyalthia longifolia* Indonesia

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{46,9052 \text{ gram}}{175 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 26,803\%$$

4.1.2 Rendemen ekstrak etanol *Polyalthia longifolia* Filipina

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{28,9195 \text{ gram}}{125 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 23,1356\%$$

4.2 Skrining Fitokimia

Uji Senyawa	Indonesia	Filipina	Hasil
Flavonoid			Terbentuk perubahan warna menjadi jingga
Alkaloid Reagen mayer			Terbentuk endapan putih

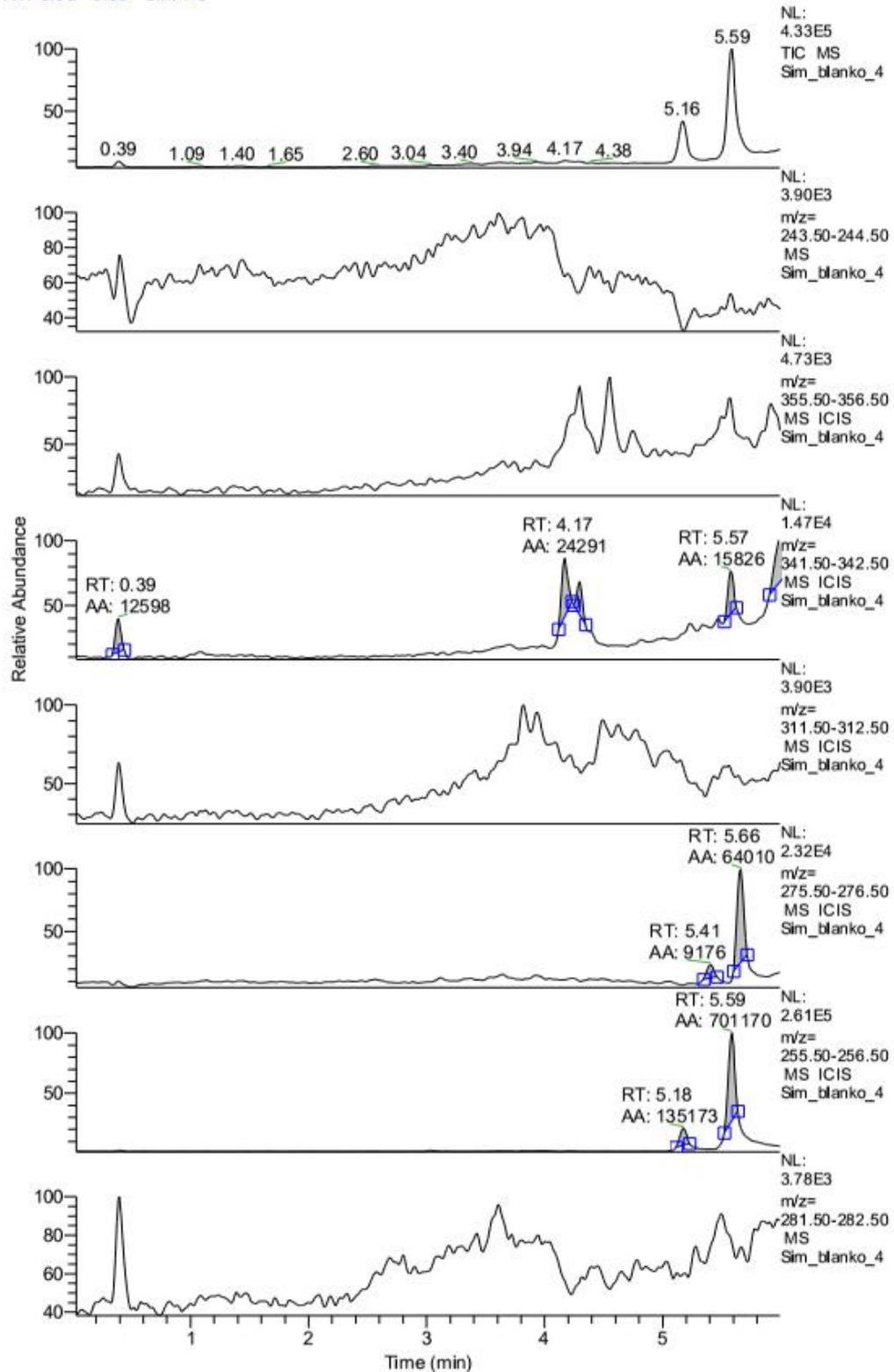
Alkaloid Reagen Wagner			Terbentuk endapan coklat
Terpenoid			Terbentuk cincin coklat
Tanin			Tejadi perbahan warna menjadi hijau pekat
Saponin			Busa tidak hilang

4.3 Hasil LC-MS

4.3.1 Blako

E:\DATA RAW\Des_18\Sim_blanco_4

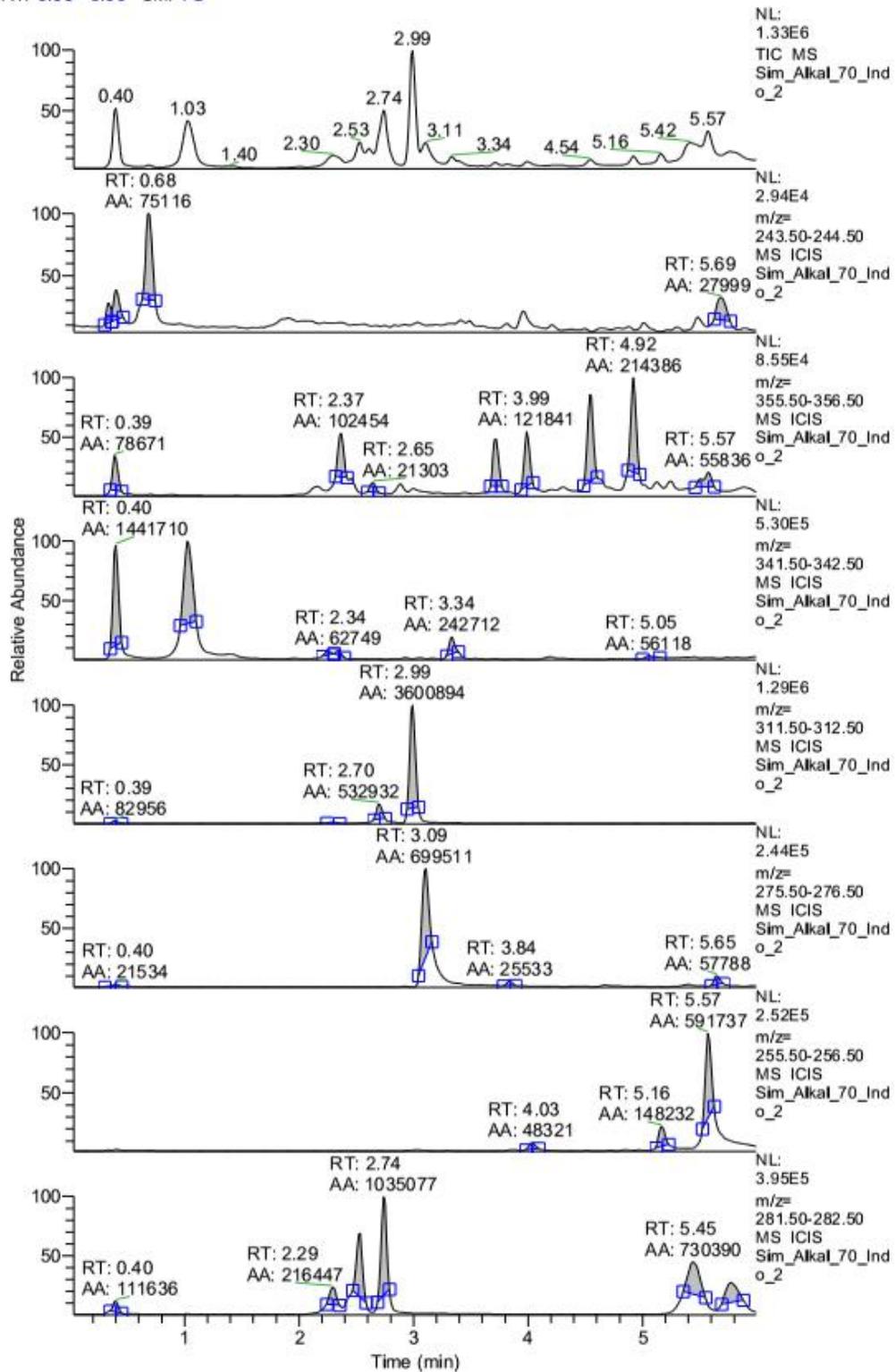
RT: 0.03 - 5.99 SM: 7G



4.3.2 Indonesia

E:\DATA RAW\Des_18\Sim_Alkal_70_Indo_2

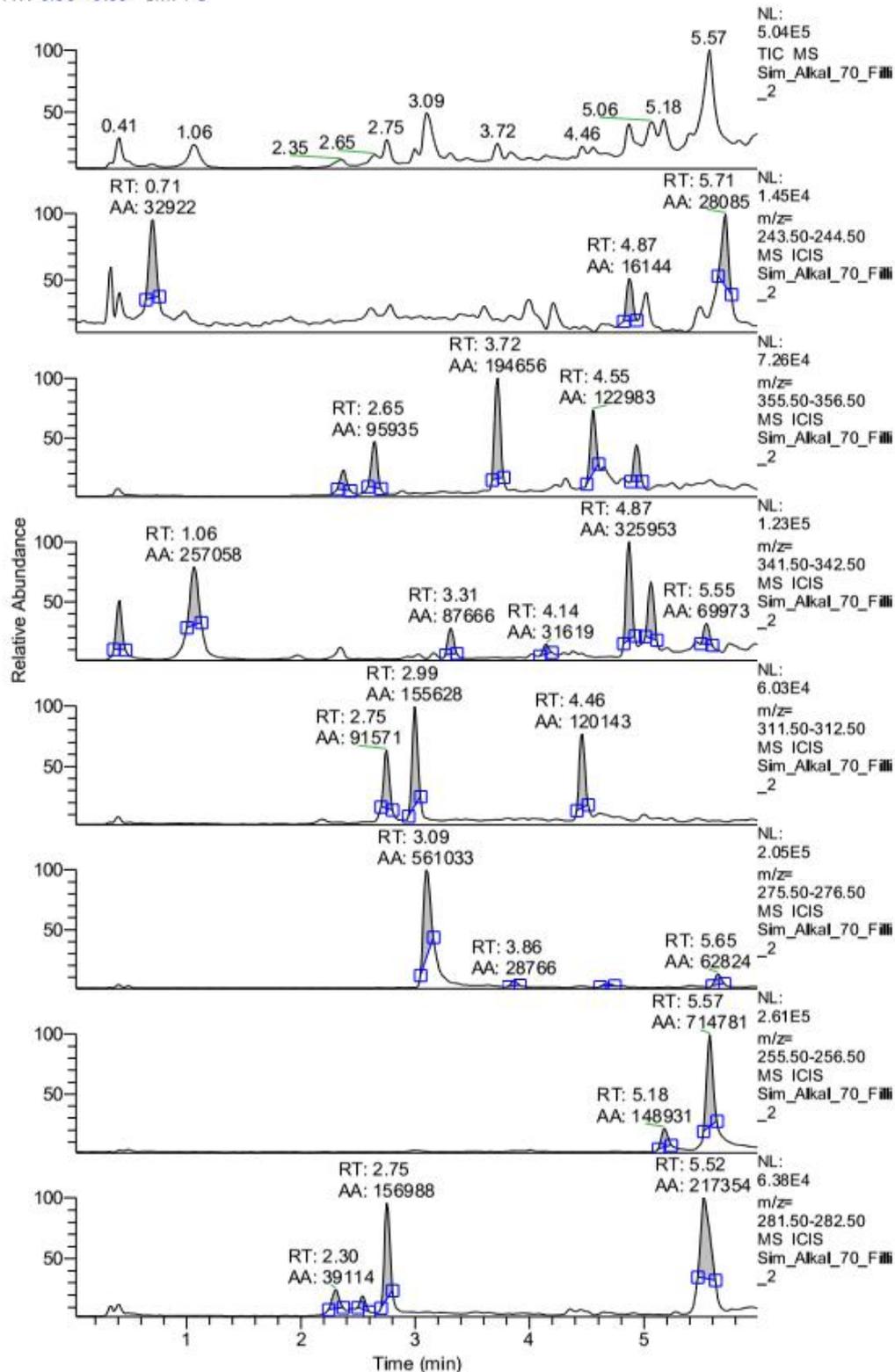
RT: 0.03 - 5.99 SM: 7G



4.3.3 Filipina

E:\DATA RAW\Des_18\Sim_Alkal_70_F\Sim_2

RT: 0.03 - 5.99 SM: 7G



Lampiran 5. Ekspresi COX-2

4.1 Data Jumlah Ekspresi COX-2

Kelompok Perlakuan	Jumlah Ekspresi COX-2 (%)				Rata-rata \pm SD
	1	2	3	4	
Sulfasalazin 7 hari	1,64	1,56	1,6	1,62	1,605 \pm 0,3416
Sulfasalazin 14 hari	0,76	0,74	0,72	0,78	0,75 \pm 0,02582
Indonesia 7 hari	1,42	1,58	1,60	1,56	1,54 \pm 0,08165
Indonesia 14 hari	0,80	0,84	0,92	0,96	0,88 \pm 0,07303
Filipina 7 hari	1,74	1,76	1,84	1,72	1,765 \pm 0,05262
Filipina 14 hari	1,00	1,06	1,14	1,18	1,095 \pm 0,8062

4.2 Uji Statistik Ekspresi COX-2 Menggunakan SPSS

4.2.1 Uji Normalitas

Tests of Normality

Kelompok	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Ekspresi_COX2 Sulfasalazine 7 hari	.971	4	.850
Sulfasalazine 14 hari	.993	4	.972
Indonesia 7 hari	.807	4	.115
Indonesia 14 hari	.950	4	.714
Filipina 7 hari	.887	4	.369
Filipina 14 hari	.963	4	.796

a. Lilliefors Significance Correction

4.2.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Kelompok	Based on	Levene Statistic			Sig.
		Statistic	df1	df2	
Ekspresi_COX2	Based on Mean	2.003	5	18	.127
	Based on Median	1.056	5	18	.417
	Based on Median and with adjusted df	1.056	5	7.850	.450
	Based on trimmed mean	1.821	5	18	.159

4.2.3 Uji One Way Anova

ANOVA

Ekspresi_COX2	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.533	5	.707	183.530	.000
Within Groups	.069	18	.004		
Total	3.602	23			

4.2.4 Uji Lanjutan *Tukey*

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Ekspresi_COX2
Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Sulfasalazine 7 hari	Sulfasalazine 14 hari	.85500*	.04387	.000	.6812	1.0288
	Indonesia 7 hari	.06500	.04387	.680	-.1088	.2388
	Indonesia 14 hari	.72500*	.04387	.000	.5512	.8988
	Filipina 7 hari	-.16000	.04387	.019	-.3338	.0138
	Filipina 14 hari	.51000*	.04387	.000	.3362	.6838
Sulfasalazine 14 hari	Sulfasalazine 7 hari	-.85500*	.04387	.000	-1.0288	-.6812
	Indonesia 7 hari	-.79000*	.04387	.000	-.9638	-.6162
	Indonesia 14 hari	-.13000	.04387	.076	-.3038	.0438
	Filipina 7 hari	-1.01500*	.04387	.000	-1.1888	-.8412
	Filipina 14 hari	-.34500*	.04387	.000	-.5188	-.1712
Indonesia 7 hari	Sulfasalazine 7 hari	-.06500	.04387	.680	-.2388	.1088
	Sulfasalazine 14 hari	.79000*	.04387	.000	.6162	.9638
	Indonesia 14 hari	.66000*	.04387	.000	.4862	.8338
	Filipina 7 hari	-.22500*	.04387	.001	-.3988	-.0512
	Filipina 14 hari	.44500*	.04387	.000	.2712	.6188
Indonesia 14 hari	Sulfasalazine 7 hari	-.72500*	.04387	.000	-.8988	-.5512
	Sulfasalazine 14 hari	.13000	.04387	.076	-.0438	.3038
	Indonesia 7 hari	-.66000*	.04387	.000	-.8338	-.4862
	Filipina 7 hari	-.88500*	.04387	.000	-1.0588	-.7112
	Filipina 14 hari	-.21500*	.04387	.001	-.3888	-.0412
Filipina 7 hari	Sulfasalazine 7 hari	.16000	.04387	.019	-.0138	.3338
	Sulfasalazine 14 hari	1.01500*	.04387	.000	.8412	1.1888
	Indonesia 7 hari	.22500*	.04387	.001	.0512	.3988
	Indonesia 14 hari	.88500*	.04387	.000	.7112	1.0588
	Filipina 14 hari	.67000*	.04387	.000	.4962	.8438
Filipina 14 hari	Sulfasalazine 7 hari	-.51000*	.04387	.000	-.6838	-.3362
	Sulfasalazine 14 hari	.34500*	.04387	.000	.1712	.5188
	Indonesia 7 hari	-.44500*	.04387	.000	-.6188	-.2712
	Indonesia 14 hari	.21500*	.04387	.001	.0412	.3888
	Filipina 7 hari	-.67000*	.04387	.000	-.8438	-.4962

*. The mean difference is significant at the 0.01 level.

Ekspresi_COX2

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.01			
		1	2	3	4
Sulfasalazine 14 hari	4	.7500			
Indonesia 14 hari	4	.8800			
Filipina 14 hari	4		1.0950		
Indonesia 7 hari	4			1.5400	
Sulfasalazine 7 hari	4			1.6050	1.6050
Filipina 7 hari	4				1.7650
Sig.		.076	1.000	.680	.019

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

4.3 Data Ekspresi COX-2 pada Kelompok kontrol Normal dan Positif

Kelompok Kontrol	Jumlah Ekspresi COX-2 (%)				Rata-rata ± SD
	1	2	3	4	
Normal	0,72	0,74	0,72	0,76	0,625 ± 0,03416
Positif	3,4	3,26	3,46	3,32	3,36 ± 0,08794



Lampiran 6. Ekspresi PGE-2

6.1 Data Jumlah Ekspresi PGE-2

Kelompok Perlakuan	Jumlah Ekspresi PGE-2 (%)				Rata-rata \pm SD
	1	2	3	4	
Sulfasalazin 7 hari	1,32	1,26	1,36	1,34	1,32 \pm 0,0432
Sulfasalazin 14 hari	0,92	0,94	0,90	0,96	0,93 \pm 0,02582
Indonesia 7 hari	1,52	1,58	1,54	1,46	1,525 \pm 0,050
Indonesia 14 hari	0,98	1,02	0,92	0,96	0,97 \pm 0,04163
Filipina 7 hari	2,22	2,26	2,28	2,20	2,24 \pm 0,03651
Filipina 14 hari	1,46	1,44	1,46	1,40	1,40 \pm 0,02828

6.2 Uji Statistik Ekspresi PGE-2 Menggunakan SPSS

6.2.1 Uji Normalitas

Tests of Normality

Kelompok	Statistic	Shapiro-Wilk		
		df	Sig.	
Ekspresi_PGE2	Normal	.945	4	.683
Positif		.927	4	.577
Sulfasalazine 7 hari		.927	4	.577
Sulfasalazine 14 hari		.993	4	.972
Indonesia 7 hari		.982	4	.911
Indonesia 14 hari		.998	4	.995
Filipina 7 hari		.950	4	.714
Filipina 14 hari		.827	4	.161

a. Lilliefors Significance Correction

6.2.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Kelompok	Based on	Levene Statistic			Sig.
		Statistic	df1	df2	
Ekspresi_PGE2	Based on Mean	.346	5	18	.878
	Based on Median	.310	5	18	.900
	Based on Median and with adjusted df	.310	5	13.073	.898
	Based on trimmed mean	.346	5	18	.878

6.2.3 Uji One Way Anova

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.540	5	.908	612.092	.000
Within Groups	.027	18	.001		
Total	4.566	23			

6.2.4 Uji Lanjutan Tukey test

Multiple Comparisons Dependent Variable: Ekspresi_PGE2 Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Sulfasalazine 7 hari	Sulfasalazine 14 hari	.39000*	.02723	.000	.2821	.4979
	Indonesia 7 hari	-.20500*	.02723	.000	-.3129	-.0971
	Indonesia 14 hari	.35000*	.02723	.000	.2421	.4579
	Filipina 7 hari	-.92000*	.02723	.000	-1.0279	-.8121
	Filipina 14 hari	-.12000*	.02723	.004	-.2279	-.0121
Sulfasalazine 14 hari	Sulfasalazine 7 hari	-.39000*	.02723	.000	-.4979	-.2821
	Indonesia 7 hari	-.59500*	.02723	.000	-.7029	-.4871
	Indonesia 14 hari	-.04000	.02723	.687	-.1479	.0679
	Filipina 7 hari	-1.31000*	.02723	.000	-1.4179	-1.2021
	Filipina 14 hari	-.51000*	.02723	.000	-.6179	-.4021
Indonesia 7 hari	Sulfasalazine 7 hari	.20500*	.02723	.000	.0971	.3129
	Sulfasalazine 14 hari	.59500*	.02723	.000	.4871	.7029
	Indonesia 14 hari	.55500*	.02723	.000	.4471	.6629
	Filipina 7 hari	-.71500*	.02723	.000	-.8229	-.6071
	Filipina 14 hari	.08500	.02723	.056	-.0229	.1929
Indonesia 14 hari	Sulfasalazine 7 hari	-.35000*	.02723	.000	-.4579	-.2421
	Sulfasalazine 14 hari	.04000	.02723	.687	-.0679	.1479
	Indonesia 7 hari	-.55500*	.02723	.000	-.6629	-.4471
	Filipina 7 hari	-1.27000*	.02723	.000	-1.3779	-1.1621
	Filipina 14 hari	-.47000*	.02723	.000	-.5779	-.3621
Filipina 7 hari	Sulfasalazine 7 hari	.92000*	.02723	.000	.8121	1.0279
	Sulfasalazine 14 hari	1.31000*	.02723	.000	1.2021	1.4179
	Indonesia 7 hari	.71500*	.02723	.000	.6071	.8229
	Indonesia 14 hari	1.27000*	.02723	.000	1.1621	1.3779
	Filipina 14 hari	.80000*	.02723	.000	.6921	.9079
Filipina 14 hari	Sulfasalazine 7 hari	.12000*	.02723	.004	.0121	.2279
	Sulfasalazine 14 hari	.51000*	.02723	.000	.4021	.6179
	Indonesia 7 hari	-.08500	.02723	.056	-.1929	.0229
	Indonesia 14 hari	.47000*	.02723	.000	.3621	.5779
	Filipina 7 hari	-.80000*	.02723	.000	-.9079	-.6921

*. The mean difference is significant at the 0.01 level.

Ekspresi_PGE2

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.01			
		1	2	3	4
Sulfasalazine 14 hari	4	.9300			
Indonesia 14 hari	4	.9700			
Sulfasalazine 7 hari	4		1.3200		
Filipina 14 hari	4			1.4400	
Indonesia 7 hari	4			1.5250	
Filipina 7 hari	4				2.2400
Sig.		.687	1.000	.056	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

6.3 Data Ekspresi PGE₂ pada Kelompok Kontrol Normal dan Positif

Kelompok Kontrol	Jumlah Ekspresi COX-2 (%)				Rata-rata ± SD
	1	2	3	4	
Normal	0,9	0,94	0,90	0,86	0,90 ± 0,03266
Positif	3,30	3,36	3,38	3,40	3,36 ± 0,0432

Lampiran 7. Sertifikat Taksonomi



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

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

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

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

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

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

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

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

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 30 Agustus 2018

Kepala Laboratorium

LABORATORIUM Dr. Jati Batoro, M.Si
 TAKSONOMI Nip. 195704251986011001



Lampiran 8. Sertifikat Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 1035-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL : TERAPI EKSTRAK ETANOL DAUN *Polyalthia longifolia* INDONESIA DAN FILIPIN TERHADAP EKSPRESI CYCLOOXYGENASE-2, PROSTALGLANDIN DAN GAMBARAN HISPATOLOGI LAMBUNG TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL INFLAMMATORY BOWEL DISEASE YANG DIINDUKSI INDOMETASIN

PENELITI : TRI ZULFI ANITA

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 2 November 2018

Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



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

Lampiran 9. Sertifikat Bebas Plagiasi

repository.ub.ac.id

plagiarism-detector
Cutting-edge class tool for plagiarism detection and prevention

19 0958 T

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
PASCASARJANA

SERTIFIKAT BEBAS PLAGIASI
Nomor: 2599/UN10.F40/PN/2019

Sertifikat ini diberikan kepada:

Nama : Tri Zulfi Anita
NIM : 176090200111002
Program Studi : Program Magister Kimia
Fakultas : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas : Universitas Brawijaya

Dengan Judul Tesis
Terapi Ekstrak Etanol Daun *Polyalthia longifolia* Indonesia dan Filipina Terhadap Ekspresi *Cyclooxygenase 2*, *Prostaglandin E2* dan Gambaran Hispatologi Lambung (*Rattus norvegicus*) Model Inflammatory Bowel Disease yang di Induksi Indometasin

Telah dideteksi tingkat plagiasinya secara online pada tanggal **24 Oktober 2019** dan dinyatakan **bebas plagiasi** dengan kriteria toleransi $\leq 5\%$.

Malang, 25 Oktober 2019
Ketua Badan Penerbitan Jurnal

Prof. Dr. Hono, M.Phil
NIP. 1962111011980011904

Indah Yanti, S.Si, M.Si
NIP. 197911292005012002

