

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. TELAAH PUSTAKA

1. *Aegle marmelos* Correa

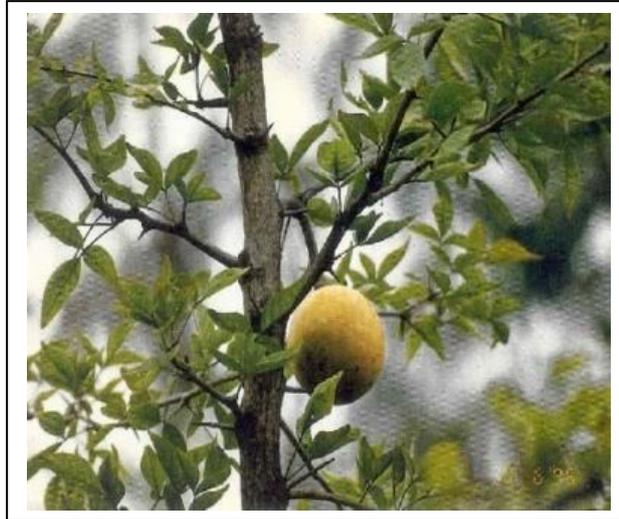
Maja atau yang lebih dikenal dengan nama *Aegle marmelos* Correa memiliki sinonim *Belon marmelos* W. F. Wight atau *Crateva marmelos* L. (Dalimartha, 1999). Di beberapa wilayah sebutan untuk *Aegle marmelos* Correa berbeda – beda. Di Sumatera disebut juga dengan nama Bilak (Melayu), Maja, Mojo legi (Jawa), Maos (Madura) dan Kabila (Nusa Tenggara) (IPTEKnet, 2009).

a. Klasifikasi

Dalam taksonom tumbuhan, *Aegle marmelos* Correa diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i> (Tumbuhan)
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i> (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: <i>Spermatophyta</i> (Menghasilkan biji)
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i> (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i> (Berkeping dua / dikotil)
Sub Kelas	: <i>Rosidae</i>
Ordo	: <i>Sapindales</i>
Famili	: <i>Rutaceae</i> (Suku jeruk-jerukan)
Genus	: <i>Aegle</i>
Spesies	: <i>Aegle marmelos</i> (L.) Correa (Plantamor, 2008)

b. Deskripsi



Gambar 1. *Aegle marmelos* Correa (Plantamor, 2008)

Maja (*Aegle marmelos* Correa) tumbuh dalam bentuk pohon keras, berumur panjang (*perennial*) dengan tinggi 10 – 15 meter. Batang berkayu (*lignosus*), berbentuk silindris, batang tua kadang melintir satu sama lain, berwarna coklat kotor, permukaan kasar. Percabangan banyak, daun tunggal, tersusun berseling (*alternate*), warna hijau, bentuk bular telur, panjang $\pm 7,5$ cm, lebar $\pm 4,8$ cm, ujung dan pangkal meruncing (*acuminatus*), tepi kadang bergerigi tumpul (*crenatus*), susunan pertulangan menyirip (*pinnate*), meluruh pada musim kemarau. Bunga majemuk, kelopak berbentuk bintang (*stellatus*). Buah bulat lonjong, panjang 5 – 12 cm. akar tunggang (Plantamor, 2008).

Perbanyakannya bisa secara generatif (biji) maupun vegetatif (cangkok). Tumbuh di dataran rendah sampai ketinggian ± 500 mdpl. Biasa tumbuh di lahan basah seperti rawa –rawa maupun di lahan kering.

Mulai belajar berbuah pada umur 5 tahun dan produksi maksimal dicapai setelah umur 15 tahun. Satu pohon bisa menghasilkan 200 – 400 butir buah. Buah maja biasanya masak pada musim kemarau bersamaan dengan daun – daunnya yang meluruh (Plantamor, 2008).

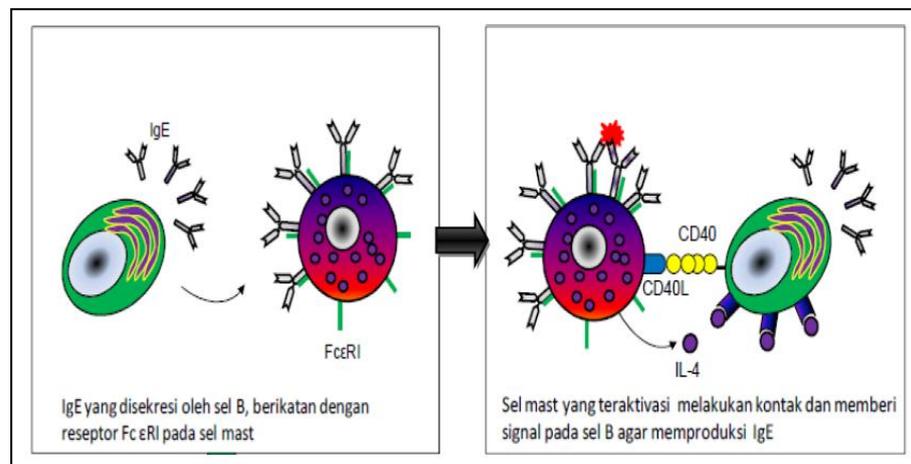
Berbagai penelitian terdahulu melaporkan bahwa *Aegle marmelos* Correa memiliki beberapa golongan senyawa yang diduga berpotensi cerah untuk dikembangkan sebagai agen antialergi. Termasuk kontraksi saluran pernafasan seperti asma (Nugroho *et al.*, 2011). Golongan senyawa tersebut diantaranya adalah kumarin, alkaloid, steroid, flavonoid dan triterpenoid (Riyanto, 2003).

2. Alergi

Alergi merupakan suatu reaksi berlebihan oleh sistem imun sebagai tanggapan pada kontak badan dengan bahan-bahan asing tertentu yang dikenal sebagai *allergen*. Clemens von Pirquet pada tahun 1906 untuk pertama kali menggunakan istilah alergi sebagai perubahan kemampuan tubuh dalam merespon substansi asing bila terpajan dengan bahan yang sama untuk kedua kalinya atau lebih. Robert Coombs dan Philip HH Gell tahun 1963 membagi reaksi hipersensitivitas dalam 4 tipe reaksi berdasarkan kecepatan dan mekanisme imun yang terjadi, yaitu tipe I,II,III dan IV. Reaksi hipersensitivitas tipe I merupakan respon jaringan yang terjadi karena adanya ikatan silang antara alergen dan IgE. Reaksi ini dapat disebut juga sebagai reaksi cepat, reaksi alergi, atau reaksi anafilaksis. Manifestasi yang

ditimbulkan dari reaksi ini berupa anafilaksis, urtikaria, asma bronkial atau dermatitis atopi (Paramita, 2011).

Salah satu gejala alergi adalah asma yang merupakan suatu sindroma yang sangat kompleks melibatkan berbagai sel inflamasi, antigen, faktor genetik, mediator dan sitokin. Subtipe Th2 yang merupakan subtipe yang terlibat pada asma adalah subtipe yang bertugas mensekresi berbagai sitokin yang bertanggung jawab bagi berkembangnya reaksi tipe lambat atau *cell-mediated hypersensitivity reaction*. Sel Th2 merupakan bagian dari sel limfosit *T helper* (CD^{4+}) yang mensekresi IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 dan GM-CSF, sedangkan sitokin yang berfungsi mengaktifkan makrofag dan disekresi oleh sel Th1 adalah IL-2, IL-3, IFN- γ dan lymphotoxin. Sel penyaji antigen (APC) akan mengenali alergen untuk selanjutnya mengekspresikan pada sel limfosit T secara langsung atau melalui sitokin. Sel limfosit B dirangsang oleh sel limfosit T tersensitisasi sehingga menghasilkan antibodi IgE. IgE akan menempel pada reseptornya di sel mast yaitu *high affinity IgE receptors* (Fc ϵ RI). Sel mast yang teraktivasi ini akan melakukan kontak dan memberi signal pada sel B agar memproduksi IgE (Gambar 2) (Rifa'i, 2011).



Gambar 2. Mekanisme produksi IgE (Rifa'i, 2011)

Antibodi *class switching* pembentukan IgE akan diinduksi oleh sitokin seperti IL-4 dan IL-13 dan ekspresi molekul adhesi endotel. Ikatan IL-4 dengan reseptor yang ada pada sel B menimbulkan *class switching* yang mengarah pada pembentukan antibodi IgE lebih banyak. IgE dibentuk secara berlebihan dan akan menempel pada reseptornya di sel mast, basofil dan eosinofil yang terdapat sepanjang saluran cerna, kulit dan saluran nafas (Ardinata, 2008). Ikatan antigen dengan IgE yang menyebabkan terjadinya penggabungan silang antar reseptor dapat mengeluarkan mediator yang sudah ada dalam sel (*preformed mediator*) maupun mediator yang terbentuk kemudian (*newly performed mediator*) (Munasir, 2008).

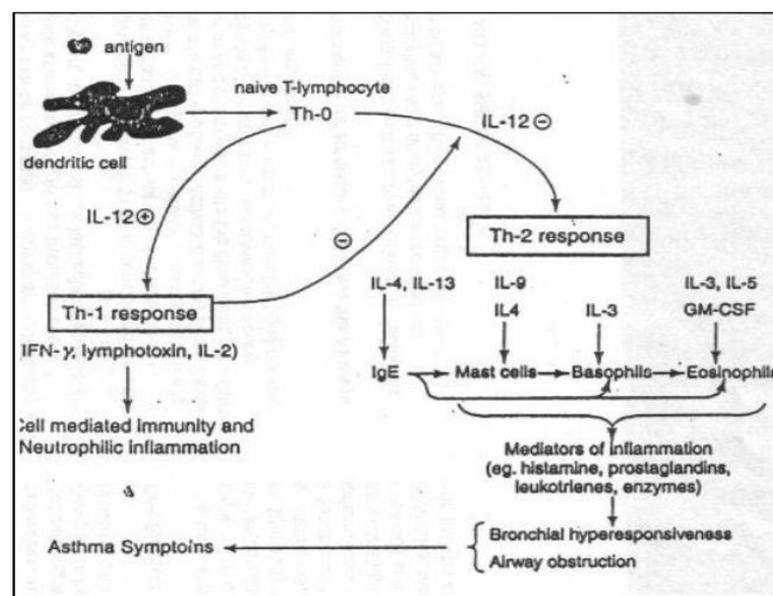
a. Mediator yang sudah ada dalam sel

Ada 3 jenis mediator yang penting yaitu histamin, *eosinophil chemotactic factor of anaphylactic* (ECF-A), dan *neutrophil chemotactic factor* (NCF) (Munasir, 2008).

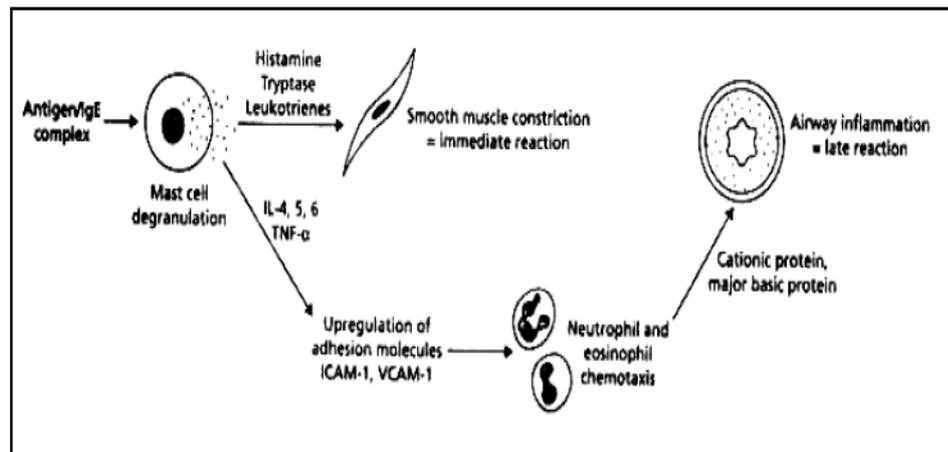
b. Mediator yang terbentuk kemudian

Mediator yang terdiri dari hasil metabolisme serotonin, asam arakidonat, faktor aktivasi trombosit dan lain-lain. Jalur siklooksigenase dan jalur lipoksigenase dari metabolisme asam arakidonat masing-masing mengeluarkan produk yang berperan sebagai mediator berbagai proses inflamasi (Munasir, 2008).

Sel-sel inflamasi seperti eosinofil, basofil, neutrofil dan makrofag akan aktif dan bergerak oleh mediator kimia yang tersekresi dari sel mast, seperti histamin, beserta limfosit T subtype Th2 (GM-CSF, IL-3, dan IL-5), atau dengan monokin seperti IL-1 dan TNF α , melalui pembentukan molekul adhesi yang disebabkan aktivitas sel endotel (Gambar 3) (Gambar 4) (Ardinata, 2008).



Gambar 3. Patogenesis asma (Ardinata, 2008)



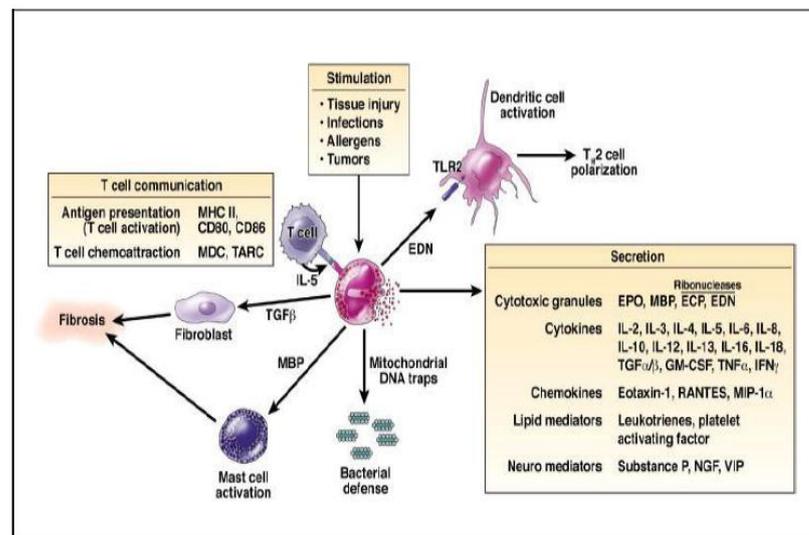
Gambar 4. Reaksi lambat pada asma (Ardinata, 2008)

3. Eosinofil

Eosinofil dibentuk dari sel induk yang sama dengan neutrofil dan basofil. Sel ini merupakan granulosit yang berasal dari sumsum tulang yang afinitasnya kuat terhadap pewarna eosin. Eosinofil memiliki usia yang relatif pendek, dengan maturasi pada sumsum tulang berlangsung selama 2-6 hari, dalam sirkulasi 6-12 jam dan dalam jaringan selama beberapa hari. Jumlah eosinofil darah yang bersirkulasi sangat kecil dari total simpanan eosinofil tubuh, hanya mencapai 1-3% dari leukosit yang bersirkulasi. Eosinofil yang bersirkulasi pada sumsum tulang diperkirakan sekitar 200 matur dan pada jaringan konektif di seluruh tubuh diketahui ada sekitar 500 eosinofil (Terr, 2001).

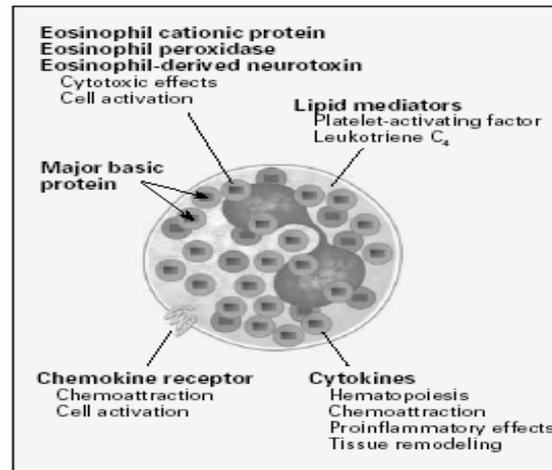
Eosinofil akan nampak dalam jumlah besar pada daerah inflamasi. Eosinofil memiliki peranan dalam sistem regulasi yang memediasi respon inflamasi. Aktivasi eosinofil diikuti oleh kondisi inflamasi seperti asma bronkial, dermatitis atopik, rinitis, konjungtivitis alergi, infeksi bakteri dan

penyakit autoimun (Kelly, 1999). Aktivasi eosinofil menyebabkan terjadinya perubahan morfologi dan fungsi eosinofil, dan disebut sebagai *hypodense*. Eosinofil akan menanggapi beragam rangsangan seperti cedera non spesifik jaringan, infeksi, alergi dan tumor. Eosinofil memproduksi berbagai sitokin, kemokin, mediator lipid, dan neuromodulator (Gambar 5) (Rothenberg, 2009).



Gambar 5. Efek dari eosinofil (Rothenberg, 2009)

Mediator toksin inflamatori yang dihasilkan oleh eosinofil disimpan dalam granul-granul yang kemudian akan disintesis setelah sel ini teraktivasi. Granul eosinofil mengandung kristaloid dan matrix yang masing-masing terdiri dari *Major Basic Protein* (MBP) dan *Eosinophil Cationic Protein* (ECP), peroxidase eosinofil dan *Eosinophil Derived Neurotoxin* (EDN) yang mengandung efek sitotoksin pada epitelium respiratori. Granul eosinofil menyimpan berbagai sitokin dan mediator lipid yang dihasilkan setelah sel ini teraktivasi, diantaranya rantes, eotaxin dan *platelet activating factor* yang berperan mempercepat migrasi eosinofil (Gambar 6) (Ardinata, 2008).



Gambar 6. Gambaran fisiologi eosinofil (Ardinata, 2008)

a. *Major Basic Protein (MBP)* :

Protein yang terdapat pada bagian inti granula ini, ditemukan pada basofil, mastosit, tetapi tidak ditemukan pada sel plasma, limfosit, atau neutrofil. Diketahui dapat menginduksi pelepasan histamin dari basofil dan mastosit.

b. *Eosinophil Cationic Protein (ECP)* :

Merupakan helmintoksin dan neurotoksin yang poten, dapat meningkatkan aktivasi *urokinase-induced plasminogen*, memperpendek waktu koagulasi plasma, dan dapat menghambat proliferasi limfosit.

c. *Eosinophil-derived Neurotoxin (EDN)* :

Merupakan neurotoksin poten yang mempunyai aktivitas ribonuklease dan dapat merusak neuron bermielin. Susunan asam amino terminalnya menyerupai ECP (Thomas *et al.*, 2000).

4. Ovalbumin

Pada penelitian ini, hewan uji akan diinduksi suatu protein yaitu ovalbumin. Ovalbumin ini akan memberikan efek alergi pada hewan uji model asma. Setelah hewan uji terinduksi ovalbumin, akan dilanjutkan dengan pemberian senyawa aktif dari ekstrak *Aegle marmelos* yang diduga memiliki efek antialergi dengan menghambat migrasi eosinofil. Hal ini dapat mengurangi proses inflamasi pada keadaan asma alergi. Untuk memastikan efek senyawa aktif dari ekstrak korteks *Aegle marmelos*, pada akhir penelitian akan dilakukan perhitungan granula eosinofil trakhea secara *in vivo*. Eosinofil merupakan sel inflamasi yang teraktivasi apabila terjadi pelepasan mediator kimia yang disebabkan oleh alergen.

Ovalbumin adalah komponen utama dari putih telur, secara struktural adalah serpin (sejenis protein) (Huntington, 2001). Ovalbumin memiliki berat molekul 43 hingga 45 kD dan merupakan fosfoglikoprotein monomer yang bersifat asam pada titik isoelektrik (Dekker, 1999). Ovalbumin akan meningkatkan sel limfosit CD⁴⁺ Th2 untuk mensekresikan interleukin yang akan meningkatkan tingkat inflamasi. Sensitisasi dengan menggunakan ovalbumin memiliki peran dalam peningkatan IgE secara spesifik (Diding *et al.* Cit. Diding, 2007).

5. Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan komponen kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan menggunakan pelarut cair. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat. Metode ekstraksi dapat dilakukan dengan beberapa cara diantaranya maserasi, perkolasi, refluks, sokletasi, digesti, infus, dekok dan destilasi uap (Ditjen POM, 2000).

Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia yang paling sederhana, menggunakan pelarut yang cocok dengan beberapa kali pengadukan pada temperatur ruangan (kamar) dan terlindung dari cahaya. Maserasi digunakan untuk menyari simplisia yang mengandung komponen kimia yang mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengandung benzoin, tiraks dan lilin (Ditjen POM, 2000).

Prinsip dari metode ini adalah cairan penyari akan masuk ke dalam sel melewati dinding sel. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan di luar sel. Larutan yang konsentrasinya tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh cairan penyari dengan konsentrasi rendah (proses difusi). Peristiwa tersebut berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Selama proses maserasi dilakukan pengadukan dan penggantian cairan penyari setiap hari. Endapan yang diperoleh dipisahkan dan filtratnya dipekatkan (Sudjadi, 1986). Dalam situasi seperti ini, cairan penyari yang dapat digunakan untuk

senyawa kimia yang diminati dapat diperoleh dari pustaka. Hal ini diikuti dengan uji kimia atau kromatografik yang sesuai untuk kelompok senyawa kimia tertentu.

6. Kromatografi Lapis Tipis dan Densitometri

Kromatografi lapis tipis (KLT) mulai dikembangkan pada tahun 1938 oleh Izmailoff dan Schraiber. KLT merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Fase diam pada kromatografi lapis tipis berupa lapisan seragam (*uniform*) pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat plastik atau pelat aluminium. Fase gerak atau yang lebih dikenal sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik (*ascending*), atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (*descending*) (Rohman dan Gandjar, 2007).

Dalam KLT, fase diam yang digunakan berupa penyerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensinya dan resolusinya. Umumnya fase diam yang digunakan untuk mekanisme sorpsi misal dalam penggunaan asam amino, alkaloid atau hidrokarbon adalah KLT sil GF 254. "Sil" berarti produk yang mengandung silika gel seperti Anasil dari pabrik Analabs. "G" berarti pengikat (lapisan halus) gypsum ($\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$). "F" berarti ditambah bahan yang berfluoresensi seperti seng silikat teraktivasi mangan.

“254” berarti digunakan untuk menunjukkan panjang gelombang eksitasi senyawa berfosforisensi yang ditambahkan (Rohman dan Gandjar, 2007).

Keuntungan kromatografi lapis tipis adalah dapat memisahkan senyawa yang sangat berbeda seperti senyawa organik alam dan senyawa organik sintesis, kompleks organik dan anorganik serta ion anorganik dalam waktu singkat menggunakan alat yang tidak terlalu mahal. Metode ini kepekaannya cukup tinggi dengan jumlah cuplikan beberapa mikrogram. Kelebihan metode ini jika dibandingkan dengan kromatografi kertas adalah dapat digunakan pereaksi asam sulfat pekat yang bersifat korosif, kelemahannya adalah harga R_f yang tidak tetap (Gritten, *et al.*, 1991).

Pada perkembangan metode Kromatografi saat ini pemakaian “*Thin Layer Chromato Scanner*” yang lebih dikenal dengan nama densitometer makin banyak dipakai secara luas oleh peneliti. Densitometri adalah metode analisis instrumental yang berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit yang merupakan bercak atau noda pada lempeng KLT. Penetapan kadar dengan menggunakan kombinasi KLT dan Densitometri cukup ekonomis karena menggunakan fase gerak yang sedikit, waktu yang relatif singkat dan dapat dilakukan penetapan kadar beberapa sampel secara simultan (Yuangsoi *et al.*, 2008).

B. KERANGKA KONSEP

Bila suatu protein asing (antigen) berulang kali masuk ke dalam tubuh seorang yang berbakat hipersensitif, maka limfosit B akan membentuk antibodi dari tipe IgE. IgE atau disebut juga regain, akan terikat pada membran sel mast

tanpa menimbulkan gejala. Apabila kemudian antigen (alergen) yang sama rumus bangunnya memasuki tubuh lagi, maka IgE akan mengenali dan mengikat padanya. Akibatnya membran sel mast akan pecah (degranulasi sel mast).

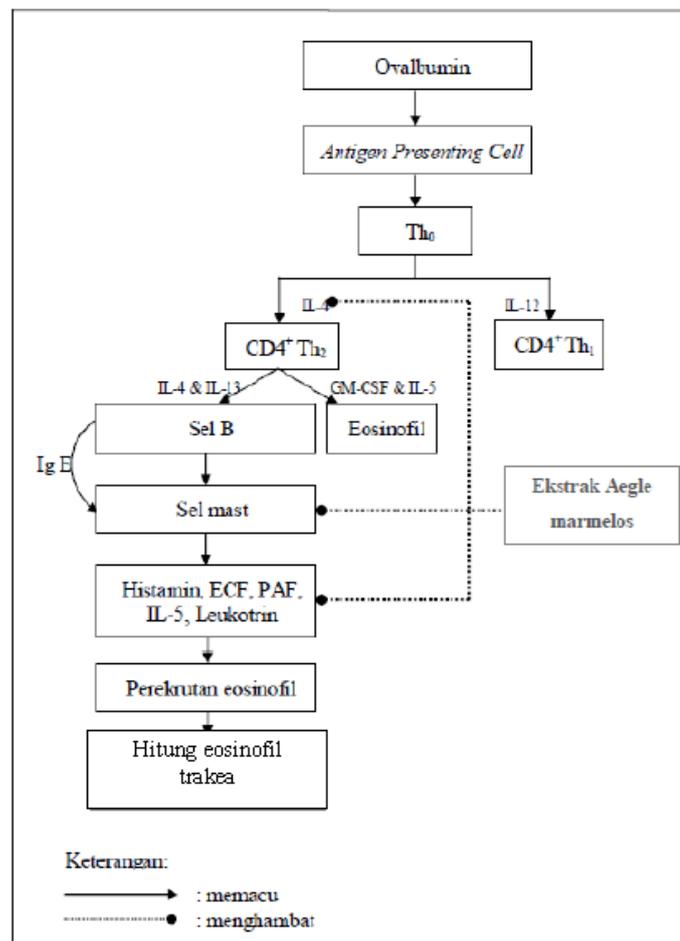
Hal ini menyebabkan suatu reaksi alergi karena sejumlah zat perantara (mediator) dilepaskan, yakni histamin, serotonin, bradikinin dan asam arakhidonat, yang kemudian diubah menjadi prostaglandin dan leukotrien. Zat-zat itu akan menarik makrofag dan eosinofil ke tempat infeksi untuk memusnahkan alergen. Mediator tersebut secara langsung atau melalui saraf otonom menimbulkan bermacam-macam penyakit seperti asma, rhinitis alergi dan eksim.

Korteks Maja (*Aegle marmelos* Correa) memiliki kandungan senyawa yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai antialergi, senyawa tersebut diantaranya seperti aegelin, skimianin, marmesin, lupenon, lupeol, dan marmin. Marmin dilaporkan mampu menghambat pelepasan histamin dari kultur sel RBL-2H3 melalui penghambatan Ca^{2+} uptake secara *in vitro*.

Aegelin yang merupakan turunan senyawa alkaloid mampu melakukan penekanan pada pelepasan histamin. Lupeol dan lupen-on yang merupakan turunan senyawa steroid ini juga berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen antialergi karena kemampuannya dalam menghambat pelepasan mediator dari kultur sel mast.

Melalui mekanisme aksi efek penghambatan degranulasi sel mast melalui kultur sel RBL-2H3 diduga berpengaruh pada terhambatnya migrasi sel-sel inflamasi, seperti eosinofil. Adanya mekanisme antialergi yang prospektif ini sangat memungkinkan untuk mengembangkan *Aegle marmelos* pada uji *in vivo*.

Pentingnya dilakukan uji *in vivo* karena meskipun uji *in vitro* menunjukkan hasil positif, belum tentu bisa mendapatkan hasil optimal pada uji *in vivo*. Ada banyak faktor yang berpengaruh, diantaranya adalah faktor biofarmasetik senyawa aktif, adanya metabolisme enzimatik dan adanya transformasi intrinsik di dalam hewan uji. Sehingga khasiat obat, dalam hal ini *Aegle marmelos*, perlu diteliti sampai taraf *in vivo*.



Gambar 7. Skema kerangka konsep

C. HIPOTESIS

Berdasarkan landasan teori diatas, dibuat suatu hipotesis, yaitu ekstrak korteks dari *Aegle marmelos* Correa memiliki kandungan senyawa seperti kumarin, alkaloid dan steroid, yang dengan dosis optimalnya memiliki aktivitas sebagai antialergi dengan melalui aksi menghambat migrasi eosinofil trakhea secara *in vivo*.