

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

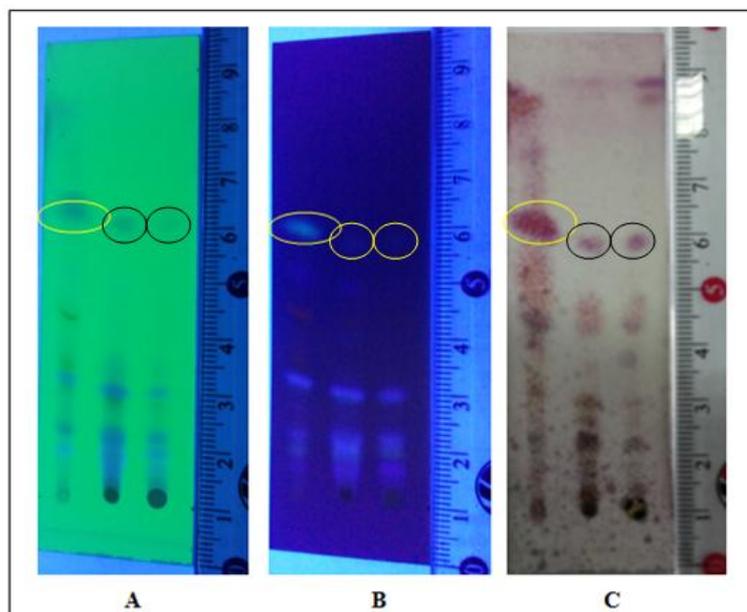
#### A. Ekstraksi Korteks *Aegle marmelos*

Identifikasi tumbuhan yang telah dilakukan di Laboratorium Farmakognosi Universitas Gadjah Mada (UGM) menunjukkan nama spesies dari tumbuhan ini adalah *Aegle marmelos* Correa. Pengeringan korteks menggunakan oven yang dimaksudkan untuk mengurangi kadar air, menghentikan reaksi enzimatik, mencegah tumbuhnya jamur dan mencegah rusaknya komposisi senyawa metabolit yang ada di dalam korteks. Pada penelitian ini dilakukan proses ekstraksi untuk menarik zat aktif dari korteks *Aegle marmelos*. Dari hasil maserasi 1250 g serbuk kering korteks *Aegle marmelos* dengan menggunakan pelarut etanol 96% (1 : 4) didapatkan 5780 ml ekstrak cair *Aegle marmelos*. Untuk mendapatkan ekstrak yang pekat dilakukan penguapan diatas tangas air pada suhu 95°C, sehingga didapatkan ekstrak kental 48,246 gram.

#### B. Analisis Kualitatif Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Prosedur uji dengan KLT dilakukan untuk memastikan adanya zat aktif seperti yang dilaporkan penelitian sebelumnya. Karena berfungsi sebagai penegasan, maka uji KLT hanya dilakukan untuk golongan-golongan senyawa yang pernah dilaporkan penelitian sebelumnya (alkaloid, steroid dan kumarin).

## a. Uji Kumarin



**Gambar 12.** Profil kromatogram identifikasi senyawa kumarin

Keterangan :

Titik penotolan: fraksi heksana (1), fraksi kloroform (2), pelarut etanol (3)

A : Identifikasi kumarin pada  $\lambda$  254 nm

B : Identifikasi kumarin pada  $\lambda$  366 nm

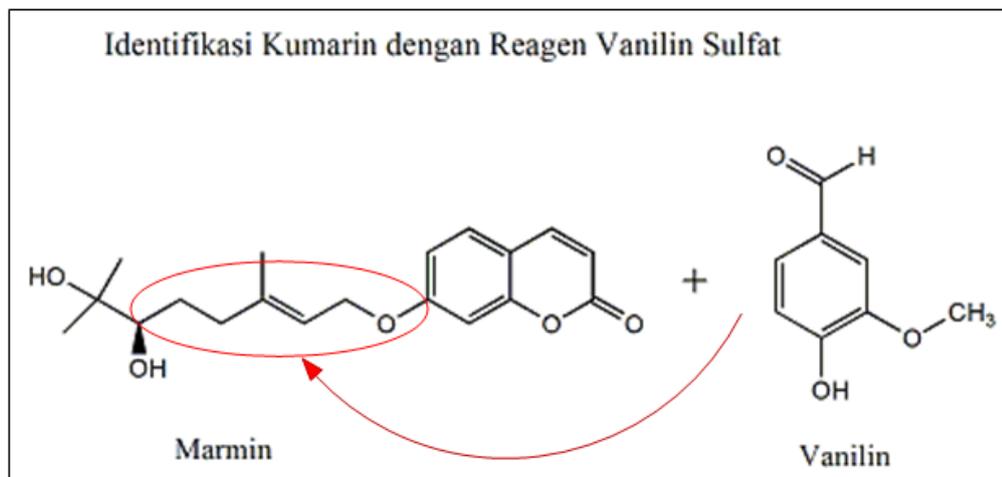
C : Identifikasi kumarin menggunakan reagen Vanilin Sulfat

Hasil deteksi dengan menggunakan lampu UV, pada plat KLT diketahui kumarin positif terdapat pada 3 titik penotolan karena terlihat adanya bercak yang memiliki nilai Rf berturut-turut adalah 0,70; 0,66 dan 0,66 meredam di bawah sinar UV 254 nm dan berpendar pada UV 366 nm (Munawaroh *et al.*, 2013). Pemendaran bercak kumarin ini lebih dominan pada fraksi heksana 1 (fh1).

**Tabel 1.** Uji Kumarin

Ekstrak korteks <i>Aegle marmelos</i>				
n-heksana : etil asetat (4:1)	Sebelum Penyemprotan Vanilin Sulfat		Sesudah Penyemprotan Vanilin Sulfat	Nilai Rf
	UV 254	UV 366		
Fraksi Heksana	(+) meredam	(+) berpendar	(+) berpendar merah ungu	0,70
Fraksi Kloroform	(+) meredam	(+) berpendar	(+) berpendar merah ungu	0,66
Pelarut Etanol	(+) meredam	(+) berpendar	(+) berpendar merah ungu	0,66

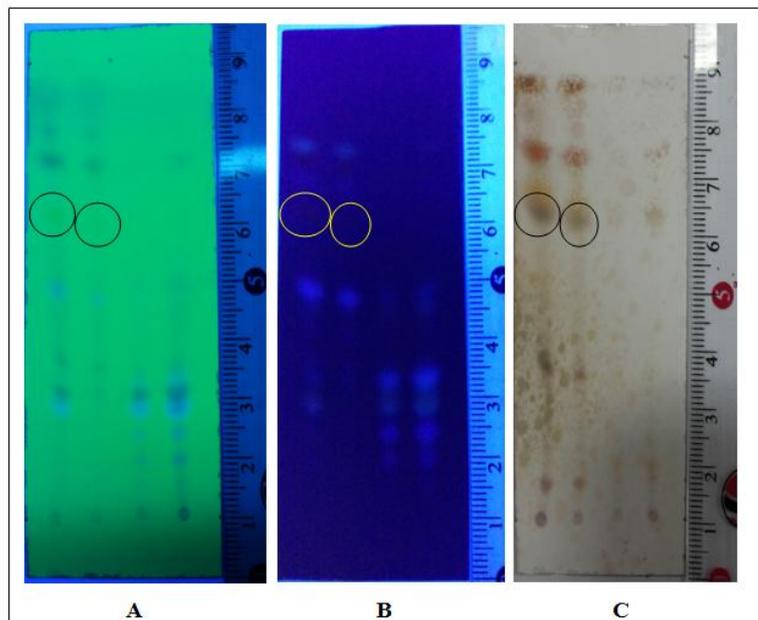
Menyemprot plat KLT dengan reagen vanillin sulfat adalah cara untuk mendeteksi bercak secara kimiawi dengan bereaksi secara kimia dengan seluruh solut yang mengandung gugus fungsional tertentu sehingga bercak menjadi berwarna (Rohman dan Gandjar, 2007). Setelah dilakukan penyemprotan plat KLT dipanaskan hingga bercak menimbulkan warna secara visual. Terjadi pemendaran bercak berwarna merah ungu pada sinar tampak yang memiliki nilai Rf berturut-turut adalah 0,7; 0,66 dan 0,66. Fraksi heksana memiliki bercak yang lebih berpendar dari fraksi kloroform dan ekstrak yang dilarutkan dengan etanol (Tabel 1).



**Gambar 13.** Mekanisme reaksi kumin dengan reagen Vanilin Sulfat

Hasil penyemprotan plat KLT dengan reagen vanilin sulfat menunjukkan adanya senyawa golongan kumin yang diduga adalah marmin, dengan membandingkan perubahan warna yang terjadi dengan pustaka yang ada. Gambar 13, memperlihatkan bahwa timbulnya warna tersebut disebabkan adanya gugus vanilin yang menempel di antara cincin nomor 3 sampai cincin nomor 8 dari struktur marmin. Reaksi tersebut mengakibatkan terbentuknya kromofor. Kromofor adalah suatu gugus fungsi yang menyebabkan terjadinya warna pada suatu senyawa (Fessenden dan Fessenden, 1986). Kromofor ini yang nantinya akan menghasilkan warna merah ungu.

## b. Uji steroid



**Gambar 14.** Profil kromatogram identifikasi senyawa steroid

Keterangan :

Titik penotolan: fraksi heksana 1 (1), fraksi heksana 2 (2), fraksi kloroform (3), fraksi kloroform (4)

A : Identifikasi steroid pada  $\lambda$  254 nm

B : Identifikasi steroid pada  $\lambda$  366 nm

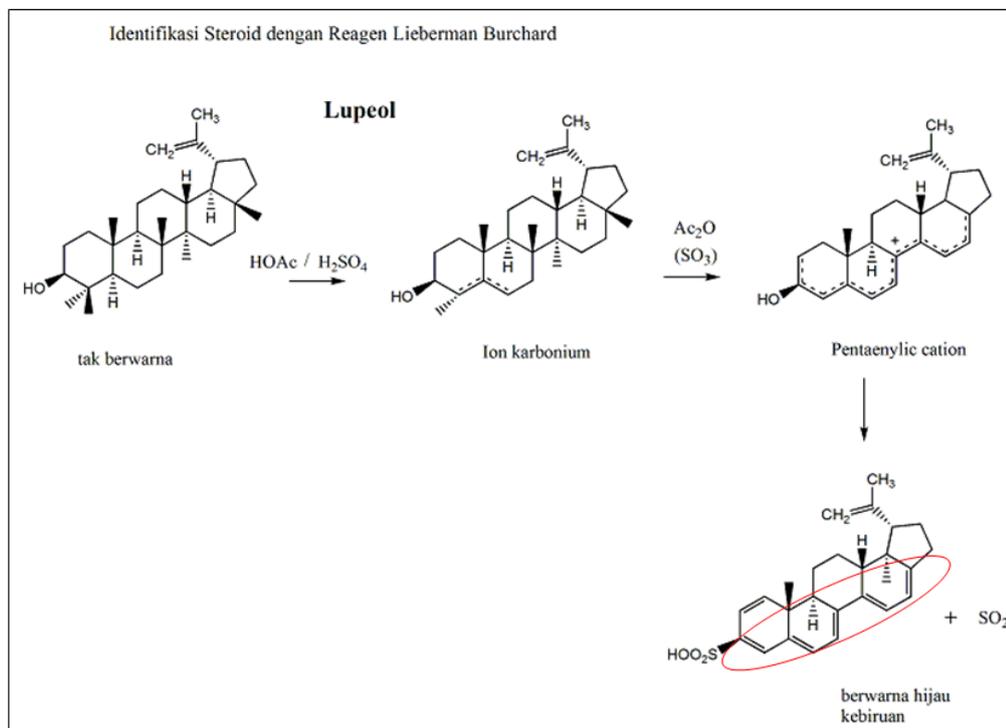
C : Identifikasi steroid menggunakan reagen Liebermann Burchard

Pada plat KLT diketahui steroid terdeteksi positif dengan nilai  $R_f$  0,70 pada fraksi heksana 1 (penotolan 1) dan  $R_f$  0,68 pada fraksi heksana 2 (penotolan 2), sedangkan pada fraksi kloroform (penotolan 3 dan 4) terdeteksi adanya senyawa alkaloid dengan nilai  $R_f$  0,22. Dibawah sinar UV 254 penotolan 1 dan 2 terdeteksi bercak yang tidak meredam dengan nilai  $R_f$  0,70 dan  $R_f$  0,68 yang menurut Rohman (2009) kemungkinan bercak tersebut merupakan senyawa golongan steroid. Hal ini dapat dibuktikan dengan deteksi kimia lebih lanjut.

**Tabel 2.** Uji Steroid

Ekstrak korteks <i>Aegle marmelos</i>				
n-heksana : etil asetat (4:2)	Sebelum Penyemprotan Lieberman Burchard		Sesudah Penyemprotan Lieberman Burchard	Nilai Rf
	UV 254	UV 366		
Fraksi Heksana 1	(+) tidak meredam	(+) meredam	(+) hijau kebiruan	0,70
Fraksi Heksana 2	(+) tidak meredam	(+) meredam	(+) hijau kebiruan	0,68
Fraksi Kloroform 3 totalan	-	-	-	-
Fraksi Kloroform 4 totalan	-	-	-	-

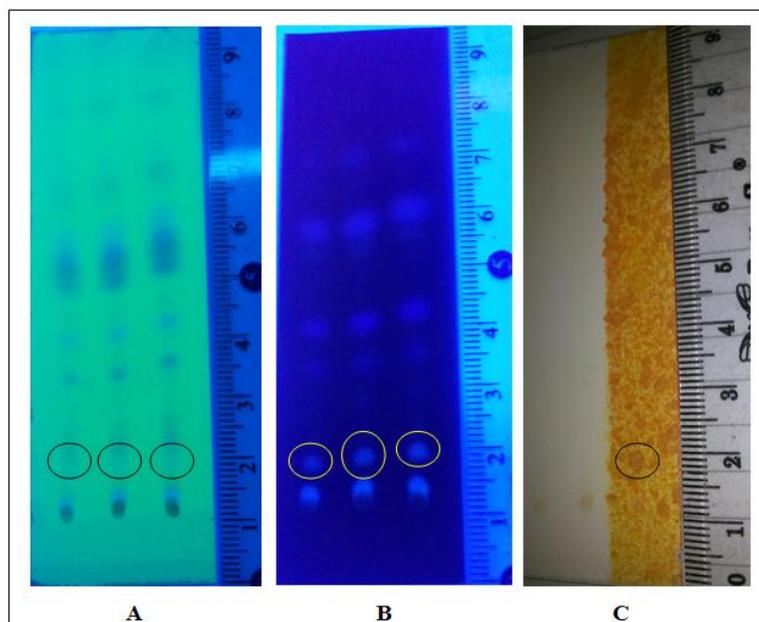
Plat KLT yang telah diberi penyemprotan reagen Lieberman Burchard dipanaskan hingga terlihat bercak dengan warna yang signifikan. Reagen Lieberman Burchard (asam sulfat pekat dan anhidrida asetat) akan memberikan warna hijau-biru jika direaksikan dengan steroid (Mulyani *et al.*, 2013). Dari hasil penyemprotan reagen ini dapat terlihat pada Rf 0,70 untuk penotolan 1 dan Rf 0.68 untuk penotolan 2 terdapat bercak berwarna hijau kebiruan yang menurut sumber di atas, bercak tersebut merupakan golongan senyawa steroid (Tabel 2). Sedangkan pada penotolan 3 dan 4 terdapat bercak pada Rf 0,22 yang menandakan adanya senyawa alkaloid yang apabila direaksikan dengan reagen Lieberman Burchard terbentuk warna coklat kehitaman (Wullur *et al.*, 2013).



**Gambar 15.** Mekanisme reaksi steroid dengan reagen Lieberman Burchard

Pada reaksi ini (Gambar 15) terlihat bahwa adanya interaksi antara senyawa steroid (lupeol) dengan reagen Lieberman Burchard ( $H_2SO_4$  dan anhidrida asetat) yang mengakibatkan perubahan struktur kimia dari lupeol yang semula tak berwarna menjadi berwarna hijau kebiruan. Perubahan diawali dari perginya gugus hidrogen dengan membawa pasangan elektron sehingga terbentuklah ion karbonium. Kemudian anhidrida asetat ( $Ac_2O$ ) akan menyerang atom karbon pada gugus benzen yang mengikat atom hidrogen, menyebabkan terusirnya hidrogen sehingga terbentuklah *enylic cation*. Selanjutnya asam sulfat yang memiliki pasangan elektron bebas akan meningkatkan stabilitas dari masing-masing ion karbonium melalui pembentukan ikatan baru dengan karbon. Hal ini menyebabkan pembentukan gugus kromofor yang memberi warna pada senyawa lupeol.

## c. Uji alkaloid



**Gambar 16.** Profil kromatogram identifikasi senyawa alkaloid

Keterangan :

Titik penotolan: fraksi kloroform 2x (1), fraksi kloroform 3x (2), fraksi kloroform 4x (3)

A : Identifikasi alkaloid pada  $\lambda$  254 nm

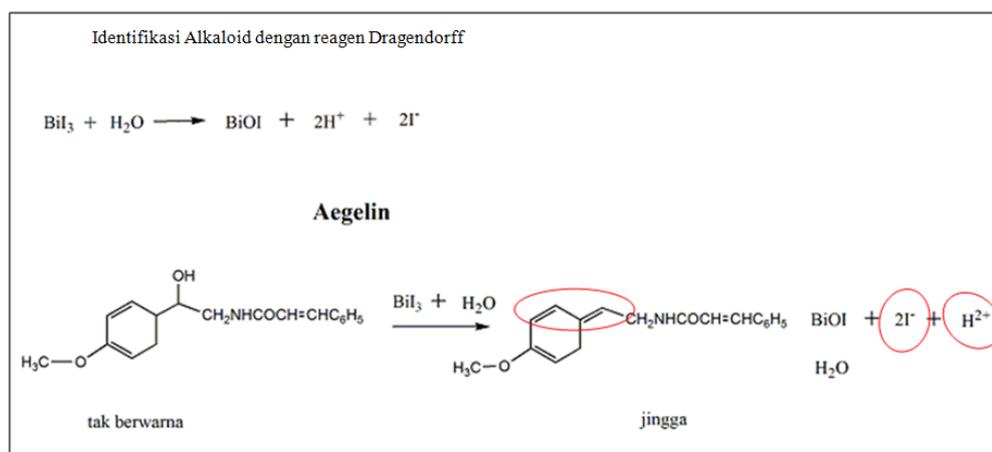
B : Identifikasi alkaloid pada  $\lambda$  366 nm

C : Identifikasi alkaloid menggunakan reagen Dragendorff

**Tabel 3.** Uji Alkaloid

Ekstrak korteks <i>Aegle marmelos</i>				
Toluene : eter : dietil eter (55:33:10)	Sebelum Penyemprotan Dragendorff		Sesudah Penyemprotan Dragendorff	Nilai Rf
	UV 254	UV 366		
Fraksi Kloroform 2 totalan	(+) meredam	(+) berflouresensi biru	(+) Jingga coklat	0,22
Fraksi Kloroform 3 totalan	(+) meredam	(+) berflouresensi biru	(+) Jingga coklat	0,22
Fraksi Kloroform 4 totalan	(+) meredam	(+) berflouresensi biru	(+) Jingga coklat	0,22

Pengamatan pada UV 254 nm lempeng berfluoresensi dan bercak tampak meredam. Sedangkan pengamatan pada UV 366 nm bercak berfluoresensi biru. Hasil setelah dilihat di bawah sinar UV 254 nm noda atau bercak tidak tampak dikarenakan tidak semua bercak yang menandakan adanya senyawa alkaloid dapat dilihat dengan UV 254 nm, oleh karena itu lempeng disemprot dengan pereaksi Dragendorff untuk menampakkan noda atau bercaknya. Setelah dilakukan penyemprotan terdeteksi noda atau bercak dengan warna jingga kecoklatan pada Rf 0,22 yang menandakan sampel positif alkaloid (Tabel 3). Nilai Rf 0,22 termasuk dalam kisaran 12 alkaloid yang paling umum yaitu 0,17 – 0,62 (Harbone, 1987).



**Gambar 17.** Mekanisme reaksi alkaloid dengan reagen Dragendorff

Perubahan warna yang terjadi pada reaksi alkaloid yang diduga adalah aegelin ini disebabkan karena penguraian komponen pada bismuth iodida yang berinteraksi dengan struktur aegelin sehingga menimbulkan rantai terkonjugasi C = C. Adanya hidrogen bebas ini merubah suasana menjadi asam, yang mengakibatkan perubahan warna pada sistem kromofor menjadi warna yang lebih kuat (Fessenden dan Fessenden, 1986).

### C. Analisis Kualitatif Densitometri

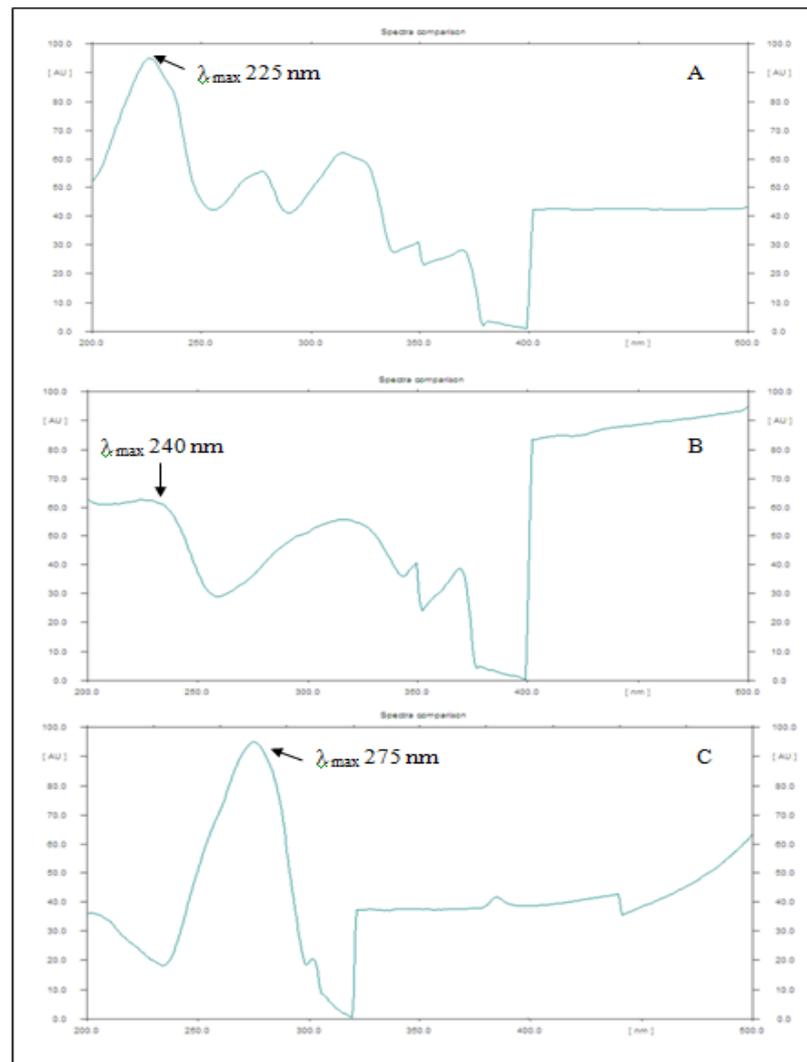
Analisis densitometri dilakukan untuk mengevaluasi absorbansi panjang gelombang analit berupa bercak pada kromatografi lapis tipis. Bercak dipindai dengan sumber sinar dalam bentuk celah (split) yang dapat dipilih baik panjangnya maupun lebarnya. Cahaya (fotosensor) akan mengukur sinar yang dipantulkan (Rohman, 2009). Senyawa tanpa warna diukur pada jangka 200 sampai 400 nm, senyawa berwarna pada jangka 200 sampai 700 nm (Harborne, 1987). Pengukuran pemindaian absorbansi panjang gelombang akan direkam dalam satuan nanometer (nm). Hasil pemindaian disajikan pada gambar 18.

Pemindaian densitometri pada identifikasi kumarin (A) dilakukan pada jangka 200 nm sampai 400 nm karena kumarin merupakan senyawa tanpa warna. Pemindaian dilakukan dengan menganalisis bercak analit fraksi heksana (ekstrak+heksana) yang menggunakan fase gerak n-heksana : etil asetat (4:1) menghasilkan absorbansi panjang gelombang maksima ( $\lambda_{maks}$ ) 225 nm. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak *Aegle marmelos* mengandung senyawa kumarin, karena menurut Harborne (1987)  $\lambda_{maks}$  kumarin antara 212 nm sampai 282 nm.

Pemindaian dilanjutkan dengan menganalisis steroid (lupeol dan lupenon) pada bercak analit fraksi heksana (ekstrak+heksana) dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (4:1). Hasil pada gambar B menunjukkan adanya puncak serapan pada panjang gelombang ( $\lambda_{maks}$ ) 240 nm. Panjang gelombang tersebut membuktikan adanya senyawa steroid dalam n-heksana yang memiliki panjang gelombang maksimal  $\pm 242$  nm (Hernawati, 2009).

Berdasarkan bercak analit pada fraksi kloroform (ekstrak + kloroform) dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (4:1) adanya puncak serapan pada panjang gelombang ( $\lambda_{\text{maks}}$ ) 275 nm (gambar C). Hasil ini menunjukkan adanya senyawa alkaloid yang memiliki rentang panjang gelombang maksimal antara 228 nm sampai 330 nm (Harborne, 1987).

Pernyataan di atas menunjukkan bahwa serapan panjang gelombang mempunyai nilai khusus pada setiap senyawa yang terkandung di dalam tumbuhan. Senyawa kumarin, steroid dan alkaloid dapat diidentifikasi dari pemindaian bercak analit pada plat KLT dengan membaca rekam panjang gelombang yang kemudian membandingkannya dengan data pustaka. Dari hasil analisis metode densitometri dan pereaksi semprot dapat dipastikan bahwa ekstrak *Aegle marmelos* yang digunakan memiliki senyawa seperti kumarin, steroid dan alkaloid yang diduga berpotensi sebagai antialergi dengan cara menghambat migrasi eosinofil trakhea.



**Gambar 18.** Profil panjang gelombang senyawa *Aegle marmelos*

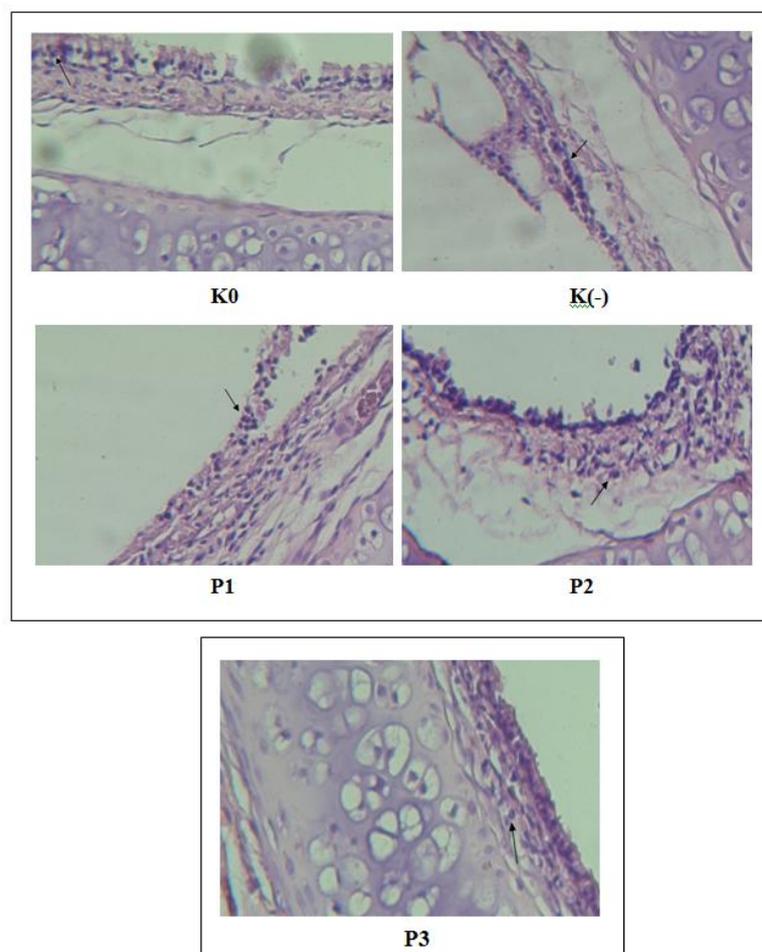
Keterangan :

- A : Identifikasi  $\lambda_{maks}$  kumarin pada bercak analit fraksi heksana (ekstrak + heksana) dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (4:1).  $\lambda_{maks}$  225 nm.
- B : Identifikasi  $\lambda_{maks}$  steroid pada bercak analit fraksi heksana (ekstrak + heksana) dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (4:1).  $\lambda_{maks}$  240 nm.
- C : Identifikasi  $\lambda_{maks}$  alkaloid pada bercak analit fraksi kloroform (ekstrak + kloroform) dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (4:1).  $\lambda_{maks}$  275 nm.

#### D. Hitung Eosinofil Trakhea

Preparat trakhea tikus wistar yang telah diolah dan telah dilakukan pengecatan HE masing-masing kelompok diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 10 x 40 dalam 3 lapang pandang dan dihitung jumlah eosinofil trakhea tikus wistar.

Hasil pengamatan preparat diperlihatkan pada gambar berikut :



**Gambar 19.** Penampang melintang trakea (perbesaran 400x) tiap kelompok

Keterangan :

K0 : Kelompok Kontrol nol

K(-) : Kelompok OVA

P1 : Kelompok Ekstrak *Aegle marmelos* 125 mg/KgBB/hari

P2 : Kelompok Ekstrak *Aegle marmelos* 250 mg/KgBB/hari

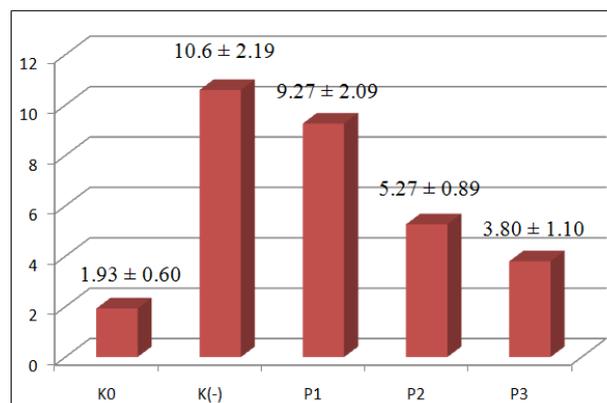
P3 : Kelompok Ekstrak *Aegle marmelos* 500 mg/KgBB/hari

Setelah dilakukan penelitian hitung eosinofil trakhea pada tikus wistar didapatkan peningkatan rata-rata hitung eosinofil pada kelompok OVA. Pemberian kelompok ekstrak korteks *Aegle marmelos* menurunkan hitung eosinofil trakhea. Data jumlah eosinofil trakhea disajikan pada tabel 4.

**Tabel 4.** Rata – rata hitung eosinofil trakhea (sel/3 LP) pada tikus wistar

Kelompok	n	Rata – rata $\pm$ SD	% migrasi eosinofil trakhea
K0	5	1.93 $\pm$ 0.60	
K(-)	5	10.6 $\pm$ 2.19	100 %
P1	5	9.27 $\pm$ 2.09	84.6 %
P2	5	5.27 $\pm$ 0.89	38.5 %
P3	5	3.80 $\pm$ 1.10	21.5 %

Histogram rata – rata hitung eosinofil trakhea tikus wistar pada tiap kelompok perlakuan.



**Gambar 20.** Histogram hitung eosinofil tiap kelompok perlakuan

Keterangan :

Data disajikan dengan 5x replikasi (3 lapang pandang pada tiap replikasi)

Mean :  $\bar{x} \pm SD$

K0 : Kelompok Kontrol nol

K(-) : Kelompok OVA

P1 : Kelompok Ekstrak *Aegle marmelos* 125 mg/KgBB/hari

P2 : Kelompok Ekstrak *Aegle marmelos* 250 mg/KgBB/hari

P3 : Kelompok Ekstrak *Aegle marmelos* 500 mg/KgBB/hari

## E. Analisis Statistik

Data yang diperoleh kemudian diuji menggunakan *software* program SPSS *for Windows Release* 16.0. Perhitungan menggunakan uji *One way ANOVA* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rerata lebih dari dua kelompok. Sebelum menggunakan uji *ANOVA*, dilakukan uji kenormalan distribusi data terlebih dahulu.

Macam alat uji kenormalan distribusi data yang digunakan adalah Shapiro-Wilk. Shapiro Wilk adalah metode analitik yang digunakan untuk sampel yang sedikit ( $< 50$ ). Data Sig. (Lampiran 6.1) menunjukkan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas di atas 0.05, maka dapat dikatakan distribusi eosinofil/LPB pada masing – masing kelompok adalah normal.

Setelah diketahui bahwa data terdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan melakukan uji *ANOVA*. Data (Lampiran 6.2) menggambarkan ringkasan statistik dari 5 kelompok. Pada K0, rerata jumlah eosinofil trakhea adalah 1.93, dengan jumlah minimum 1.33 dan maksimum 2.67, dengan tingkat kepercayaan 95% atau signifikansi 5% rerata jumlah eosinofil trakhea ada pada range 1.18 sampai 2.67.

Pada K(-), rerata jumlah eosinofil trakhea adalah 10.6, dengan jumlah minimum 8.67 dan maksimum 14, dengan tingkat kepercayaan 95% atau signifikansi 5% rerata jumlah eosinofil trakhea ada pada range 7.88 sampai 13.32. Pada P1, rerata jumlah eosinofil trakhea adalah 9.26, dengan jumlah minimum 7.33 dan maksimum 12.67, dengan tingkat kepercayaan 95% atau signifikansi 5% rerata jumlah eosinofil trakhea ada pada range 6.67 sampai 11.86.

Pada P2, rerata jumlah eosinofil trakhea adalah 5.26, dengan jumlah minimum 4.33 dan maksimum 6.67, dengan tingkat kepercayaan 95% atau signifikansi 5% rerata jumlah eosinofil trakhea ada pada range 4.15 sampai 6.37. Pada P3, rerata jumlah eosinofil trakhea adalah 3.79, dengan jumlah minimum 2.33 dan maksimum 5, dengan tingkat kepercayaan 95% atau signifikansi 5% rerata jumlah eosinofil trakhea ada pada range 2.43 sampai 5.15.

Analisis ini (Lampiran 6.3) bertujuan untuk menguji berlaku tidaknya asumsi untuk *ANOVA*, yaitu apakah kelima sampel mempunyai varians yang sama. Hipotesis :  $H_0$  = Kelima varians populasi adalah identik dan  $H_1$  = Kelima varians populasi adalah tidak identik. Pengambilan keputusan, jika probabilitas  $> 0.05$ , maka  $H_0$  diterima dan jika probabilitas  $< 0.05$ , maka  $H_0$  ditolak.

Terlihat bahwa Levene T hitung (Lampiran 6.3) adalah 1.616 dengan nilai probabilitas 0.209. oleh karena probabilitas  $> 0.05$ , maka  $H_0$  diterima atau berarti kelima varians adalah sama. Dengan demikian, asumsi kesamaan varians untuk uji *ANOVA* sudah terpenuhi.

Data (Lampiran 6.4) digunakan untuk menguji apakah dari kelima sampel mempunyai rata – rata yang sama. Hipotesis :  $H_0$  = Kelima rata-rata populasi adalah identik dan  $H_1$  = Kelima rata-rata populasi adalah tidak identik. Pengambilan keputusan, jika probabilitas  $> 0.05$ , maka  $H_0$  diterima dan jika probabilitas  $< 0.05$ , maka  $H_0$  ditolak.

Melihat bahwa F hitung adalah 29.106 dengan probabilitas  $0.000 < 0.05$ , maka  $H_0$  ditolak, yang artinya rata – rata jumlah eosinofil trakhea dari masing – masing kelompok tersebut berbeda.

Untuk mengetahui di antara kelima kelompok, mana saja kelompok yang berbeda dan mana saja yang tidak berbeda, hal ini akan dibahas pada analisis Tukey dalam *Post Hoc Test*. Uji signifikansi perbedaan, berdasarkan nilai probabilitas, jika probabilitas  $> 0.05$ , maka  $H_0$  diterima, jika probabilitas  $< 0.05$ , maka  $H_0$  ditolak

*Post Hoc* (Lampiran 6.5) menunjukkan probabilitas dari sebagian besar kelompok  $< 0.05$ , maka  $H_0$  ditolak, berarti perbedaan mean diantara sebagian kelompok tersebut benar – benar nyata (hubungan antar variabel). Hal tersebut juga dapat dilihat dengan adanya tanda (\*) di belakang angka Mean Difference.

Untuk mencari kelompok sampel mana saja yang mempunyai perbedaan rata – rata yang tidak berbeda secara signifikan maka dapat dilihat pada lampiran 6.6.

Data ini (Lampiran 6.6) menunjukkan nilai rata – rata yang terletak dalam satu kolom subsets yang sama tidak memiliki perbedaan yang nyata. Dapat dilihat bahwa antara kelompok K(-) dan P1, P2 dan P3 serta P3 dan K0 menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan.

## **F. Pembahasan**

Asma merupakan kondisi inflamasi kronis di saluran pernafasan yang ditandai dengan terjadinya kesulitan bernafas. Asma memiliki gejala seperti sesak nafas, dada terasa berat dan batuk (Purbaningrum, 2010). Proses inflamasi yang terjadi menimbulkan munculnya sel inflamasi seperti eosinofil. Eosinofil sering dijumpai di sekitar tempat terjadinya reaksi imun yang diperantarai IgE, yang berhubungan dengan alergi (Purbaningrum, 2010). Alergi umumnya disebabkan

oleh benda asing yang biasa disebut alergen. Pada penelitian ini alergen yang digunakan berupa ovalbumin (OVA) yang dipaparkan secara inhalasi. Sel penyaji antigen (APC) akan mengenali alergen untuk selanjutnya mengekspresikan pada sel limfosit T secara langsung atau melalui sitokin.

Pada penelitian ini didapatkan peningkatan jumlah eosinofil trakhea pada kelompok OVA (Gambar 20). Secara statistik didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok K0 dan K(-) ( $p = 0.000$ ) (Lampiran 6.5). Hal ini menandakan pemaparan OVA terhadap tikus wistar berhasil menimbulkan reaksi imun yang diperantarai IgE, sehingga terjadi proses alergi yang menyebabkan munculnya sel inflamasi seperti eosinofil.

Ovalbumin memiliki prevalensi hingga 100% dalam menimbulkan alergi. Ovalbumin yang dipaparkan akan dikenali oleh APCs dan akan didegradasi menjadi peptida-peptida yang kemudian bersama molekul HLA akan dipresentasikan pada sel limfosit T ( $CD^{4+}$ ) yang selanjutnya mendorong limfo-B untuk memproduksi antibodi (IgE), mengaktivasi sel-sel sitotoksik, juga menstimulasi makrofag untuk membentuk sitokinnya (Diding, 2007). Sitokin adalah protein yang berperan utama pada komunikasi antara berbagai bagian dari sistem imun. Terutama dibentuk oleh monosit, makrofag, tetapi juga dapat dibentuk oleh limfosit, granulosit, hepatosit, keratinosit, fibroblast dan sel-sel epitel. Bila sitokin sudah mencapai tujuannya, akan timbul efek biologis tertentu seperti aktivasi, pembiakan dan pemindahan ke tempat lain (Tjay dan Rahardja, 2002), dalam hal ini adalah migrasi eosinofil ke trakhea.

Eosinofil diproduksi oleh sumsum tulang, kemudian setelah 2-6 hari eosinofil yang matang akan meninggalkan sumsum tulang dan berada di sirkulasi darah tepi selama 6 – 12 jam, kemudian akan menuju jaringan selama beberapa hari (Ardinata, 2008). Gambar 19, menunjukkan adanya eosinofil yang menempel pada jaringan trakhea. Eosinofil tersebut akan aktif kembali apabila terjadi pemaparan berulang.

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

Dibandingkan kontrol dari kultur sel RBL-2H3, aegelin yang merupakan turunan senyawa alkaloid dengan konsentrasi 100  $\mu$ M mampu melakukan penekanan pada pelepasan histamin hingga 40% yang diinduksi DNP<sub>24</sub>-BSA dan lebih dari 50% yang diinduksi oleh thapsigargin dan ionomycin (Nugroho *et al.*, 2010).

Lupeol dan lupenon yang merupakan turunan senyawa steroid ini berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen antialergi karena kemampuannya dalam menghambat pelepasan mediator dari kultur sel mast. Pelepasan enzim  $\beta$ -heksosaminidase dari kultur sel RBL-2H3 yang diinduksi secara immunologis dengan antigen DNP<sub>24</sub>-BSA sebesar 35,69% dan 39,19%, dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 59,40  $\mu$ M (lupenol) dan 72,51  $\mu$ M (lupenon) mampu dihambat kedua senyawa ini dengan konsentrasi 100  $\mu$ M (Nugroho, *et al.*, 2010).

Hasil penelitian memperlihatkan ekstrak *Aegle marmelos* dosis 125 mg/KgBB (P1) dapat menurunkan jumlah eosinofil trakhea (Tabel 4) tapi penurunan ini tidak bermakna secara statistik (Lampiran 6.5) ( $p = 0.641$ ) dibandingkan kelompok asma. Sedangkan ekstrak *Aegle marmelos* dosis 250 mg/KgBB (P2) memperlihatkan penurunan jumlah eosinofil trakhea (Tabel 4) dan penurunan ini bermakna secara statistik (Lampiran 6.5) (0.000) dibandingkan kelompok asma.

Penurunan jumlah eosinofil tersebut dimungkinkan akibat adanya kandungan yang dimiliki oleh korteks *Aegle marmelos* seperti kumarin, yang menurut Nugroho *et al.* (2011) memiliki fungsi sebagai antialergi. Efek antialergi ini mampu menghambat degranulasi sel mast, sehingga pelepasan sitokin dan mediator inflamasi seperti histamin, leukotrien dan prostaglandin terhambat yang selanjutnya akan dapat menurunkan jumlah eosinofil trakhea. Selain itu di dalam korteks *Aegle marmelos* terdapat lupen-on dan lupeol yang mampu menghambat pelepasan mediator kimia dari kultur sel mast. Aegelin yang merupakan turunan senyawa alkaloid yang terkandung di dalamnya juga diketahui mempunyai efek antialergi (Nugroho *et al.*, 2010).

Struktur kumarin yaitu atom O yang terikat pada C nomor 7 memiliki peranan dalam menghambat pelepasan berbagai mediator (histamin, enzim  $\beta$ -heksosaminidase, sitokin dan mediator lainnya) pada kultur sel mast *rat basophilic leukemia* (RBL-2H3). Senyawa turunan kumarin, 7-metoksi kumarin dan 7-hidroksi kumarin konsentrasi  $1,0 \times 10^{-4}$  M juga mempunyai kemampuan yang sangat kuat dalam menghambat pelepasan histamin yang diinduksi oleh IgE

pada kultur sel RBL-2H3 dengan persentase efek penghambatan berturut-turut adalah sebesar 98,4% dan 91,7% (Watanabe *et al.*, 2005). Perlu ditekankan bahwa pada penelitian Watanabe (2005), Nugroho *et al.* (2011) dan Nugroho *et al.* (2010) baru pada taraf *in vitro*, sehingga tidak terjadi duplikasi dengan data pada penelitian ini.

Efek antialergi oleh senyawa kumarin juga telah dibuktikan dari hasil uji klinik oleh Husori (2011), bahwa pemberian senyawa turunan kumarin (3,4-dimetil-7-[4-(p-klorobenzil)-piperazin-1-il]-propoksikumarin.dihidroklorida) dosis tunggal 20 mg mampu melindungi penyumbatan bronkus pada manusia, 60 menit setelah paparan alergen. Senyawa ini mampu menghambat pelepasan dan *re-uptake* histamin oleh sel leukosit manusia, yang berlangsung dengan pola tergantung dosis (Assem dan Chong, 1976, sit. Anas dan Nugroho, 2010).

Penelitian lainnya menyebutkan, ekstrak *Aegle marmelos* memiliki aktivitas anti inflamasi yang sangat signifikan. Hal ini dikarenakan adanya lupeol dan skimmianin karena kedua senyawa telah menunjukkan potensi yang sama dalam bentuk murni (Geetha dan Varalakshmi, 2001). Lupeol dan Citral dalam ekstrak *Aegle marmelos* juga menunjukkan penghambatan aktivitas reseptor H<sub>1</sub> dengan melihat efek positif pada relaksasi jaringan ileum dan trakhea marmut terisolasi (Arul *et al.*, 2004), karena sebagian besar mekanisme anti inflamasi dan antialergi bertindak melalui penghambatan mediasi sinyal oleh histamin (Maity *et al.*, 2009).

Pada hasil penelitian ini, kelompok korteks *Aegle marmelos* dosis 250 mg/KgBB dengan dosis 500 mg/KgBB tidak didapatkan perbedaan bermakna

dalam menurunkan hitung eosinofil ( $p = 0.557$ ) (Lampiran 6.5). Hasil ini menunjukkan ekstrak korteks *Aegle marmelos* dosis 250 mg/tikus memiliki kemampuan yang tidak jauh berbeda dengan ekstrak korteks *Aegle marmelos* dosis 500 mg/tikus dalam menurunkan jumlah eosinofil. Namun jumlah eosinofil pada kelompok asma alergi dengan ekstrak korteks *Aegle marmelos* dosis 500 mg/KgBB lebih rendah jika dibandingkan jumlah eosinofil pada kelompok asma alergi dengan ekstrak korteks *Aegle marmelos* dosis 250 mg/KgBB (Gambar 20).

Mengingat bahwa ekstrak korteks *Aegle marmelos* dosis 500 mg/KgBB memiliki dosis yang sudah bisa dikatakan besar sedangkan penurunan jumlah eosinofil trakheanya tidak berbeda signifikan dibandingkan ekstrak korteks *Aegle marmelos* dosis 250 mg/KgBB, maka bisa dikatakan bahwa ekstrak korteks *Aegle marmelos* dosis 250 mg/KgBB tersebut adalah dosis optimal dalam menurunkan jumlah eosinofil trakhea pada asma alergi model akut. Disamping itu perlu dipertimbangkan adanya keterbatasan dan kelemahan dalam cara perhitungan eosinofil yang dilakukan secara manual.