

**STUDI AKTIVITAS ANTIALERGI EKSTRAK KORTEKS MAJA
(*Aegle marmelos* Correa) PADA TIKUS WISTAR YANG TERINDUKSI
OVALBUMIN MELALUI INHIBISI MIGRASI EOSINOFIL TRAKHEA
STUDY ACTIVITIES ALLERGENIS EXTRACT MAJA CORTEX
(*Aegle marmelos* Correa) IN WISTAR RATS OVALBUMIN INDUCED BY
THE MIGRATION INHIBITION OF EOSINOPHIL TRACHEA**

Wibisana Biwigita Saumanjaya* Puguh Novi Arsito**
Undergraduated, Muhammadiyah University of Yogyakarta *
Lecturer, Muhammadiyah University of Yogyakarta**
biwi_gita@yahoo.co.id

ABSTRAK

Alergi adalah suatu perubahan reaksi pertahanan tubuh yang berlebihan terhadap zat-zat yang sebenarnya tidak berbahaya. Manifestasi umum dari alergi adalah asma. Asma merupakan sindroma yang kompleks yang melibatkan berbagai sel inflamasi yang salah satunya adalah eosinofil. Eosinofil akan teraktivasi oleh mediator kimia yang dihasilkan oleh degranulasi sel mast. Korteks Maja (*Aegle marmelos* Correa) memiliki beberapa kandungan kimia yang berpotensi sebagai antialergi yaitu diantaranya marmin, aegelin, lupeol. Tujuan penelitian adalah untuk mengidentifikasi golongan senyawa ekstrak, mempelajari aspek mekanisme farmakologi dan dosis optimal ekstrak korteks *Aegle marmelos* Correa sebagai antialergi pada tikus terinduksi ovalbumin melalui penghambatan migrasi eosinofil trakhea secara *in vivo*.

Sebanyak 1250 gram serbuk korteks *Aegle marmelos* diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% (1:4), kemudian diidentifikasi menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dan densitometri. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control group design* menggunakan 25 ekor tikus wistar jantan, dibagi dalam 5 kelompok. Kelompok K0: tanpa perlakuan. Kelompok K(-): sensitisasi OVA aerosol. Kelompok P1 (125 mg/KgBB), P2 (250 mg/KgBB), P3 (500 mg/KgBB): sensitisasi OVA aerosol dengan variasi dosis ekstrak. Hari ke-14 dilakukan pengambilan jaringan trakhea untuk pemeriksaan hispatologi. Analisis data menggunakan uji *One-Way ANOVA* dan *Post Hoc Test*.

Rata-rata hitung eosinofil trakhea tertinggi terdapat pada kelompok K(-) (10.6 ± 2.19), diikuti oleh P1, P2, P3 dan K0. *Aegle marmelos* terdeteksi memiliki kandungan senyawa kumarin, steroid dan alkaloid. Pemberian ekstrak *Aegle marmelos* dosis 250 mg/KgBB mampu menurunkan rerata hitung eosinofil trakhea tikus wistar secara signifikan dibandingkan kelompok asma alergi. Sedangkan ekstrak *Aegle marmelos* dosis 500 mg/KgBB mampu menurunkan

rerata hitung eosinofil trakhea namun tidak berbeda signifikan dibandingkan dosis 250 mg/KgBB. Sehingga bisa disimpulkan bahwa ekstrak korteks *Aegle marmelos* dosis 250 mg/KgBB adalah dosis optimal.

Kata kunci : *Aegle marmelos* Correa, asma alergi, KLT-densitometri, eosinofil

ABSTRACT

Allergies are a reaction or response to changes in the body's defense against excessive substances that actually is not dangerous or are known as allergens. Common clinical manifestations of allergy is asthma. Asthma is a very complex syndrome involving a variety of inflammatory cells, one of which is eosinophils. Eosinophils are activated by chemical mediators produced by mast cell degranulation. Maja cortex (*Aegle marmelos* Correa) has some chemical constituents of potentially antiallergic some of them marmin, aegelin, lupen-ol and lupe-on. The purpose of research is to identify classes of compounds extract, studying aspects of pharmacological mechanism and the optimal dose of extract *Aegle marmelos* Correa cortex as an antiallergic in wistar rats ovalbumin induced by the migration inhibition of eosinophil trachea in vivo.

A total of 1250 grams of powder *Aegle marmelos* cortex extracted using ethanol 96% (1:4), then identified using thin layer chromatography (TLC) and densitometry. This study was an experimental study with a draft post test only control group design used 25 male wistar rats were divided into 5 groups. group K0: no treatment. Group K(-): OVA aerosol sensitization. Group P1 (125 mg/KgBW), P2 (250 mg/KgBW), P3 (500 mg/KgBW): sensitization with OVA aerosol dose variation extract. Day 14 performed tracheal tissue sampling for histopathology examination. The data were analyzed using One-Way ANOVA and Post Hoc Test.

The highest mean score of eosinophils trachea occurred in group K(-) (10.6 ± 2.19), followed by P1, P2, P3 and K0. *Aegle marmelos* detected have coumarin, steroid and alkaloid compounds. *Aegle marmelos* extract dose of 250 mg/KgBW can decrease mean score of eosinophils wistar rat trachea significantly compared group of allergic asthma. While *Aegle marmelos* extract dose of 500 mg/KgBW can decrease mean score of eosinophils trachea was not significantly different compared dose of 250 mg/KgBW. So can be concluded that extract *Aegle marmelos* cortex dose of 250 mg/KgBW is the optimal dose.

Keyword: *Aegle marmelos* Correa, allergic asthma, TLC-densitometry, eosinophils

PENDAHULUAN

Alergi adalah suatu perubahan reaksi atau respon pertahanan tubuh yang menolak dan tidak tahan terhadap zat-zat yang sebenarnya tidak berbahaya.¹ Clemens von Pirquet pada tahun 1906 menggunakan istilah alergi untuk pertama kali sebagai perubahan kemampuan tubuh dalam merespon substansi asing bila terpajan dengan bahan yang sama untuk kedua kalinya atau lebih. Reaksi alergi dapat mempengaruhi hampir semua jaringan atau organ dalam tubuh, dengan manifestasi klinis tergantung pada organ target. Manifestasi klinis umum dari alergi termasuk asma, dermatitis atopik, rhinitis alergi, dan urtikaria/angioedema.² Meningkatnya angka kejadian alergi selama 20 tahun terakhir dapat menimbulkan masalah bagi dunia kesehatan.

Asma merupakan salah satu gejala alergi berupa suatu sindroma yang sangat kompleks melibatkan berbagai sel inflamasi, antigen, faktor genetik, mediator dan sitokin. Subtipe yang terlibat pada asma adalah subtipe *T helper 2* (Th2) 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* (CD⁴⁺) yang dibedakan menjadi Th1 dan Th2. Sel Th1 mensekresi interferon γ (IFN- γ), *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), *granulocyte monocyte colony stimulating factor* atau GMCSF,

interleukin-2 (IL-2) dan IL-3. Sedangkan Th2 mensekresi IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 dan GMCSF. Masuknya alergen akan ditangkap oleh sel pengenalan antigen (*Antigen Presenting Cell/APC*). Antigen akan diproses di dalam APC dan dengan bantuan *Major histocompatibility* (MHC) kelas II antigen diperkenalkan kepada sel limfosit T. Ciri antigen spesifik akan dibawa oleh limfosit T, teraktivasi dan berdiferensiasi ke profil Th2. Th2 akan merangsang IL-4 dan IL-13, sehingga memacu sel limfosit B untuk mensintesa IgE.³

IgE diproduksi oleh sel plasma yang terletak pada *lymph node* dan daerah yang mengalami reaksi alergi. IgE berbeda dengan antibodi yang lain dalam hal lokasinya. IgE sebagian besar menempati jaringan dan berikatan dengan permukaan sel mast dengan reseptornya yang disebut *high affinity IgE receptors* (Fc ϵ RI). Ikatan antigen dengan IgE menyebabkan terjadinya penggabungan silang antar reseptor yang akan mengaktifkan sel mast yang menyebabkan degranulasi sel mast dan tersekresinya mediator kimia dari sel mast⁴, seperti histamin, protease, heparin sulfat, prostaglandin, sistenil leukotrin, *chemokine* dan sitokin.⁵ Reaksi ini menyebabkan kedatangan sel-sel radang sehingga meningkatkan pelepasan mediator.^{3,6}

Saat ini, penelusuran senyawa obat dari berbagai tanaman terus dilakukan, salah satunya adalah kandungan senyawa aktif yang berasal dari *Aegle marmelos* Correa (*Rutaceae*). Maja

(*Aegle marmelos* Correa), suku jeruk-jerukan atau *Rutaceae*) adalah tumbuhan berbentuk pohon yang tahan lingkungan keras tetapi mudah luruh daunnya dan berasal dari daerah Asia tropika dan subtropika. Tanaman ini biasanya dibudidayakan di pekarangan tanpa perawatan dan dipanen buahnya. Berbagai hasil penelitian mengenai senyawa aktif pada tumbuhan ini telah dilaporkan, diantaranya senyawa tanin, skimianin, minyak esensial (sebagian besar kariofilena, sineol, sitral, sitronelal, D-limonena, dan eugenol), sterol triterpenoid termasuk lupeol, β - dan γ -sitosterol, α - dan β - amirin, flavonoid (sebagian besar rutin) dan kumarin termasuk aegelin, marmesin, umbelliferon, dan golongan steroid.⁷

Ekstrak organik dari daun *Aegle marmelos* Correa memiliki aktivitas sebagai anti inflamasi akut dan subakut. Ekstrak metanolik dan ekstrak air dari biji *Aegle marmelos* Correa menunjukkan aktivitas anti inflamasi yang cukup baik terhadap inflamasi akut dan kronis.⁸ Senyawa kumarin yang terdapat pada *Aegle marmelos* juga 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.^{8,9}

Berdasarkan uraian 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*.

METODE PENELITIAN

Alat : kandang tikus, spuit 0,75 cc dan 3 cc dan sonde lambung, tabung ukur 10 ml dan 50 ml, gelas beker 100 ml, mikroskop cahaya (Olympus®), timbangan elektrik (Mettler Toledo®), gelas objek, mortir, pengaduk magnet termostat tipe 1419 (B. Brawn®, W. Germany), vortex (CAT. M. Zippear GmbH. Etzenbach®, W. Germany), pipet volume mikro 100,0 μ L, 1000 μ L dan 5000,0 μ L (Gilson®, model 15415, France), sinar UV 254 dan 366, plat KLT silika gel, cawan porselen, tabung reaksi, evaporator, penangas air dan densitometer (Camag®).

Bahan : biji Penelitian ini menggunakan bahan yang diantaranya adalah tikus jantan \pm 150 mg, ekstrak korteks *Aegle marmelos*, ovalbumin (Sigma Aldrich®), akuades (Bratachem), pakan tikus (AD2®), formalin buffer 10%, phosphate buffered saline, blok parafin, pewarna Hematoksilin Eosin (HE), pereaksi Vanillin sulfat, heksana (merck®, p.a grade), pereaksi Dragendorf, HCl,

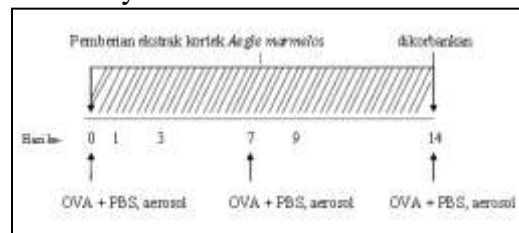
H₂SO₄ pekat, NH₄OH dan CHCl₃ (merck®, p.a grade).

Determinasi Tanaman. Tumbuhan maja (*Aegle marmelos* Correa) didapatkan di daerah Wates, Kulonprogo, Yogyakarta. Determinasi *Aegle marmelos* Correa dilakukan di laboratorium biologi farmasi, Fakultas Farmasi UGM.

Ekstraksi korteks *Aegle marmelos* Correa. Korteks *Aegle marmelos* dikeringkan, dihaluskan dan kemudian diekstraksi dengan cairan penyari etanol 96%. Ekstraksi menggunakan metode maserasi. Tahap maserasi dilakukan selama 5 x 24 jam, setiap 24 jam dilakukan pengadukan. Pada hari ke 5 dilakukan penyaringan dan dimaserasi kembali selama 3 x 24 jam menggunakan etanol 96% yang baru. Setelah dimaserasi, ekstrak cair dievaporasi 80 rpm pada suhu 55°C. Untuk mendapatkan ekstrak yang pekat dilakukan penguapan diatas penangas air.

Penyiapan seri konsentrasi Ovalbumin. Larutan inhalasi ovalbumin mengandung 0,1 g serbuk ovalbumin dalam 10 ml larutan phosphate buffered saline (PBS). Larutan PBS dibuat dengan menimbang KCl 0,1 g, KH₂PO₄ 0,1 g, NaCl 4 g, dan Na₂HPO₄.H₂O 1,08 g yang dilarutkan dalam 250 ml aquadest. Larutan yang digunakan untuk sensitisasi 1 kelompok perlakuan dibuat dengan mengambil 10 ml larutan ovalbumin dalam PBS pada pH 7,4.

Induksi Asma Tikus dengan Alergen OVA. Untuk membuat tikus model asma alergi dilakukan sensitisasi awal pada tikus dengan inhalasi 1% ovalbumin dalam PBS tiap 1 kelompok perlakuan. Sensitisasi ulangan dilakukan secara inhalasi 7 dan 14 hari berikutnya¹⁰.



Gambar 1. Sensitisasi tikus model asma

Pembuatan dan Perlakuan Dosis Ekstrak Korteks Maja. Kelompok perlakuan 1=125 mg/1000 gBB* =18,75 mg/150 g
Kelompok perlakuan 2=250 mg/1000 gBB =37,50 mg/150 g
Kelompok perlakuan 3=500 mg/1000 gBB =75 mg/150 g
*nb : ekstrak maja (mg)/berat badan tikus (gram).

Penentuan dosis didasarkan pada beberapa penelitian, untuk ekstrak *Aegle marmelos* mempunyai dosis efektif pada tikus antara 200 mg/kgBB - 300 mg/kgBB¹¹ dan dosis efektif pada manusia antara 200 mg/kgBB/hari – 400mg/kgBB/hari.¹² Pemberian ekstrak *Aegle marmelos* dilakukan per oral menggunakan sonde lambung setiap hari selama 14 hari dengan dosis 0,75 ml/tikus/hari untuk kelompok III, dosis 1,5 ml/tikus/hari untuk kelompok IV dan dosis 3 ml/tikus/hari untuk kelompok V.

Preparasi Organ dan Pengecatan/Staining. Pada akhir pemaparan semua kelompok diterminasi dengan cara pembiusan total menggunakan inhalasi kloroform dan diambil jaringan trakhea utama didekat percabangan (*bifurcatio*) sepanjang 1,5 cm, kemudian direndam dalam larutan formalin buffer 10 %, setelah itu dibuat blok parafin. Selanjutnya dilakukan potongan serial terhadap blok parafin tersebut untuk dibuat slide. Setelah itu dilakukan pewarnaan dengan *Hematoksin Eosin* (HE) untuk melihat dan menghitung jumlah eosinofil trakhea, untuk selanjutnya diidentifikasi dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.¹³ Cat yang umum dipakai dalam hispatologi adalah Hematoxylin-Eosin (HE). Pengecatan menggunakan HE diawali dengan melakukan deparafinisasi dengan memasukkan preparat ke xylol I, II, III masing-masing selama 3 menit. Lalu dilanjutkan dengan melakukan rehidrasi yaitu preparat masuk ke alkohol 100%, 95%, 80%, dan 70% masing – masing selama 2 menit. Preparat dicuci pada air mengalir selama 3 menit untuk melepaskan sisa cat/cairan yang terbawa sebelumnya. Pengecatan inti dilakukan dengan cara memasukkan preparat ke dalam larutan Mayer Hematoksin selama 7 menit. Preparat masuk ke air mengalir selama 7 menit. Kemudian dilakukan Counter stain dengan memasukkan preparat ke larutan eosin selama \pm 0,5 menit.

Preparat masuk ke air wadah I, II, III masing – masing 3 celup.

Langkah selanjutnya yaitu lakukan dehidrasi dengan memasukkan preparat ke alkohol 70%, 80%, 95% dan 100% masing – masing 3 celup. Kemudian dilakukan clearing preparat dengan memasukkannya ke dalam xylol I dan II masing – masing selama 2 menit. Langkah terakhir pengecatan HE yaitu lakukan mounting dengan meneteskan 1 tetes Entelan dan Dek Glass pada preparat. Mounting bersifat permanen seperti Entelan, Canada balsam, Hipermount, EZ-mount dan lainnya.

Analisis KLT dan Densitometri.

a. Fraksinasi Ekstrak. Fraksi Heksana: Ekstrak kental 30 mg diencerkan terlebih dahulu ke dalam cawan porselen dengan sedikit etanol 96%, kemudian ditambahkan dengan heksana secukupnya. Sisihkan sedikit untuk penotolan fraksi heksana 1 (fh1). Setelah itu diuapkan hingga mendapat kekentalan yang optimal. Kemudian tambahkan HCl 2N sebanyak 4 - 6 ml, lalu tambahkan heksana beberapa ml dan lakukan penggojokan didalam tabung reaksi. Kemudian pisahkan antara larutan asam (berwarna putih bening) dan larutan heksana (berwarna hijau muda). Larutan heksana ini digunakan untuk penotolan fraksi heksana 2 (fh2). Fraksi kloroform: Larutan asam pada proses fraksinasi heksana diletakkan ke dalam cawan porselen kemudian ditambahkan NH₄OH, diaduk lalu ditambahkan kloroform (CHCl₃) dan lakukan pengadukan kembali. Setelah itu

masuk ke dalam tabung reaksi dan kemudian lakukan penggojokan. Larutan di dalam tabung reaksi akan terpisah menjadi larutan ampas (berwarna kuning) dan larutan kloroform (berwarna putih bening). Larutan kloroform ini digunakan untuk penotolan fraksi kloroform (fk).

b. Kromatografi Lapis Tipis. Deteksi Kumarin: fraksi heksana 1 (fh1) ditotolkan pada plat KLT silika gel GF 254 (penotolan 1) menggunakan pipet kapiler sebanyak 3 totalan. Kemudian lakukan penotolan fraksi kloroform (fk) (penotolan 2) dan ekstrak yang dilarutkan dengan etanol (penotolan 3) masing-masing sebanyak 3 totalan pipet kapiler pada plat KLT. Plat KLT yang telah melalui proses elusidasi menggunakan eluen n-heksana:etilasetat (4:1) diangkat dari gelas kaca lalu didiamkan beberapa saat, kemudian dilihat dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Hasil deteksi dapat dipastikan dengan melakukan penyemprotan plat KLT menggunakan vanillin sulfat. Deteksi Steroid: fraksi heksana 1 (penotolan 1), fraksi heksana 2 (penotolan 2) dan fraksi kloroform (penotolan 3 dan 4). Proses KLT ini menggunakan fase gerak n-heksana dan etil asetat (4:2). Setelah proses elusidasi selesai plat KLT diangkat dan didiamkan beberapa saat kemudian dilakukan deteksi bercak dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya dilakukan pendeteksian bercak secara kimia yaitu dengan penyemprotan reagen Lieberman Burchard yang telah dipersiapkan sebelumnya. Deteksi

Alkaloid: menggunakan fase gerak toluene : eter : dietil eter (55:33:10). Fraksi kloroform ditotolkan pada plat KLT, lalu dimasukkan ke dalam gelas kaca berisi eluen toluene : eter : dietil eter yang sebelumnya telah dijenuhkan. Tujuan dipilihnya tiga pelarut tersebut karena masing-masing pelarut memiliki kepolaran yang berbeda sehingga senyawa-senyawa dengan kepolaran yang berbeda dapat terpisahkan dengan eluen tersebut.¹⁴ Setelah proses elusidasi selesai, amati noda menggunakan sinar UV 254 nm dan UV 366 nm. Selanjutnya lempeng disemprot dengan pereaksi Dragendorff untuk menampakkan noda atau bercaknya pada sinar tampak.

c. Pemindaian λ maks. : Alat densitometer (Camag®) dihubungkan ke PC. Lempengan KLT yang akan di analisa diletakkan pada densitometer. Ketika seluruh data sudah masuk ke program, barulah dilakukan analisis / scanning pada lempeng KLT, Untuk memperoleh data KLT-densitometri yang baik dilakukan integrasi secara manual. Kemudian percobaan diulangi dengan cara merubah letak analisis pada masing-masing noda/bercak.

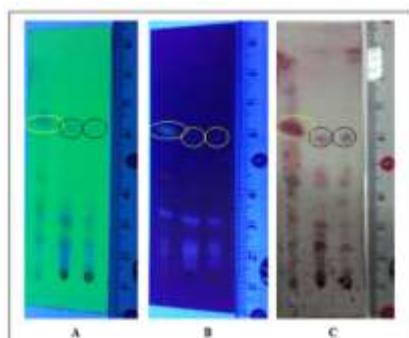
HASIL DAN PEMBAHASAN

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.

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).

1. Uji Kumarin:



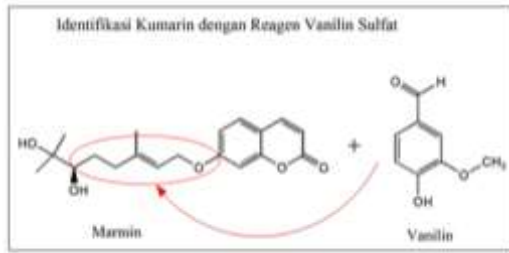
Gambar 2. Profil kromatogram identifikasi senyawa kumarin
 Keterangan:
 Titik penotolan: fraksi heksana (1), fraksi kloroform (2), pelarut etanol (3)
 A : Identifikasi kumarin pada λ 254 nm
 B : Identifikasi kumarin pada λ 366 nm
 C : Identifikasi kumarin menggunakan reagen Vanilin Sulfat

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.¹⁵ Pemendaran bercak kumarin ini lebih dominan pada fraksi heksana I (fh1).

Tabel 1. Uji Kumarin

n-heksana : etil asetat (4:1)	Ekstrak korteks <i>Aegle marmelos</i>			Nilai Rf
	Sebelum Penyemprotan Vanilin Sulfat		Setelah Penyemprotan Vanilin Sulfat	
	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

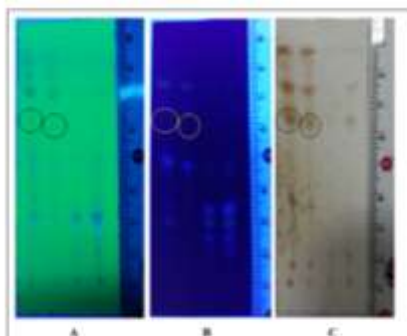
Menyemprot plat KLT dengan reagen vanillin sulfat adalah cara untuk mendeteksi bercak secara kimiawi dengan bereaksi secara kimia dengan seluruh solut yang mengandung gugus fungsional tertentu sehingga bercak menjadi berwarna.¹⁶ Setelah dilakukan penyemprotan plat KLT dipanaskan hingga bercak menimbulkan 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 3. Mekanisme reaksi kumarin dengan reagen Vanilin Sulfat

Hasil penyemprotan plat KLT dengan reagen vanilin sulfat menunjukkan adanya senyawa golongan kumarin yang diduga adalah marmin, dengan membandingkan perubahan warna yang terjadi dengan pustaka yang ada. Gambar 3, 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.¹⁷ Kromofor ini yang nantinya akan menghasilkan warna merah ungu.

2. Uji Steroid:



Gambar 4. 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 254 nm
 B: Identifikasi steroid pada 366 nm
 C: Identifikasi steroid menggunakan reagen Lieberman Burchard

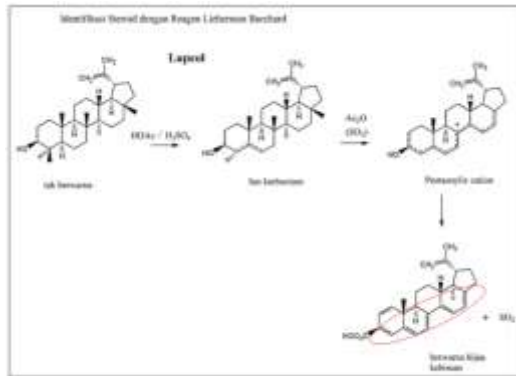
Pada plat KLT diketahui steroid terdeteksi positif dengan nilai Rf 0,70 pada fraksi heksana 1 (penotolan 1) dan Rf 0,68 pada fraksi heksana 2 (penotolan 2), sedangkan pada fraksi kloroform (penotolan 3 dan 4) terdeteksi adanya senyawa alkaloid dengan nilai Rf 0,22. Dibawah sinar UV 254 penotolan 1 dan 2 terdeteksi bercak yang tidak meredam dengan nilai Rf 0,70 dan Rf 0,68 kemungkinan bercak tersebut merupakan senyawa golongan steroid.¹⁸ Hal ini dapat dibuktikan dengan deteksi kimia lebih lanjut.

Tabel 2. Uji Steroid

n-heksana : etil asetat (4:2)	Estrak korteks <i>Aegle marmelos</i>		Warna Penyemprotan Lieberman Burchard	Nilai Rf
	Substansi Penyemprotan Lieberman Burchard 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 tetapan	-	-	-	-
Fraksi Kloroform 4 tetapan	-	-	-	-

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.¹⁹ 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.¹⁴

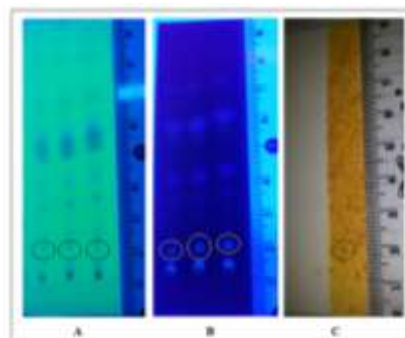


Gambar 5. Mekanisme reaksi steroid dengan reagen Lieberman Burchard

Pada reaksi ini (Gambar 5) terlihat bahwa adanya interaksi antara senyawa steroid (lupeol) dengan reagen Lieberman Burchard (H₂SO₄ 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 (Ac₂O) 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.

3. Uji Alkaloid:

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 – 0,62.²⁰



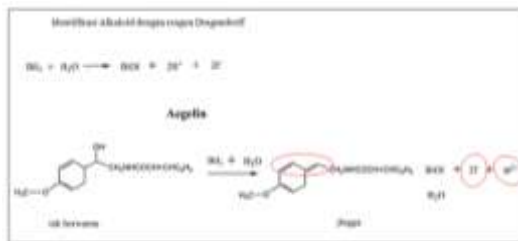
Gambar 6. Profil kromatogram identifikasi senyawa alkaloid

Keterangan:
 Tak penanda: fraksi kloroform 2s (1), fraksi kloroform 3s (2), fraksi kloroform 4s (3)
 A: Identifikasi alkaloid pada λ 254 nm
 B: Identifikasi alkaloid pada λ 366 nm
 C: Identifikasi alkaloid menggunakan reagen Dragendorff

Tabel 3. Uji Alkaloid

Toluene ester diteliti (5:3:10)	Ekstrak korteks <i>Aegle marmelos</i>			Nilai Rf
	Sebelum Penyemprotan Dragendorff	UV 254	UV 366	
Fraksi Kloroform 2 total	(+) meredam	(+) berfluoresensi biru	(+) jingga coklat	0,22
Fraksi Kloroform 3 total	(+) meredam	(+) berfluoresensi biru	(+) jingga coklat	0,22
Fraksi Kloroform 4 total	(+) meredam	(+) berfluoresensi biru	(+) jingga coklat	0,22

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.¹⁷



Gambar 7. Mekanisme reaksi alkaloid dengan reagen Dragendorff

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.¹⁸ Senyawa tanpa warna diukur pada jangka 200 sampai 400 nm, senyawa berwarna pada jangka 200 sampai 700 nm.²⁰ Pengukuran pemindaian absorbansi panjang gelombang akan direkam dalam satuan nanometer (nm). Hasil pemindaian disajikan pada gambar 8.

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 (λ_{maks}) 225 nm. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak *Aegle marmelos* mengandung senyawa kumarin, karena menurut Harborne (1987) λ_{maks} kumarin antara 212 nm sampai 282 nm.²⁰

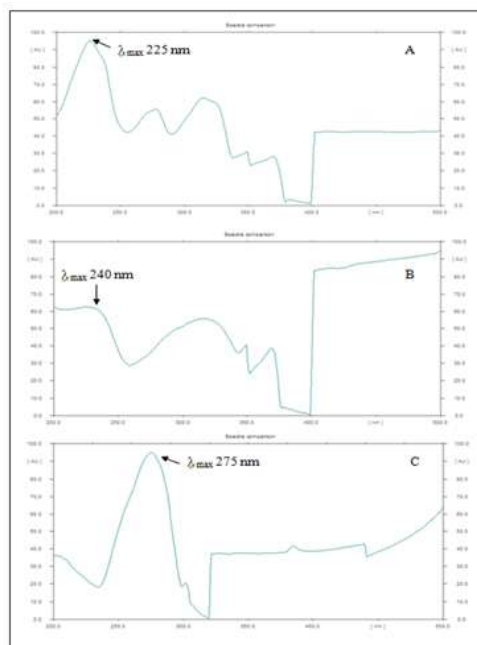
Pemindaian dilanjutkan dengan menganalisis steroid (lupeol dan lupenon) pada bercak analit fraksi heksana (ekstrak+heksana) dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (4:1). Hasil pada gambar B menunjukkan adanya puncak serapan pada panjang gelombang (λ_{maks}) 240 nm. Panjang gelombang tersebut membuktikan adanya senyawa steroid dalam n-heksana yang memiliki panjang gelombang maksimal ± 242 nm.²¹

Berdasarkan bercak analit pada fraksi kloroform (ekstrak + kloroform) dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (4:1) adanya puncak serapan pada panjang gelombang (λ_{maks}) 275 nm (gambar C). Hasil ini menunjukkan adanya senyawa alkaloid yang memiliki rentang panjang gelombang maksimal antara 228 nm sampai 330 nm.²⁰

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.

lapang pandang dan dihitung jumlah eosinofil trakhea tikus wistar.

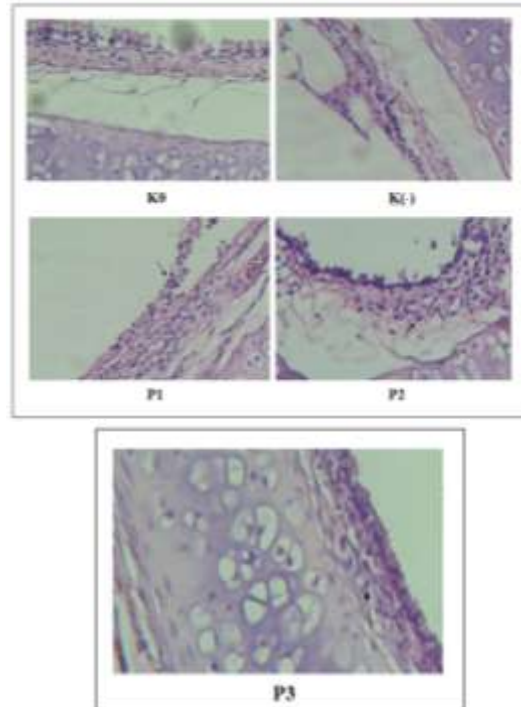


Gambar 8. Profil panjang gelombang senyawa *Aegle marmelos*

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

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



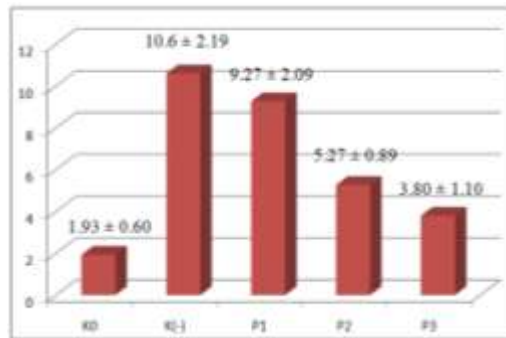
Gambar 9. Penampang melintang trakhea (perbesaran 400x) tiap kelompok

- Keterangan :
- K0 : Kelompok Kontrol air
 - 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 ± SD	% migrasi eosinofil trakhea
K0	5	1.93 ± 0.60	
K(-)	5	10.6 ± 2.19	100 %
P1	5	9.27 ± 2.09	84.6 %
P2	5	5.27 ± 0.89	38.5 %
P3	5	3.80 ± 1.10	21.5 %



Gambar 10. Histogram hitung eosinofil tiap kelompok perlakuan

Keterangan:
 Data disajikan dengan 3 replikasi (3) setiap pondok pada tiap replikasi
 Mean \pm SD
 K0: Kelompok Kontrol
 K(-): Kelompok OVA
 P1: Kelompok Ekstrak Agave murwio 125 mg/kgBB/hari
 P2: Kelompok Ekstrak Agave murwio 250 mg/kgBB/hari
 P3: Kelompok Ekstrak Agave murwio 500 mg/kgBB/hari

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). Hasil 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 menggambarkan ringkasan statistik dari 5 kelompok. Pada K0, rerata jumlah eosinofil trakhea adalah 1.93, dengan jumlah minimum 1.33 dan

maksimum 2.67, 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, 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, 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, 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, rerata jumlah eosinofil trakhea ada pada range 2.43 sampai 5.15.

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 mencari kelompok sampel mana saja yang mempunyai perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan maka dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Homogenitas Substansi

Perlakuan	N	Substansi for alpha = 0.05		
		1	2	3
K0	5	1.9320		
P3	5	3.7980	3.7980	
P2	5		5.2680	
P1	5			9.2680
K(-)	5			10.6020
Total	25	208	337	441

Data ini (Tabel 5) 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.

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. 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.²² 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 10). Secara statistik didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok K0 dan K(-) ($p = 0.000$). 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.²³ 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,²⁴ 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.³ Gambar 9, 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 μ M mampu melakukan penekanan pada pelepasan histamin hingga 40% yang diinduksi DNP₂₄-BSA dan lebih dari 50% yang diinduksi oleh thapsigargin dan ionomycin.⁹

Lupeol dan lupen-on yang merupakan turunan senyawa steroid ini berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen antialergi karena kemampuannya dalam menghambat pelepasan mediator dari kultur sel mast. Pelepasan enzim β -heksosaminidase dari kultur sel RBL-2H3 yang diinduksi secara imunologis dengan antigen DNP₂₄-BSA sebesar 35,69% dan 39,19%, dengan nilai IC₅₀ sebesar 59,40 μ M (lupenol) dan 72,51 μ M (lupenon) mampu dihambat kedua senyawa ini dengan konsentrasi 100 μ M.⁹

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 (Tabel 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 (Tabel 5) (0.000) dibandingkan kelompok asma.

Penurunan jumlah eosinofil tersebut dimungkinkan akibat adanya kandungan yang dimiliki oleh korteks *Aegle marmelos* seperti kumarin, yang 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.^{8,9}

Struktur kumarin yaitu atom O yang terikat pada C nomor 7 memiliki peranan dalam menghambat pelepasan berbagai mediator (histamin, enzim β -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%.²⁵ 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 dosis tunggal 20 mg mampu melindungi penyumbatan bronkus pada manusia, 60 menit setelah paparan alergen.²⁶ Senyawa ini mampu menghambat pelepasan dan *re-uptake* histamin oleh sel leukosit manusia, yang berlangsung dengan pola tergantung dosis.²⁷

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.²⁸ Lupeol dan Citral dalam ekstrak *Aegle marmelos* juga menunjukkan penghambatan aktivitas reseptor H₁ dengan melihat efek positif pada relaksasi jaringan ileum dan trakhea marmut terisolasi,²⁹ karena sebagian besar mekanisme anti inflamasi dan antialergi bertindak

melalui penghambatan mediasi sinyal oleh histamin.³⁰

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 ($p = 0.557$). 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 10).

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.

KESIMPULAN

1. Ekstrak korteks *Aegle marmelos* Correa terdeteksi memiliki kandungan senyawa kumarin, steroid dan alkaloid yang diduga berpotensi sebagai antialergi melalui analisis kromatografi lapis tipis.
2. Ekstrak korteks *Aegle marmelos* Correa dapat menghambat migrasi eosinofil trakhea secara *in vivo* dengan melihat penurunan jumlah eosinofil trakhea pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 (Gambar 10).
3. Ekstrak korteks *Aegle marmelos* Correa dengan dosis optimal 250 mg/KgBB dapat menurunkan jumlah eosinofil trakhea pada tikus wistar model asma alergi ($p < 0.05$).

SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek *Aegle marmelos* terhadap sel lain dan mediator – mediator kimia yang ikut berperan dalam pathogenesis asma alergi.
2. Penelitian lebih lanjut dengan menggunakan petanda-petanda asma alergi yang lain.
3. Penelitian lebih lanjut untuk menelusur zat aktif manakah pada *Aegle marmelos* yang lebih dominan dalam menghambat migrasi eosinofil trakhea dengan membuat isolat zat aktifnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Candra, Y., Asih, S., dan Iris, R., 2011, Gambaran

- Sensitivitas Terhadap Alergen Makanan, *Makara, Kesehatan*, Vol. 15, No. 1 : 44-50.
2. Paramita, O.D., 2011, Hubungan Asma, Rinitis Alergik, Dermatitis Atopik Dengan IgE Spesifik Pada Anak Usia 6-7 Tahun, Tesis, Fakultas Pascasarjana Universitas Diponegoro, Semarang.
3. Ardinata, D., 2008, Eosinofil dan Patogenesis Asma, Cetakan IV, 268-272, *Majalah Kedokteran Nusantara*, Sumatera Utara.
4. Rifa'i, M., 2011, Alergi dan Hipersensitif, Diktat, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang.
5. Holgate ST, Davies DE, Lackie PM, Wilson SJ, Pulddicombe SM, Lordan JL. *Epithelial-mesenchhimal interactions in the pathogenesis of asthma. J Allergy Clin Immunol* 2000;105:193-204.
6. Munasir Z, Suryoko EMD. 2008. Reaksi hipersensitivitas. Dalam : Akib AAP, Munasir Z, Kurniati N.Penyunting. *Buku Ajar Alergi Immunologi Anak*. Edisi Ke-2. Balai Penerbit FKUI.2008;115-25. Jakarta.
7. Saleh, C., 2009, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid Dari Kulit Batang Tumbuhan Maja (*Aegle marmelos* (L.) Correa). PS, Kimia FMIPA Universitas Mulawarman., 34-35.
8. Nugroho, A.E., Sahid, N.A., Riyanto, S., Maeyama, K., and Ikawati, Z, 2011, *Effects of Marmin Isolated from Aegle marmelos Correa on L-histidine*

- Decarboxilase Enzyme in RBL-2H3 Cells*, Thai J. Pharm. Sci.35 : 1-7.
9. Nugroho, A.E., Riyanto, S., Sukari, M.A and Maeyama, K., 2010, Pengaruh Lupene-ol and Lupene-on dari *Aegle marmelos* Correa terhadap Pelepasan Enzim β -hexoaminodase dari Sel Mast, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 8(1) : 55-60.
 10. Subijanto, A.A. dan Diding, H.P., 2008. Pengaruh Minyak Biji Jinten Hitam (*Nigella Sativa* L.) terhadap Derajat Inflamasi Saluran Napas. *Majalah Kedokteran Indonesia* Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta, Vol. 58, No. 6.
 11. Shankarananth, V., Balakrishnan, N., Suresh, D., Sureshpandian, G., et al. 2007. *Analgesic Activity of Methanol Extract of Aegle marmelos leaves. Fitoterapia*; 258-259.
 12. Sharma, G. N., Dubey, S. K., Sati, N. and Sanadya, J. 2011, *Anti-inflammatory Activity and Total Flavonoid Content of Aegle marmelos Seeds*, *J. Pharm. Sci.*, 3(3): 214-218.
 13. Hermawan D., 2009, Hubungan pemberian ekstrak patikan kebo (*Euphorbia hirta* L.) terhadap hitung Eosinofil Bronkus pada Mencit Balb/C model Asma Alergi, Skripsi, Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
 14. Wullur A. C., Schadu J., dan Wardhani A. N. K., 2013, Identifikasi Alkaloid Pada Daun Sirsak (*annona muricata* L.). Farmasi Politeknik Kesehatan Kemenkes. Manado.
 15. Munawaroh, F., Sudarsono, Yuswanto, A. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanolik Daun Sembung (*Blumeae Folium*) Terhadap Fagositosis Makrofag Pada Mencit Jantan yang Diinfeksi dengan *Listeria monocytogenes*. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
 16. Rohman, A. dan Gandjar, I.G. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar. Hal. 353-377.
 17. Fessenden, R.J., dan Fessenden, J.S., 1986, *Kimia Organik Jilid 2*, Erlangga, Jakarta.
 18. Rohman, A. 2009. *Kromatografi Untuk Analisis Obat*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
 19. Mulyani, M., Arifin, B. dan Nurdin H., Uji Antioksidan dan Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder Dari Daun Srikaya (*Annona squamosa* L), *Jurnal Kimia Unand*, Vol.2, No.1
 20. Harbone, J. B. (1987). *Metode Fitokimia* Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro, Terbitan II, ITB. Bandung.
 21. Hernawati, 2009, Potensi Buah Pare (*Momordicha charantia* L.) Sebagai Herbal Antifertilitas. *Jurnal. Universitas Pendidikan Indonesia*. Bandung
 22. Purbaningrum, S. F., 2010. Hubungan Pemberian Ekstrak Daun Sendok (*Plantago major* L.) Terhadap Hitung Eosinofil Darah Tepi pada Mencit Balb/C Model Asma Alergi, Skripsi, Fakultas Kedokteran

- Universitas Sebelas Maret, Surakarta
23. Diding H.P. 2007. Efek Pemaparan Ovalbumin Aerosol terhadap Eosinofilia Bronkus pada Mencit Balb/C. *Nexus Medicus*. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, Surakarta, p: 9-13
24. Tjay, Tan Hoon dan Rahardja, K., 2002. Obat-obat Penting, Khasiat, Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya. Jakarta: PT Elex Media Komputindo Kelompok Gramedia
25. Watanabe, J., Shinmoto, H. and Tshida, T., 2005, *coumarin and flavone derivatives from estragon and thyme as inhibitors of chemical mediator release from RBL-2H3 cells*, Biosci. Biotechnol. Biochem, 69(1): 1-6
26. Husori, D.I., 2011, Peranan Epitelial Terhadap Efek Relaksasi Senyawa Marmin Dari *Aegle marmelos* Correa Pada Otot Polos Trakhea Marmut Terisolasi, Tesis, Universitas Gadjra Mada, Yogyakarta
27. Anas, Y., dan Nugroho, A.E. 2010, Potensi Senyawa Turunan Kumarin Sebagai Agen Anti-Alergi, *Prosiding Seminar Nasional, ESPP*, 76-79
28. Geetha, T. and Varalakshmi, P., *Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linolat in rats*, *J Ethnopharmacol*, 76 (2001) 77
29. Arul, V., Miyazaki, S., and Dhananjayan, R., *Mechanisms of the contractile effect of the alcoholic extract of Aegle marmelos* *Corr. On isolated* *gunea pig ileum and tracheal chain*, *Phytomedicine*, 11 (2004) 679
30. Maity, P., Hansda, D., Bandyopadhyay U., and Mishra, D. K., 2009. *Biological Activities of Crude Extracts and Chemical Constituents of Bael, Aegle marmelos (L.) Corr. Indian Journal of Experimental Biology*. Vol. 47, pp. 849-861