

HALAMAN JUDUL



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *GRAPTOPHYLLUM PICTUM*
(DAUN UNGU) TERHADAP RASIO BERAT ANUS DAN BERAT TIKUS,
EKSTRAVASASI NETROFIL, EKSPRESI MMP-9, VEGF, EGFR DAN
RASIO KOLAGEN TIPE I DAN III PADA TIKUS WISTAR DENGAN
HEMOROID**

Penelitian eksperimental untuk menilai efek plebotrofik

Bernardus Parish Budiono

NIM 22010116510024

Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran / Kesehatan

Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

Semarang

2022

Halaman Penjelasan Judul

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *GRAPTOPHYLLUM PICTUM*
(DAUN UNGU) TERHADAP RASIO BERAT ANUS DAN BERAT TIKUS,
EKSTRAVASASI NETROFIL, EKSPRESI MMP-9, VEGF, EGFR DAN
RASIO KOLAGEN TIPE I DAN III PADA TIKUS WISTAR DENGAN
HEMOROID**

Penelitian eksperimental untuk menilai efek plebotrofik

Disertasi

Untuk memperoleh gelar Doktor

dalam Ilmu Kedokteran/Kesehatan

Ujian Tertutup

pada tanggal 30 Juni 2022

Oleh

Bernardus Parish Budiono

NIM 22010116510024

Lahir di Semarang

Halaman Persetujuan
PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *GRAPTOPHYLLUM PICTUM* (DAUN UNGU)
TERHADAP RASIO BERAT ANUS DAN BERAT TIKUS, EKSTRAVASASI
NETROFIL, EKSPRESI MMP-9, VEGF, EGFR DAN RASIO KOLAGEN TIPE I DAN
III PADA TIKUS WISTAR DENGAN HEMOROID

Penelitian eksperimental untuk menilai efek plebotrofik

Bernardus Parish Budiono

NIM 22010116510024

Telah disetujui oleh:

Promotor:

Ko Promotor

Prof. Dr. dr. Ignatius Riwanto, SpB-KBD
Tanggal 30 Juni 2022

Dr. dr. Neni Susilaningsih, MSi
Tanggal 30 Juni 2022

Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang,

Ketua,

Prof. Dr. dr. Tri Indah Winarni, M.Si.Med.,PA

PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Bernardus Parish Budiono

Nim : 22010116510024

Mahasiswa : Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan Fakultas Kedokteran
Universitas Diponegoro Semarang

Dengan ini menyatakan bahwa :

Disertasi berjudul “**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK GRAPTOPHYLLUM PICTUM (DAUN UNGU) TERHADAP RASIO BERAT ANUS DAN BERAT TIKUS, EKSTRAVASASI NETROFIL, EKSPRESI MMP-9, VEGF, EGFR DAN RASIO KOLAGEN TIPE I DAN III PADA TIKUS WISTAR DENGAN HEMOROID (Penelitian eksperimental untuk menilai efek plebotrofik)**” adalah karya ilmiah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik (Doktor) di perguruan tinggi manapun.

1. Disertasi ini adalah murni ide, rumusan dan hasil penelitian saya, serta dilakukan tanpa bantuan orang lain, kecuali tim promotor dan narasumber.
2. Dalam disertasi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dicantumkan sebagai acuan dalam naskah dengan disebutkan nama pengarang dan judul aslinya serta dicantumkan dalam daftar pustaka.
3. Pernyataan ini dibuat dengan sesungguhnya dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang saya peroleh, dan sanksi lain sesuai dengan norma yang berlaku di Universitas Diponegoro.

Semarang, 30 Juni 2022

Yang membuat pernyataan

Bernardus Parish Budiono

PERNYATAAN TENTANG *CONFLICT OF INTEREST*

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Bernardus Parish Budiono

Nim : 22010116510024

Mahasiswa : Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan Fakultas Kedokteran
Universitas Diponegoro Semarang

Dengan ini menyatakan bahwa :

Disertasi berjudul “PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK GRAPTOPHYLLUM PICTUM (DAUN UNGU) TERHADAP RASIO BERAT ANUS DAN BERAT TIKUS, EKSTRAVASASI NETROFIL, EKSPRESI MMP-9, VEGF, EGFR DAN RASIO KOLAGEN TIPE I DAN III PADA TIKUS WISTAR DENGAN HEMOROID (Penelitian eksperimental untuk menilai efek plebotrofik)” ini murni pendanaan penelitian dari peneliti dan tidak ada pendanaan dari sponsor atau pihak manapun juga baik dari pihak yang berkepentingan maupun tidak berkepentingan. Apabila dalam penelitian ini terdapat nama atau komponen produk yang sama dengan satu merek dari suatu perusahaan tertentu atau pihak ketiga, peneliti menyatakan bahwa tidak ada hubungan atau suatu kondisi tertentu ataupun keadaan yang dapat berpotensi menimbulkan conflict of interest dengan pihak tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan sebenar-benarnya dan sesuai dengan pengetahuan terbaik yang dimiliki oleh peneliti.

Semarang, 30 Juni 2022

Peneliti utama,

dr. Bernardus Parish Budiono, MSi.Med, Sp.B-KBD

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kami panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat melimpah dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian disertasi dengan judul : “PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK GRAPTOPHYLLUM PICTUM (DAUN UNGU) TERHADAP RASIO BERAT ANUS DAN BERAT TIKUS, EKSTRAVASASI NETROFIL, EKSPRESI MMP-9, VEGF, EGFR DAN RASIO KOLAGEN TIPE I DAN III PADA TIKUS WISTAR DENGAN HEMOROID (Penelitian eksperimental untuk menilai efek plebotrofik)”. Penelitian ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar akademik Doktor Ilmu Kedokteran pada Program Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

Penulis menyadari tugas ini tidak dapat terselesaikan dengan baik tanpa dukungan dari berbagai pihak. Kepada Prof. Dr. dr. Ignatius Riwanto, SpB-KBD selaku promotor, DR. dr. Neni Susilaningsih, MSi, beserta Alm. Prof. dr. Edi Dharmana, M.Sc.Ph.D., Sp.Park selaku ko-promotor, penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya atas bimbingan, sumbangan pemikiran, kesabaran dan semangatnya dalam mendampingi penulis selama proses penyelesaian penelitian disertasi ini.

Pada kesempatan ini penulis juga menghaturkan rasa terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Yos Yohan Utama, SH, M.Hum, Rektor Universitas Diponegoro Semarang
2. Prof. Dr. dr. Dwi Pudjonarko, M.Kes., Sp.S(K), Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang
3. Prof. Dr. dr. Tri Indah Winarni, M.Si.Med., PA, Ketua Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran dan Kesehatan Universitas Diponegoro Semarang
4. Dr. Endang Mahati, MSc, Ph.D, sekretaris Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran dan Kesehatan Universitas Diponegoro Semarang
5. Anggota dewan penguji, Dr.dr. Warsinggih, SpB-KBD, Dr.dr. Udadi Sadhana, M.Kes, Sp.PA, dan Dr. drg. Henry Setyawan. MSc yang telah memberikan masukan untuk perbaikan penelitian disertasi ini.

6. Seluruh staf pengajar Program Doktor Ilmu Kedokteran dan Kesehatan Universitas Diponegoro Semarang yang telah memberikan dasar dasar keilmuan yang sangat bermanfaat dalam pendidikan doktoral ini.
7. dr. Agus Priambodo, Sp.B, Sp.OT-K-Spine, Kepala Bagian Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang
8. dr. Najatullah, Sp.BP-RE, Kepala KSM Bedah Rumah Sakit Dokter Kariadi Semarang
9. Pimpinan dan staf LPPT-UGM Yogyakarta yang telah membantu pelaksanaan penelitian disertasi ini.
10. dr. Didik Setyo Heriyanto, PhD, SpPA beserta staf Patologi Anatomi FK UGM/RSUP Dr. Sarjito Yogyakarta yang telah membantu pelaksanaan dan pemeriksaan PCR penelitian disertasi ini
11. dr. Siti Amarwati, SpPA(K) beserta staf Patologi Anatomi FK UNDIP/Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Kariadi Semarang yang telah membantu pelaksanaan dan pembuatan blok parafin penelitian disertasi ini
12. Seluruh Staf Bagian/SMF Bedah FK UNDIP/Rumah Sakit Dokter Kariadi Semarang, atas kesempatan dan dukungannya selama menjalani pendidikan ini.
13. Seluruh Staf dosen dan Karyawan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang
14. Orang tua saya Papa dr. Hasman Budiono, M.Kes dan Mama dr. Mia Pramudianti yang telah memberi dukungan, masukan dan doa selama menjalani pendidikan ini.
15. Istri dan putri saya tercinta, dr. Siska Liana,Sp.Rad(K); ananda Callista Cherise Budiono, yang telah bersabar, menjadi sumber semangat dan terus memberi dukungan kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan doktoral ini.
16. Seluruh pihak yang telah membantu baik moril maupun materil yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu.

Saya menyadari bahwa penelitian ini masih jauh dari sempurna. Kritik dan saran demi kesempurnaannya sangat diharapkan dan diterima dengan senang hati. Saya berharap penelitian ini dapat berguna bagi masyarakat serta memberi sumbangan bagi pengembangan ilmu Pengetahuan.

Semarang, 30 Juni 2022

dr. Bernardus Parish Budiono, MSi.Med, SpB-KBD

DAFTAR ISI

BAB 1. Pendahuluan	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah Penelitian	5
1.2.1. Rumusan Masalah Umum	5
1.2.2. Rumusan Masalah Khusus	5
1.3. Tujuan penelitian	6
1.3.1. Tujuan Umum	6
1.3.2. Tujuan Khusus	6
1.4. Manfaat Penelitian	7
1.4.1. Ilmu Pengetahuan	7
1.4.2. Aplikasi Praktis	7
1.5. Orisinalitas Penelitian	8
BAB 2. Tinjauan Pustaka	11
2.1. Hemoroid	11
2.1.1. Anatomi dan Fisiologi Anus	11
2.1.2. Patofisiologi Hemoroid	12
2.1.3. Tanda dan Gejala Klinis	15
2.1.4. Derajat Hemoroid	15
2.1.5. Pengelolaan Hemoroid	17
2.2. Sistem Imunitas dan Efek Phlebotrofik	19
2.2.1. Matrix Metalloproteinase-9	19

2.2.2. Kolagen	24
2.2.3. VEGF	25
2.2.4. EGFR	27
2.2.5. Ekstravasasi Netrofil	29
2.2.6. Rasio berat anus dan berat tikus	31
2.3. Obat Herbal pada Hemoroid	33
2.4. Daun Ungu (<i>Graptophyllum pictum</i>)	33
2.4.1. Penelitian manfaat Daun Ungu	36
2.4.2. Penelitian eksperimental pengobatan herbal	38
2.5. Diosmin-Hesperidine	39
2.5.1. Mekanisme Kerja	40
2.5.2. Phlebotrofik untuk hemoroid	41
2.5.3. Dosis	42
2.6. Minyak Croton	43
BAB 3. Kerangka Teori, Kerangka Konsep dan Hipotesis	46
3.1. Kerangka Teori	48
3.2. Kerangka Konsep	49
3.3. Hipotesis	50
3.3.1. Hipotesis Mayor	50
3.3.2. Hipotesis Minor	50
BAB 4. Metode Penelitian	52
4.1. Design Penelitian	52
4.2. Populasi dan Sampel	53

4.2.1. Populasi	53
4.2.2. Sampel	54
4.2.3. Tempat dan Waktu Penelitian	54
4.3. Variabel Penelitian	54
4.3.1. Variabel Bebas	54
4.3.2. Variabel Tergantung	55
4.3.3. Definisi Operasional	55
4.4. Materi Penelitian	57
4.4.1. Bahan	57
4.4.2. Alat	59
4.4.3. Pemeriksaan PCR	59
4.5. Alur Penelitian	63
4.6. Penjelasan Penelitian	64
4.7. Cara Pengumpulan Data	65
4.8. Analisa Statistik	65
4.9. Persyaratan Etik	66
BAB 5. Hasil dan Pembahasan	67
5.1 Hasil Penelitian	67
5.1.1 Consort	68
5.1.2 Uji Normalitas	68
5.1.3 Hasil Uji Beda	69
5.1.3.1 Croton Oil 6%	69
5.1.3.2 Rasio Berat Anus dan Berat Tikus	70

5.1.3.3	Ekstravasasi Netrofil	71
5.1.3.4	Ekspresi MMP-9	73
5.1.3.5	Ekspresi VEGF	74
5.1.3.6	Ekspresi EGFR	76
5.1.3.7	Rasio Kolagen I dan III	77
5.1.3.8	Korelasi Antar Variabel	79
5.2	Pembahasan	79
5.2.1	Rasio Berat Anus dan Berat Tikus	83
5.2.2	Ekstravasasi netrofil	85
5.2.3	MMP-9	85
5.2.4	VEGF	87
5.2.5	EGFR	87
5.2.6	Rasio Kolagen I dan III	88
BAB 6.	Kesimpulan dan saran	91
6.1	Kesimpulan	91
6.1.1	Kesimpulan umum	91
6.1.2	Kesimpulan khusus	91
6.2	Saran	92
	Daftar Pustaka	93
	Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i>	101
	Lampiran 2. Statistik	102
	Lampiran 3. Foto	119

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Bantalan anus (Anal Cushion)	13
Gambar 2. Derajat Hemoroid Interna	16
Gambar 3. Peran Neutrophil dan pelepasan MMP-9	21
Gambar 4. Peran Makrofag dan pelepasan MMP-9	22
Gambar 5. Ilustrasi proses pada dinding Vena	22
Gambar 6. Struktur dari EGFR	28
Gambar 7. Proses ekstravasasi netrofil	30
Gambar 8. Daun Ungu	34
Gambar 9. Struktur Diosmin	39
Gambar 10. Struktur Hesperidin	40
Gambar 11. Minyak croton pada rektoanal tikus	45
Gambar 12. Kerangka Teori	48
Gambar 13. Kerangka Konsep	49
Gambar 14. Rancangan Penelitian	51
Gambar 15. Alur Penelitian	61
Gambar 16. Skema Consort	66
Gambar 17. Boxplot Rasio berat anus dan berat tikus	69
Gambar 18. Boxplot Ekstravasasi netrofil	70
Gambar 19. Boxplot MMP-9	71
Gambar 20. Boxplot VEGF	73
Gambar 21. Boxplot EGFR	74
Gambar 22. Boxplot Rasio kolagen I/III	75

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Penelitian terdahulu	8
Tabel 2. Efek terapeutik dan mekanisme dari agen phlebotrofik	26
Tabel 3. Definisi Operasional-Variabel Tergantung	54
Tabel 4. Komponen PCR	59
Tabel 5. Tahapan program PCR	60
Tabel 6. Hasil Uji Normalitas	65
Tabel 7. Deskripsi G1 dan G2	67
Tabel 8. Rasio berat anus dan berat tikus	68
Tabel 9. Ekstravasasi Netrofi	69
Tabel 10. Ekspresi MMP-9	70
Tabel 11. Ekspresi VEGF	72
Tabel 12. Ekspresi EGFR	73
Tabel 13. Rasio Kolagen I /III	74
Tabel 14. Korelasi antar variable	76

GLOSARIUM

WHO	: <i>World Health Organization</i>
GPE	: <i>Graphotophyllum pictum</i> ekstrak
MMP	: <i>Matric Metaloproteinase</i>
MVD	: <i>Micro Vascular Density</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factors</i>
EGFR	: <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
COX-2	: <i>Cyclooxygenase-2</i>
RBL	: <i>Rubber Band Ligation</i>
POM	: Pengawas Obat dan Makanan
RCT	: <i>Randomized Control Trial</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
NGAL	: <i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
HIF	: <i>Hypoxia Inducible Factor</i>
MPFF	: <i>Micronised Purified Flavonoid Fraction</i>
PG	: Prostaglandin
CVD	: <i>chronic venous disease</i>
TGF-a	: <i>transforming growth factor-a</i>
AR	: <i>am- phiregulin</i>
HB-EGF	: <i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>
BTC	: <i>betacellulin</i>
RT-PCR	: <i>Real Time – Polymerase Chain Reaction</i>
qPCR	: <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
FFPE	: <i>Formalin-fixed Paraffin-Embedded</i>

ABSTRAK

Latar belakang: Salah satu obat herbal yang banyak dipakai dalam pengobatan hemoroid adalah ekstrak daun ungu atau *Graptophyllum Pictum Extract* (GPE), namun penelitian marker seluler maupun molekuler belum dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan apakah ekstrak daun ungu (*Graptophyllum pictum*) memberikan manfaat yang setara dengan kombinasi diosmin-hesperidine dalam hal efek plebotrofik, melalui penilaian berbagai marker baik seluler maupun molekuler pada tikus wistar dengan hemoroid.

Metode: Desain penelitian eksperimental, RCT Post-test only design, 35 Tikus Wistar jantan dibagi dalam 5 grup (G). G1 tidak dilakuan induksi croton oil (sebagai kontrol negatif), G2, G3, G4 dan G5 diinduksi croton oil selama 3 hari. Pada hari ke 4 G1 dan G2 mendapatkan garam fisiologis, G3, G4 dan G5 mendapatkan secara berturutan MPFF 40 mg/kgBB, GPE 100 dan 300 mg/kgBB. Pada hari ke 9, tikus diterminasi, dieksisi jaringan anus. Dilakukan pemeriksaan untuk mengukur rasio berat anus dan berat tikus, qRT-PCR untuk ekspresi MMP-9, VEGF, EGFR, rasio kolagen I dan III dan pewarnaan HE untuk pemeriksaan ektravasasi netrofil.

Hasil: Induksi croton oil secara bermakna meningkatkan rasio berat anus-berat tikus, ekspresi MMP-9, VEGF, EGFR dan ektravasasi netrofil (G1 vs G2). Tidak didapatkan perbedaan bermakna pada rasio kolagen I dan III (G1 vs G2). MMP-9, VEGF dan EGFR memiliki pola yang sama dalam hal pemberian MPFF, GPE 100 mg/kgBB dan 300 mg/kgBB, yaitu dengan menekan ketiga variabel tersebut secara bermakna ($p < 0,05$). GPE 100 mg/kgBB (G4) secara bermakna dapat menekan rasio berat anus dan berat tikus ($p < 0,05$). Penialaian ektravasasi netrofil didapatkan hasil yang lebih rendah pada pemberian GPE 100 mg dan 300 mg ($p < 0,05$), sementara pada pemberian MPFF, hasil justru meningkat. Pada rasio kolagen tipe I dan III tidak ditemukan peningkatan bermakna baik pada pemberian MPFF, GPE 100mg/kgBB dan 300mg/kgBB ($p > 0,05$)

Kesimpulan: Pemberian GPE 100 mg/Kg BB terbukti dapat menekan rasio berat anus dan berat tikus, neutrophyl extravascular, MMP-9, VEGF dan EGFR sehingga dapat disimpulkan memiliki efek plebotrofik lebih baik dibanding GPE 300 mg/Kg BB dan MPFF 40 mg/Kg BB. GPE 300 mg/Kg BB hanya menekan neutrophyl extravascular, MMP-9, VEGF dan EGFR. MPFF 40 mg/Kg BB hanya menekan MMP-9, VEGF dan EGFR

Kata kunci: *Graptophyllum pictum* (L.) Griff, Diosmin-Hesperidin, Croton Oil, Rasio berat anus-berat tikus, ektravasasi netrofil, MMP-9, VEGF, EGFR, Rasio Kolagen I dan III

ABSTRACT

Background : One of the most common herbal ingredients traditionally used for treating hemorrhoids is caricature plant extract or Graptophyllum Pictum Extract (GPE), although there has been no cellular marker or molecular studies done so far. This study aims to prove if caricature plant extract (Graptophyllum Pictum) can have therapeutic effect equals to diosmin-hesperidine in combined dosage form, including phlebotropic effect, by appraising markers both cellular and mollecular levels in wistar rats with hemorrhoids.

Method : This was an experimental research with RCT Post-test only design. 35 male wistar rats were divided equally into 5 groups (G). G1 was not induced with croton oil (as negative control), G2, G3, G4 and G5 were induced with croton oil for 3 days. During the fourth day, G1 and G2 received normal saline, G3, G4 and G5 received MPFF 40 mg/kgBB, GPE 100 and 300 mg/kgBB in that order. During the ninth day, the mice were euthanized, and had their anal tissue surgically excised. Examinations were done in order to measure the anal-and-body-weight ratio, qRT-PCT for MMP-9, VEGF, EGFR expressions, collagen I and III ratio and HE coloring to examine neutrophils extravasation.

Result : Croton oil induction significantly increased anal-to-body-weight ratio, expression of MMP-9, VEGF, EGFR and extravasation of neutrophils (G1 vs G2). There was no significant difference in the ratio of collagen I and III (G1 vs G2). MMP-9, VEGF and EGFR had the same pattern in terms of administering MPFF, GPE 100 mg / kgBB and 300 mg / kgBW, namely by suppressing these three variables significantly ($p < 0.05$). GPE 100 mg / kgBW (G4) significantly reduced the ratio of anal weight to rat weight ($p < 0.05$). Assessments of neutrophil extravasation showed lower results after GPE administration of 100 mg and 300 mg ($p < 0.05$), while in the administration of MPFF, the results actually increased. There was no significant increase in both MPFF, GPE 100mg / kgBW and 300mg / kgBW ($p > 0.05$) in the ratio of collagen types I and III

Conclusion : The administration of GPE 100 mg / Kg BW is proven to reduce the ratio of anal to rat weight, extravascular neutrophyl, MMP-9, VEGF and EGFR so that it can be concluded that it has a better plebotropic effect than GPE 300 mg / Kg BW and MPFF 40 mg / Kg BW. GPE 300mg / Kg BW only suppresses extravascular neutrophyls, MMP-9, VEGF and EGFR. MPFF 40 mg / Kg BW only suppresses MMP-9, VEGF and EGFR

Key words : Graptophyllum pictum (L.) Griff, Diosmin-Hesperidin, Croton Oil, Rat anus to weight ratio, extravasation of neutrophils, MMP-9, VEGF, EGFR, Collagen I and III Ratio