

**PENGARUH TERAPI EKSTRAK DAUN TEMPUYUNG
(*Sonchus arvensis* L.) TERHADAP KADAR MDA DAN
AKTIVITAS PROTEASE SENDI PADA TIKUS
(*Rattus norvegicus*) MODEL *RHEUMATOID*
ARTHRITIS INDUKSI CFA**

SKRIPSI

Oleh :
NOURI NAZIHAH
115130107111029



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

repository.ub.ac.id

**PENGARUH TERAPI EKSTRAK DAUN TEMPUYUNG
(*Sonchus arvensis* L.) TERHADAP KADAR MDA DAN
AKTIVITAS PROTEASE SENDI PADA TIKUS
(*Rattus norvegicus*) MODEL *RHEUMATOID*
ARTHRITIS INDUKSI CFA**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :
NOURI NAZIHAH
115130107111029



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**



LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Terapi Ekstrak Daun Tempuyung (*Sonchus
arvensis* L.) Terhadap Kadar MDA dan Aktivitas
Protease Sendi pada Tikus (*Rattus norvegicus*)
Model *Rheumatoid Arthritis* Induksi CFA**

Oleh:

**Nouri Nazihah
115130107111029**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 13 Mei 2016
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Dra. Med.Vet. Herawati, MP
NIP. 19580127 198503 2 001

drh. Dyah Ayu Oktavianie, M.Biotech
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Brawijaya

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

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nouri Nazihah
NIM : 115130107111029
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Terapi Ekstrak Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) Terhadap Kadar MDA dan Aktivitas Protease Sendi pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Rheumatoid Arthritis* Induksi CFA.

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub diisi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 13 Mei 2016
Yang menyatakan,

Nouri Nazihah
NIM. 115130107111029

**Pengaruh Terapi Ekstrak Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.)
Terhadap Kadar MDA dan Aktivitas Protease Sendi pada Tikus
(*Rattus norvegicus*) Model *Rheumatoid Arthritis* Induksi CFA**

ABSTRAK

Rheumatoid arthritis (RA) merupakan penyakit rematik yang menyebabkan penurunan fungsi sendi. *Rheumatoid arthritis* terjadi dengan banyaknya senyawa radikal bebas didalam tubuh yang akan bereaksi dengan asam lipid tak jenuh dan menghasilkan produk akhir berupa malondealdehida (MDA). Stress oksidatif oleh radikal bebas juga dapat menyebabkan peningkatan neutrofil yang akan mensekresikan protease. Ekstrak daun tempuyung memiliki kandungan flavonoid yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang mampu menghambat radikal bebas sehingga kerusakan jaringan pada sendi dapat ditekan. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui potensi terapi ekstrak daun tempuyung dalam menurunkan kadar MDA dan aktivitas protease sendi pada tikus yang diinduksi dengan CFA. Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan uji *Thiobarbiuric Acid* (TBA) dan pengukuran aktivitas protease sendi dengan metode uji Walter secara spektrofotometri. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan berumur 8 minggu dengan berat rata-rata 200g. Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kontrol negatif, kelompok kontrol positif, dan kelompok terapi yaitu dengan dosis terapi 50 mg/Kg BB, 100 mg/kg BB, dan 200 mg/kg BB. Analisa data kadar MDA dan aktivitas protease sendi tikus dilakukan secara kuantitatif menggunakan analisis ragam ANOVA dan uji lanjutan Tukey ($\alpha = 0,05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi ekstrak etanol daun tempuyung dapat menurunkan kadar MDA dan aktivitas protease secara signifikan ($p < 0,05$). Dosis 200 mg/kg BB adalah dosis terbaik dimana peningkatan kadar MDA dari kontrol negatif sebesar 0,067% dan peningkatan aktivitas protease sendi dari kontrol negatif sebesar 15%. Kesimpulan dari penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun tempuyung berpotensi sebagai alternatif terapi *Rheumatoid arthritis* berdasarkan penurunan kadar MDA dan penurunan aktivitas protease sendi.

Kata kunci : *Rheumatoid arthritis*, CFA, MDA, Aktivitas protease sendi

Therapeutic Effect of *Sonchus arvensis* Leaf Extract Towards MDA levels and Joints Protease Activity in Rat (*Rattus norvegicus*) Models of *Rheumatoid Arthritis* Induced by CFA

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a rheumatic disease that causes a decrease in joint function. *Rheumatoid arthritis* occurs with the number of free radicals in the body that will react with unsaturated lipid acids and produce malondealdehyda (MDA). Oxidative stress by free radicals may also cause an increase in neutrophils that will secretes proteases. *Sonchus arvensis* leaf extract contains flavonoids which have the ability as an antioxidant that can inhibit free radicals and tissue damages in the joints can be suppressed. The purpose of this study was to determine the therapeutic potential *Sonchus arvensis* leaf extract in reducing the levels of MDA and joints protease activity induced by CFA. MDA measurements performed with the Thiobarbiuric Acid (TBA) test and the protease activity of the joint measurement using the Walter test. Animals used in this study were 8 weeks old male rats with an average weight of 200g. This study used 5 groups of negative control, positive control, and group therapy with therapeutic dose of 50 mg/kg BW , 100 mg/kg BW , and 200 mg/kg BW . Data analysis of MDA and activity of protease joints of rats performed quantitatively using analysis of variance ANOVA and Tukey follow-up test ($\alpha = 0.05$). The results showed that ethanol extract of *Sonchus arvensis* leaves therapy may reduce MDA levels and protease activity significantly ($p < 0.05$). Dose of 200 mg/kg BW was an effective dose where the increase of MDA from negative control was 0,067 % and the increase of protease activity of the join from negative control only 15 %. The conclusion from this study showed that the ethanol extract of *Sonchus arvensis* leaves is potential as an alternative therapy for *Rheumatoid arthritis* based on the decreasing of MDA levels and decreasing activity of protease joints.

Keywords: *Rheumatoid arthritis*, CFA, MDA, activity protease of joints

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT Yang mengatur segala urusan manusia dan atas segala limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini. Sholawat dan salam semoga tetap tercurah kepada Nabi Agung Muhammad SAW.

Skripsi ini merupakan persyaratan terakhir bagi mahasiswa Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya untuk dapat meraih gelar sarjana Strata Satu Kedokteran Hewan (S.KH). Penelitian ini berjudul “Pengaruh Terapi Ekstrak Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) Terhadap Kadar MDA dan Aktivitas Protease Sendi pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Rheumatoid Arthritis* Induksi CFA”.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Dr. Dra. Med. Vet. Herawati, MP sebagai Pembimbing I yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
2. Drh. Dyah Ayu OAP., M.Biotech sebagai Pembimbing II yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
3. drh. Analis Wisnu W., M.Biomed sebagai Penguji I yang telah meluangkan waktu dan memberikan masukan serta arahan kepada penulis dalam penyempurnaan skripsi ini.
4. drh. Wawid Purwatiningsih, M.Vet sebagai Penguji II atas segala bantuan, kesempatan, nasehat, dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis dalam penyempurnaan skripsi ini.
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh, DES, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.

6. Keluarga yang berharga Ayah Witono, Ibu Rumiwati, Kakak Winda, Adik Husna, Kak Arif serta keluarga besar yang begitu ikhlas menyayangi serta begitu sabar menanti, mendorong, membantu penulis selama belajar di Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.
7. Kelompok Skripsi Tempuyung, Hilda, Firdaus dan Awangga.
8. Seluruh Asisten Laboratorium Biosains, Laboratorium Taksonomi, Laboratorium Faal serta Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya atas segala bantuan yang telah diberikan kepada penulis.
9. Seluruh staf dan karyawan FKH, yang telah membantu proses administrasi dalam membuat tugas akhir.
10. Keluarga besar angkatan 2011 yang telah menjadi keluarga baru selama proses pendidikan di Kedokteran Hewan dan menjadi pendorong untuk meraih kesuksesan.
11. Sahabat-sahabat tercinta Heni, Lucia, Navilla, Wahyu, Eni, Azizah, vetri, Fani, Ane, Mbak Prima, Eka R, Navy, Jungkook, Taehyung, Jimin, Namjoon, Jin, Suga, Hobi, atas segala perhatian, dorongan, penghargaan, ajaran, dukungan dan doa yang telah diberikan.

Tulisan ini masih jauh dari sempurna, saran – saran demi kebaikan dan pengembangan isi tugas sarjana ini akan diterima dengan senang hati.

Malang, 13 Mei 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xi
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan.....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan.....	5
1.5 Manfaat.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Rheumatoid Arthritis.....	6
2.2 Radikal Bebas dan Antioksidan	9
2.3 Malondialdehid	11
2.4 Aktivitas Protease.....	12
2.5 Daun Tempuyung.....	14
2.6 Hewan Coba Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	17
2.7 CFA (<i>Complete Freund's Adjuvant</i>)	18
BAB III. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	20
3.1 Kerangka Konsep	20
3.2 Hipotesis Penelitian.....	22
BAB IV. METODOLOGI PENELITIAN	23
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	23
4.2 Sampel Penelitian.....	23
4.3 Rancangan Penelitian	24
4.4 Variabel Penelitian	25
4.5 Alat dan Bahan Penelitian.....	25
4.6 Tahapan Penelitian	26
4.7 Prosedur Penelitian.....	26
4.8 Analisis Data	34
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	35
5.1 Hasil dan Pembahasan kadar MDA	35
5.2 Hasil dan Pembahasan aktivitas protease.....	41
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	48
6.1 Kesimpulan	48

6.2 Saran..... 48

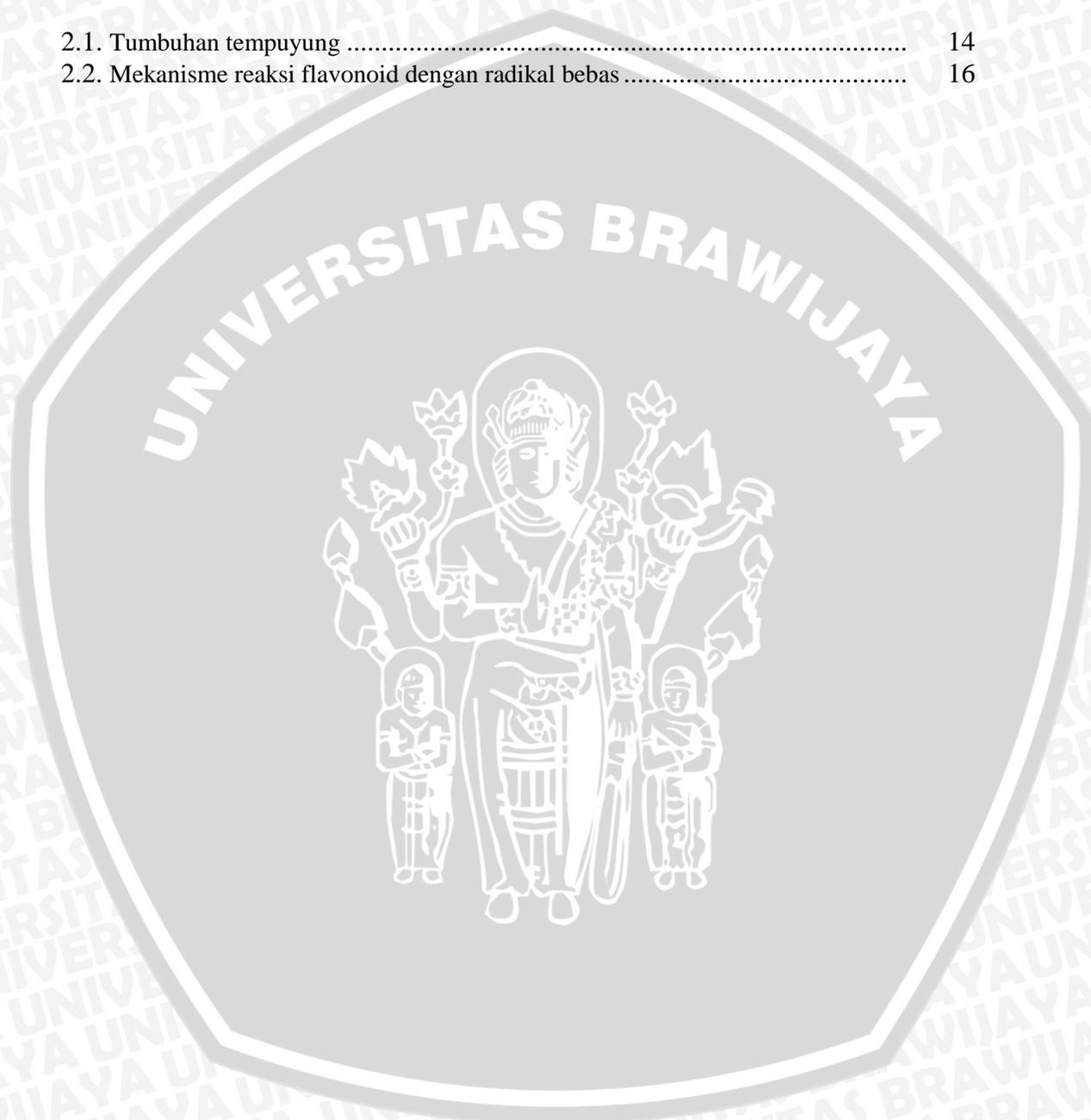
DAFTAR PUSTAKA 49

LAMPIRAN..... 54



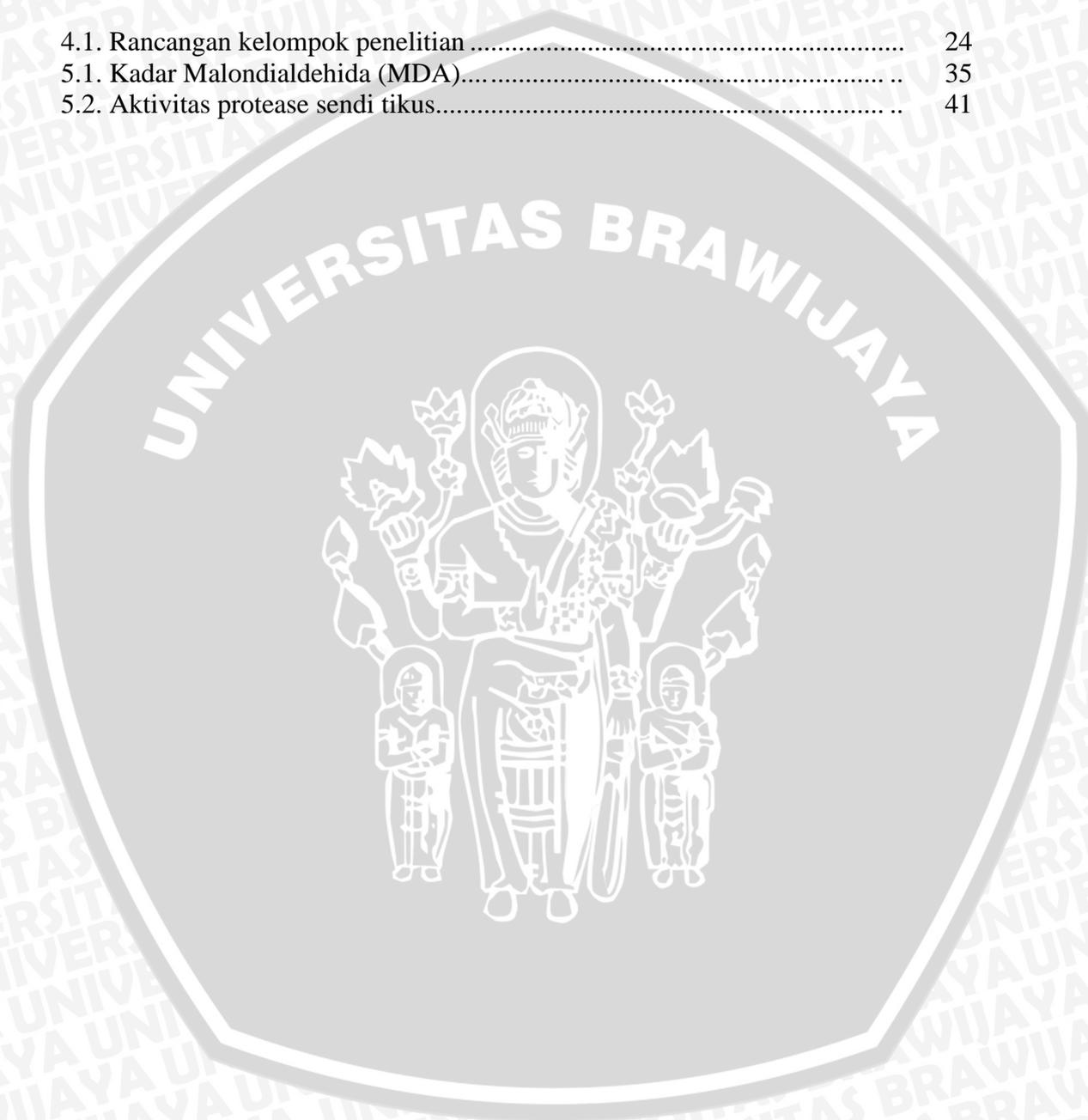
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Tumbuhan tempuyung	14
2.2. Mekanisme reaksi flavonoid dengan radikal bebas	16



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Rancangan kelompok penelitian	24
5.1. Kadar Malondialdehida (MDA).....	35
5.2. Aktivitas protease sendi tikus.....	41

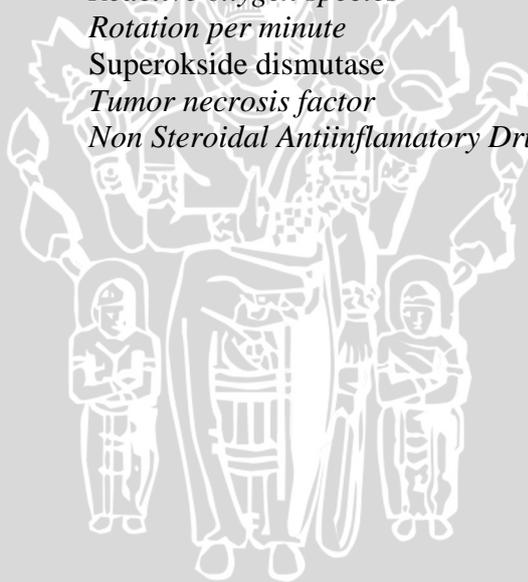


DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Surat keterangan Laik Etik.....	54
2. Keterangan Identifikasi Daun Tempuyung (<i>Sonchus arvensis L.</i>).....	55
3. Skema Kerja Penelitian.....	56
4. Pembuatan Ekstrak Daun Tempuyung (<i>Sonchus arvensis L.</i>).....	57
5. Perhitungan dosis ekstrak daun tempuyung.....	58
6. Pembedahan Hewan Coba.....	60
7. Pengukuran Kadar MDA.....	61
8. Pengukuran Aktivitas Protease.....	62
9. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Tirosin.....	65
10 Kurva standart tyrosin.....	66
11. Perhitungan Aktivitas Protease.....	67
12. Hasil Uji Statistik Aktivitas Protease.....	69
13. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Malondialdehida.....	70
14. Kurva Baku MDA dan Data Absorbansi MDA.....	71
15. Perhitungan Kadar MDA.....	72
16. Hasil Uji Statistika Kadar MDA.....	73
17. Hasil Uji LCMS.....	74

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Simbol/Singkatan	Keterangan
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AOAC	<i>Association of analytical communities</i>
BB	Berat badan
H ₂ O ₂	Hidrogen peroksida
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
MDA	Malondialdehida
NaCl	Natrium clorida
NF-kB	<i>Nuclear factor appa B</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PUFA	<i>Poly unsaturated fatty acid</i>
RAL	Rancangan acak lengkap
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
Rpm	<i>Rotation per minute</i>
SOD	Superoksida dismutase
TNF-	<i>Tumor necrosis factor</i>
NSAID	<i>Non Steroidal Antiinflammatory Drugs</i>



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Rheumatoid arthritis (RA) merupakan penyakit rematik yang ditandai dengan peradangan yang menyebabkan nyeri, pembengkakan, kekakuan, dan penurunan fungsi sendi. *Rheumatoid arthritis* cukup banyak ditemukan di Amerika, sekitar 20 persen dari pet animal di Amerika menderita *rheumatoid arthritis* pada usia tua (Arthritis Foundation, 2012).

Rheumatoid arthritis dianggap sebagai penyakit autoimun sistemik dengan ciri utama dari peradangan sendi kronis yang pada akhirnya mengarah pada kerusakan sendi. RA mempengaruhi 1% dari populasi dunia dan dapat menyebabkan cacat berat. Penyakit ini menyebabkan kerusakan struktur yang besar, dengan tingkat agresifitas penyakit yang berbeda-beda serta memiliki dampak terhadap kualitas hidup pasien yang terkena. *Rheumatoid Artritis* dalam waktu yang lama mempunyai prognosis yang buruk, dimana akan menimbulkan kecacatan (80 %) setelah 5 tahun dan dapat mengurangi angka harapan hidup 3- 18 tahun (Choy, 2001). Sehubungan dengan hal tersebut studi tentang RA menggunakan hewan yang diinduksi dengan Adjuvant Arthritis telah dilaporkan sebagai model eksperimen (Prabowo, 2005).

Induksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) menyebabkan respons inflamasi (Ramani, 2012). *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) juga dapat memicu terbentuknya radikal bebas. Radikal bebas sendiri dapat

menyebabkan stress oksidatif. Stress oksidatif yang diakibatkan oleh radikal bebas dapat ditentukan dengan mengukur salah satu parameter yaitu *malondialdehid* (MDA) (Valko *et al.*, 2006). Radikal bebas juga dapat menyebabkan peningkatan aktivitas protease sebagai respon imun dengan mengaktivasi NF-kb sehingga akan mengekspresikan sitokin-sitokin proinflamatori dan mengaktivasi neutrofil untuk melepaskan protease (Ninik dkk., 2012).

Obat-obatan memainkan peran yang sangat penting dalam pengobatan *rheumatoid arthritis*. Selama ini, pengobatan *rheumatoid arthritis* telah menggunakan obat-obatan berupa obat-obatan NSAID, dimana pemberian terapi tersebut dalam jangka waktu yang lama akan menimbulkan efek samping pada ginjal dan hati (Angelo, 2006). Dengan demikian diperlukan bentuk terapi yang aman dan tidak menimbulkan efek samping yang berbahaya bagi penderita *Rheumatoid arthritis* seperti terapi dengan menggunakan bahan herbal yang mengandung senyawa bioaktif seperti antioksidan yang sangat dibutuhkan sebagai terapi RA.

Daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) mengandung senyawa polifenol berupa flavonoid. Flavonoid merupakan komponen fenol, yaitu bioaktif yang akan merubah reaksi tubuh terhadap senyawa lain seperti alergen, virus, dan zat karsinogen. Sebagai antioksidan yang aktif, membuat flavonoid banyak digunakan dalam pengobatan artritis dan pengerasan pembuluh darah arteri (Wirakusumah, 2005).

Pemanfaatan ekstrak daun tempuyung yang diyakini mengandung senyawa antioksidan belum diteliti dalam kemampuannya untuk menurunkan kadar MDA dan aktivitas protease sendi pada tikus model *Rheumatoid arthritis*. Penelitian ini mempelajari tentang pengaruh pemberian ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis*. L) terhadap kadar *malondialdehid* (MDA) dan aktivitas protease sendi tikus (*Rattus norvegicus*) *rheumatoid arthritis*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah terapi ekstrak daun tempuyung dapat menurunkan kadar *malondialdehid* (MDA) pada tikus model *rheumatoid arthritis*?
2. Apakah ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) dapat menurunkan aktivitas protease sendi pada tikus model *rheumatoid arthritis*?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah diatas, maka batasan penelitian ini adalah:

1. Hewan model yang dipakai yaitu tikus (*Rattus norvegicus*) jantan, strain wistar, umur 8 minggu, dan berat badan 200 g, yang diperoleh dari Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, Malang. Penggunaan hewan coba telah mendapatkan sertifikat laik etik dari

Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No. 412-KEP-UB.

(Lampiran 1)

2. Pembuatan tikus model *Rheumatoid arthritis* (RA) dilakukan dengan menginduksikan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) sebanyak 2 kali dalam rentang waktu yang berbeda. Penginduksian pertama dilakukan secara intradermal pada *coccygeal* pada hari ke-1 sebanyak 0,1 ml dan penginduksian kedua diberikan pada bagian *metatarsophalangeal extremitas caudal sinister* dan *dexter* pada hari ke-8 sebanyak 0,05 ml (Prabowo, 2005).
3. Varietas Daun Tempuyung yang dipakai untuk terapi adalah Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) yang diperoleh dari Materia Medika, Kota Batu-Malang, Jawa Timur yang mendapatkan surat keterangan identifikasi dari UPT Materia Medica, Kota Batu. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia, Polinema Malang.
4. Dosis terapi yang digunakan dengan ekstrak daun tempuyung selama 14 hari berturut-turut yaitu sejumlah dosis 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB dan dosis 200 mg/kg BB, diberikan dengan metode sonde lambung (Lumbanraja, 2009).
5. Dalam penelitian ini diamati kadar malondialdehid (MDA) yang akan diukur dengan uji TBA (*Thiobarbituric Acid*) dan aktivitas protease sendi diukur dengan uji Walter secara spektrofotometri.

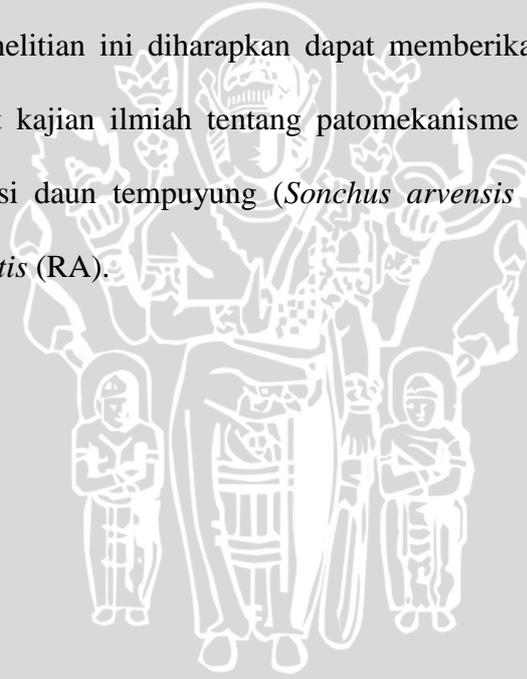
1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh terapi ekstrak daun tempuyung terhadap kadar MDA pada tikus model *rheumatoid arthritis*.
2. Mengetahui pengaruh terapi ekstrak daun tempuyung terhadap aktivitas protease sendi pada tikus model *rheumatoid arthritis*.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat berupa informasi terkait kajian ilmiah tentang patomekanisme *rhematoid arthritis* (RA) dan potensi daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) sebagai terapi *rheumatoid arthritis* (RA).



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rheumatoid Arthritis

Rheumatoid arthritis (RA) merupakan penyakit rematik yang ditandai dengan peradangan yang menyebabkan nyeri, pembengkakan, kekakuan, dan penurunan fungsi sendi. Kata arthritis berasal dari dua kata Yunani. Pertama, arthron, yang berarti sendi. Kedua, itis yang berarti peradangan. Secara harfiah, arthritis berarti radang sendi. Sedangkan *rheumatoid arthritis* adalah suatu penyakit dimana persendian (biasanya sendi tangan dan kaki) mengalami peradangan, sehingga terjadi pembengkakan, nyeri dan seringkali akhirnya menyebabkan kerusakan bagian dalam sendi (Gordon, 2002). Engram (1998) mengatakan bahwa, *rheumatoid arthritis* adalah penyakit jaringan penyambung sistemik dan kronis dikarakteristikan oleh inflamasi dari membran sinovial. *Rheumatoid arthritis* menyerang sendi diartrosis dimana sebagian besar merupakan sendi-sendi kecil, misalnya yang paling banyak ditemukan adalah pada sendi metakarpofalangeal, metatarsfalangeal, dan interfalanges proksimal.

Gejala klinis yang sering muncul pada anjing atau kucing yang menderita *Rheumatoid arthritis* yaitu kekakuan pada sendi, inflamasi pada sendi, perubahan ketika berjalan, anorexia, depresi, demam, proliferasi synovial, perluasan inflamasi pada pannus ke dalam rongga sendi menyebabkan terjadi perubahan yang erosif, apabila terjadi secara terus-menerus akan berakibat pada kerusakan artikular kartilago dan tulang.

Gambaran histologi sinovium dalam sendi yang normal merupakan lapisan tipis halus yang memegang beberapa fungsi penting. Sinovium berfungsi sebagai sumber nutrisi penting untuk tulang rawan karena tulang rawan sendiri merupakan avaskular, selain itu sel-sel sinovial mensintesis pelumas sendi seperti asam hyaluronic, serta kolagen dan fibronectin yang merupakan kerangka struktural dari interstitium sinovial (Clifton, 2007).

2.1.2 Etiologi

Penyebab penyakit *rheumatoid arthritis* belum diketahui secara pasti, namun faktor predisposisinya adalah mekanisme imunitas (antigen-antibodi), faktor metabolik, dan infeksi virus. Ada beberapa teori penyebab *rheumatoid arthritis* antara lain infeksi streptokokus hemolitikus dan streptokokus non-hemolitikus, endokrin, autoimun, metabolik dan faktor genetik serta faktor pemicu lainnya. Pada saat ini, *rheumatoid arthritis* diduga disebabkan oleh faktor autoimun dan infeksi (Alamanos *et al*, 2005).

2.1.3 Patomekanisme Arthritis

Proses awalnya, antigen (bakteri, mikroplasma atau virus) menginfeksi sendi akibatnya terjadi kerusakan lapisan sendi yaitu pada membran sinovial dan terjadi peradangan yang berlangsung terus menerus. Peradangan ini akan menyebar ke tulang rawan, kapsul fibroma sendi, ligamen dan tendon, kemudian terjadi penimbunan sel darah putih dan pembentukan pada jaringan parut sehingga membran sinovium menjadi

menebal. Terjadinya hipertrofi ini menyebabkan aliran darah yang masuk ke dalam sendi menjadi terhambat. Keadaan seperti ini akan mengakibatkan terjadinya nekrosis (rusaknya jaringan sendi), nyeri hebat dan deformitas (Schuna, 2005).

Rheumatoid arthritis ditandai oleh peradangan terus-menerus dari lapisan sinovial pada sendi yang dapat menyebabkan deformitas sendi. Inflamasi sinovial dapat terjadi pada pembuluh darah, yang menyebabkan hiperplasia sel endotel pembuluh darah kecil, fibrin, platelet dan inflamasi sel yang dapat menurunkan aktivitas vaskuler pada jaringan sinovial, hal ini menyebabkan gangguan sirkulasi darah dan berakibat pada peningkatan metabolisme yang memacu terjadinya hiperplasia (peningkatan abnormal dalam jumlah sel dalam suatu organ atau jaringan) dan sel dalam keadaan hipoksia. Sel yang hipoksia dalam sinovium berkembang menjadi edema dan menyebabkan multiplikasi sel sinovial. Sel pada sinovium tumbuh dan membelah secara abnormal, membuat lapisan sinovium menebal, sehingga sendi membesar dan bengkak (Ackerman and Rosai, 2004).

Sistem imun merupakan bagian pertahanan tubuh yang dapat membedakan komponen *self* dan *non-self*. Pada kasus *rheumatoid arthritis*, sistem imun tidak mampu lagi membedakan keduanya dan menyerang jaringan sinovial serta jaringan penyokong lain. Inflamasi berlebihan merupakan manifestasi utama yang tampak pada kasus *rheumatoid arthritis*. Inflamasi terjadi karena adanya paparan antigen. Antigen dapat berupa

antigen eksogen, seperti protein virus atau protein antigen endogen (Schuna, 2005).

Paparan antigen akan memicu pembentukan antibodi oleh sel B. Pada pasien *rheumatoid arthritis* ditemukan antibodi yang dikenal dengan *Rheumatoid Factor* (RF). *Rheumatoid Factor* mengaktifkan komplemen kemudian memicu kemotaksis, fagositosis dan pelepasan sitokin oleh sel mononuklear sehingga dapat mempresentasikan antigen kepada sel T CD4+. Sitokin yang dilepaskan merupakan sitokin proinflamasi dan kunci terjadinya inflamasi pada *rheumatoid arthritis* seperti TNF- α , IL-1 dan IL-6. Aktivasi sel T CD4+ akan memicu sel-sel inflamasi datang ke area yang mengalami inflamasi. Protein vasoaktif seperti histamin dan kinin juga dilepaskan yang menyebabkan edema, eritema, nyeri dan terasa panas. Inflamasi kronis yang dialami pasien *rheumatoid arthritis* menyebabkan membran sinovial mengalami proliferasi berlebih yang dikenal dengan *pannus*. *Pannus* akan menginvasi kartilago dan permukaan tulang yang menyebabkan erosi tulang dan akhirnya kerusakan sendi (Schuna, 2005).

2.2 Radikal Bebas dan antioksidan

Radikal bebas adalah suatu senyawa yang memiliki elektron tidak berpasangan pada lapisan kulit luarnya. Elektron tidak berpasangan tersebut bersifat reaktif dan tidak stabil sehingga dapat mengakibatkan kerusakan sel, gangguan fungsi sel, bahkan kematian sel (Andriani, 2007).

Tingginya radikal bebas dalam tubuh dapat menyebabkan stress oksidatif. Stres oksidatif adalah suatu kondisi yang berhubungan dengan

peningkatan kecepatan kerusakan sel akibat induksi oksigen dan turunannya (senyawa spesies oksigen reaktif atau ROS). Kerusakan sel terjadi akibat ketidakseimbangan antara pembentukan ROS dan aktivitas pertahanan enzim antioksidan (Lee *et al.*, 2004).

Radikal bebas diproduksi oleh tubuh pada proses metabolisme normal. Atom atau molekul dengan elektron bebas ini dapat digunakan untuk menghasilkan tenaga dan beberapa fungsi fisiologis seperti kemampuan untuk membunuh virus dan bakteri. Namun tenaga yang sangat tinggi dari radikal bebas juga dapat merusak jaringan normal apabila jumlahnya terlalu banyak. Radikal bebas dapat mengganggu produksi DNA, lapisan lipid pada dinding sel, mempengaruhi pembuluh darah, dan produksi prostaglandin (Droge, 2002).

Antioksidan sudah dikenal sebagai senyawa untuk melawan suatu radikal bebas. Antioksidan dinyatakan sebagai senyawa yang secara nyata dapat memperlambat oksidasi (Trilaksani, 2005). Antioksidan menurut Kuncahyo dan Sunardi (2007) adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut dapat diredam.

Di dalam tubuh sudah terdapat enzim yang dapat menangkal radikal bebas, namun bila jumlah radikal bebas berlebihan tubuh memerlukan antioksidan dari luar untuk menangkal radikal bebas (Edyson, 2003). Tubuh tidak mempunyai cadangan antioksidan dalam berjumlah berlebih, sehingga jika terjadi paparan radikal berlebih maka tubuh membutuhkan antioksidan

eksogen. Antioksidan alami mempunyai tingkat keamanan yang lebih baik dibandingkan dengan antioksidan sintetis (Edyson, 2003).

Antioksidan dapat menetralkan radikal bebas, seperti enzim SOD, glutathion peroksidase, dan katalase. Antioksidan dapat diperoleh dari asupan makanan yang banyak mengandung vitamin C, vitamin E dan beta-karoten serta senyawa fenolik. Lawrence *et al.* (2000) menambahkan bahwa antioksidan berfungsi untuk menetralkan atau meredakan dampak negatif dari radikal bebas. Barus (2009) mengelompokkan fungsi antioksidan berdasarkan mekanisme kerjanya menjadi fungsi utama dan sekunder. Fungsi utama antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen yang sering disebut sebagai antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara turunan radikal antioksidan tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal bebas. Fungsi sekunder merupakan fungsi memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme diluar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi dengan pengubahan radikal bebas ke bentuk lebih stabil.

2.3 Malondialdehida (MDA)

Ketidakeimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan disebut stress oksidatif. Stress oksidatif dalam jangka panjang dapat menyebabkan berbagai penyakit. Stress oksidatif yang ditimbulkan oleh radikal bebas dapat ditentukan dengan mengukur kadar MDA. Kadar MDA yang tinggi

menunjukkan bahwa sel mengalami stress oksidatif (Valko *et al.*, 2006). Pada sel, ROS dapat bereaksi dengan phospholipid membran menyebabkan peroksidasi lipid dengan produk akhir *malondialdehid* (MDA) yang akan menginisiasi reaksi berantai. MDA akan menyebabkan kerusakan fungsi membran dan mengaktifkan reseptor dan enzim yang terdapat pada membran, serta meningkatkan permeabilitas jaringan.

Malondialdehid (MDA) terbentuk dari peroksidasi lipid (*lipid peroxidation*) pada membran sel yaitu reaksi radikal bebas dengan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA). Reaksi tersebut terjadi secara berantai, akibat akhir dari reaksi rantai tersebut akan terbentuk hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida tersebut dapat menyebabkan dekomposisi beberapa produk aldehid yang bersifat toksik terhadap sel dan berbeda panjang rantainya, antara lain MDA, yang merupakan salah satu aldehid utama yang terbentuk (Putri *et al.*, 2011). Tingginya kadar radikal bebas yang sangat reaktif dalam tubuh tidak dapat diukur namun dapat ditunjukkan oleh rendahnya aktifitas dari enzim antioksidan dan tingginya kadar *malondialdehid* (MDA), sehingga dengan memeriksa kadar MDA kita dapat mengukur tinggi radikal bebas yang ada didalam tubuh.

2.4 Aktivitas protease

Protease adalah enzim yang mengkatalisasi pemecahan ikatan peptida dalam peptida, polipeptida dan protein dengan menggunakan reaksi

hidrolisis menjadi molekul yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino (Naiola dan Widyastuti 2002).

Protease merupakan kelompok enzim-enzim yang kompleks yang menduduki posisi sentral dalam aplikasinya pada bidang fisiologis. Protease ekstraseluler sebagian besar berperan dalam hidrolisis substrat polipeptida besar. Enzim proteolitik intraseluler memainkan peran penting dalam metabolisme dan proses regulasi pada sel hewan, tumbuhan dan mikroorganisme, seperti mengganti protein, memelihara kesetimbangan antara degradasi dan sintesis protein.

Pelepasan protease di jaringan akibat rangsangan dari produk bakteri, cedera fisik dan obat-obatan yang dapat memicu aktivasi makrofag. Aktivasi makrofag tersebut merangsang terbentuknya sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6 dan TNF- α yang menyebabkan migrasi neutrofil dan pelepasan enzim proteolitik (protease) yang berperan dalam kerusakan jaringan. Peningkatan aktivitas protease dapat digunakan sebagai indikasi adanya inflamasi dan mengukur tingkat keparahannya (Simpson *et al.*, 2005).

Peningkatan produksi ROS akan menyebabkan aktivasi NF- κ B dan fosforilasi I κ B (Campbell *et al.*, 2006). Menurut Chevion *et al* (2003) ROS menginisiasi cascade serin kemudian menyebabkan terjadinya fosforilasi I κ B (penambahan fosfat pada I κ B). Hal tersebut menyebabkan ikatan NF- κ B dengan I κ B terlepas, sehingga NF- κ B berpindah ke dalam inti sel (nukleus). Nuklear faktor- κ B (NF- κ B) merupakan faktor transkripsi yang mengatur ekspresi gen-gen imun dan respon inflamasi seperti sitokin

proinflamatori, kemokin, enzim inflamasi dan molekul adhesi. Pelepasan sitokin proinflamatori memicu aktivasi dan migrasi neutrofil serta pelepasan protease (enzim proteolitik) (Zhang *et al.*, 2001).

2.5 Daun tempuyung

Tempuyung merupakan salah satu tanaman obat yang berkhasiat. Selain nama Latin, tempuyung juga memiliki nama daerah seperti lobak air, lempung jombang, galibug, lampenas, dan rayana. Tanaman ini sering kita temukan di sekitar kita karena dapat tumbuh di antara puing-puing bangunan, tembok, ataupun pinggir jalan (Winarto, 2004). Daunnya tunggal berbentuk lonjong dan mempunyai ujung runcing serta berwarna hijau keunguan, permukaannya licin dan tepinya berombak juga bergigi tak beraturan. Panjang daunnya kira-kira 6-48 cm dan mempunyai lebar sekitar 3-12 cm.



Gambar 2.1 Tumbuhan tempuyung (Winarto, 2004)

Daun tempuyung mempunyai rasa pahit. Tumbuhan ini juga memiliki khasiat sebagai pencahar, menurunkan panas, serta menghilangkan racun. Selain untuk mengobati kelebihan asam urat, tempuyung juga

digunakan untuk mengobati penyakit saluran kencing, darah tinggi ringan, kencing batu, bisul, mengurangi bengkak, mengobati usus buntu ringan dan wasir (Sitanggang dan Dewani, 2006)

Klasifikasi Daun tempuyung yaitu (Winarto, 2004):

Difisi : Spermatophyta

Subdifisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledonae

Ordo : Asterales

Suku/Family : Compositae

Marga : Sonchus

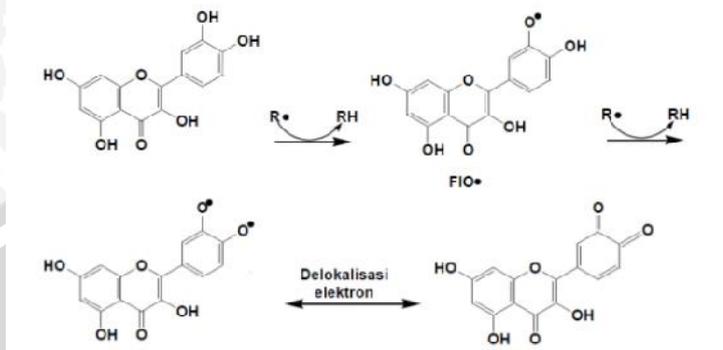
Spesies : *Sonchus arvensis* Linn

Nama umum : Tempuyung

Kandungan kimia yang terdapat dalam daun tempuyung berupa ion mineral, seperti silika; kalium; magnesium; natrium; dan senyawa organik, seperti flavonoid. Kandungan flavonoid total dalam daun tempuyung sekitar 0,1044%. Selain berguna sebagai antioksidan, senyawa flavonoid dalam daun tempuyung juga berguna sebagai antiradang dan memperkuat dinding kapiler. Senyawa flavonoid yang ada dalam daun tempuyung yaitu kaempferol, luteolin-7-Oglukosida, dan apigenin-7-Oglukosida (Winarto, 2004).

Flavonoid memiliki kemampuan sebagai antioksidan mekanisme scavenger radikal bebas melalui pembentukan radikal fenoksil yang kurang

reaktif. Kemampuan senyawa flavonoid (FIOH) sebagai scavenger radikal bebas (R•) dengan mendonasikan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya.



Gambar 2.2 Mekanisme reaksi flavonoid dengan radikal bebas (Nanik dkk., 2012)

Gambar 2.2 menunjukkan bahwa Reaksi radikal fenoksil flavonoid (FIO•) dan sebuah molekul stabil (RH). FIO• kemudian mengalami perubahan struktur resonansi dengan redistribusi elektron tak berpasangan pada cincin aromatik. Dengan demikian, radikal fenoksil flavonoid memiliki reaktivitas yang lebih rendah dibandingkan dengan R•. FIO• dapat bereaksi dengan radikal bebas yang lain untuk membentuk senyawa yang tidak reaktif melalui reaksi terminasi radikal-radikal yang ditunjukkan dengan reaksi sebagai berikut:



Adanya senyawa flavonoid pada daun tempuyung diharapkan mampu menghambat reaktivitas radikal bebas. Penghambatan radikal bebas

ini akan menekan terjadinya peroksidasi lipid, sehingga kadar MDA menurun, selain itu dapat menekan neutrofil untuk pelepasan protease, sehingga aktivitas protease pada sendi dapat menurun dan kerusakan jaringan pada sendi dapat ditekan.

2.6 Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Rattus norvegicus memiliki rambut tubuh berwarna putih dan mata yang merah (Myers dan Armitage, 2004). Karakteristik dari tikus putih (*Rattus norvegicus*) antara lain panjang badan 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, hidung tumpul serta telinga kecil (Armitage, 2004). Ada dua sifat yang membedakan antara hewan coba tikus dan hewan coba yang lainnya, yaitu tikus tidak memiliki kantong empedu sehingga tidak ada respon muntah. Hal tersebut memudahkan dalam pemberian obat melalui oral atau sonde lambung (Sirois, 2005).

Sistem klasifikasi tikus *Rattus norvegicus* menurut Myers dan Armitage (2004) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Tikus *Rattus norvegicus* merupakan hewan yang umum digunakan dalam penelitian karena mudah dipelihara dan mudah berkembang biak. Tikus ini memiliki sifat yang tidak dapat muntah karena struktur anatomi yang tidak lazim pada tempat bermuara esophagus ke dalam lambung sehingga mempermudah saat pemberian terapi menggunakan sonde, dan tikus putih tidak memiliki kandung empedu (Suckow, 2006). *Rattus norvegicus* memiliki kebutuhan asam amino esensial yang sama seperti manusia. Terdapat kemiripan fungsi dan bentuk organ serta proses biokimia dan biofisik antara tikus dan manusia sehingga penelitian yang dilakukan dapat diaplikasikan pada manusia (Hedrich, 2006).

2.7 CFA (*Complete Freund's Adjuvant*)

Complete Freund Adjuvant adalah salah satu adjuvan yang paling umum digunakan dalam penelitian untuk merangsang system imunitas tubuh dengan menggunakan paparan antigen. Adjuvan ini merupakan air dalam minyak emulsi. Hal ini dibuat dari minyak non – metabolis (minyak parafin dan monooleat mannide). Adjuvan juga mengandung *Mycobacterium tuberculosis* yang sudah dimatikan, tanpa bakteri itu adjuvan tidak akan lengkap dikarenakan adjuvan ini membutuhkan antigen untuk menginduksi respon Th1. Pertama kali dikembangkan oleh Jules Freund di tahun 1940, *Complete Freund Adjuvant* dirancang untuk memberikan antigen yang diperlukan untuk merangsang sistem kekebalan (Freund, 1956).

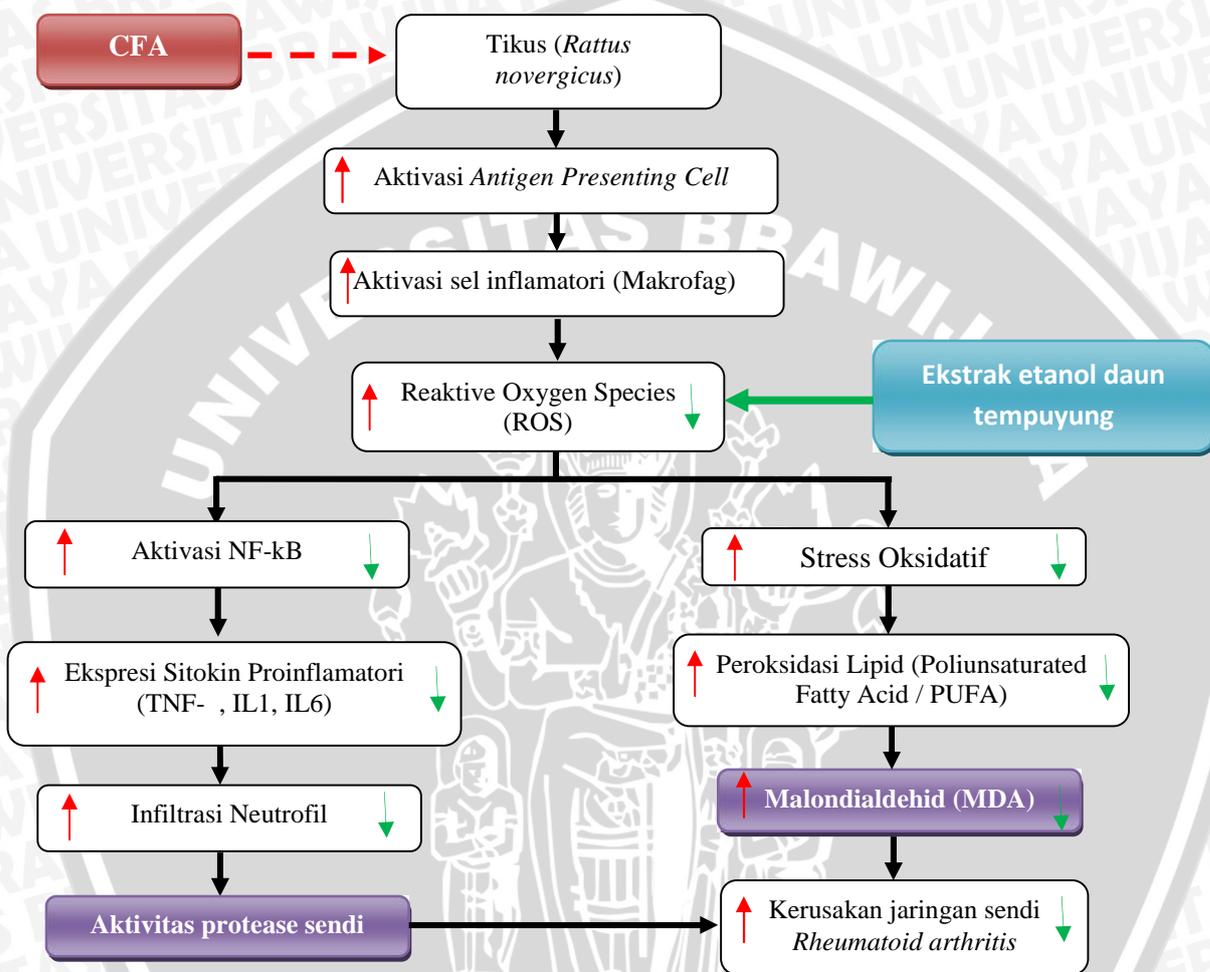
Injeksi antigen dalam CFA menginduksi respon Th1, lebih dominan bila dibandingkan dengan injeksi di *Incomplete Freund Adjuvant* (IFA),

yang tidak memiliki komponen mikobakteri dan menginduksi respon Th2. Komponen penting dari respon CFA adalah reaksi inflamasi yang intens di lokasi pengendapan antigen (Freund, 1956).



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :

- : Induksi
- : Terapi
- : Variabel yang diamati
- : Patomekanisme
- : Induksi
- : Menghambat
- : Pengaruh Induksi
- : Pengaruh Terapi



Complete Freund's Adjuvant (CFA) yang masuk akan menyebabkan aktivasi *Antigen presenting cell* (APC) berupa sel dendrit yang merupakan *innate immune system*. APC akan mempresentasikan antigen ke permukaan sel sehingga dapat dikenali oleh sel limfosit T *helper* (Th), sel Th kemudian akan mensekresikan IFN- γ yang mana akan mengaktifkan makrofag. Aktivasi makrofag akan memicu peningkatan aktivitas dan produksi ROS (Konturek *et al*, 2003). *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang terlepas dapat menyebabkan ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan sehingga menimbulkan stress oksidatif. Radikal bebas akan bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh (PUFA) penyusun membran sel sehingga terjadi peroksidasi lipid yang menghasilkan produk aldehida berupa malondialdehid (MDA). Terbentuknya Malondialdehida (MDA) merupakan *biomarker* terjadinya kerusakan sendi akibat reaksi peroksidasi lipid dan pertanda adanya penyakit *Rheumatoid arthritis*.

Peningkatan produksi ROS akan menyebabkan aktivasi NF-kB dan fosforilasi I κ B (Campbell *et al.*, 2006). Menurut Chevion *et al* (2003) ROS menginisiasi cascade serin kemudian menyebabkan terjadinya fosforilasi I κ B (penambahan fosfat pada I κ B). Hal tersebut menyebabkan ikatan NF-kB dengan I κ B terlepas, sehingga NF-kB berpindah ke dalam inti sel (nukleus). Nuklear faktor-kB (NF-kB) merupakan faktor transkripsi yang mengatur ekspresi gen-gen imun dan respon inflamasi seperti sitokin proinflamatori, kemokin, enzim inflamasi dan molekul adhesi. Pelepasan sitokin

proinflamatori memicu aktivasi dan migrasi neutrofil serta pelepasan protease (enzim proteolitik) (Zhang *et al.*, 2001).

Daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) mengandung senyawa flavonoid yang bersifat antioksidan. Senyawa tersebut akan menghambat oksidasi dengan cara menangkap radikal bebas, mereduksi, mendonorkan atom hidrogen dan meredam oksigen singlet hingga jumlah oksidan dan antioksidan seimbang (Kumaran dan Karunakaran, 2007). Efek flavonoid sebagai antioksidan dapat menstabilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) melalui reaksi dengan senyawa reaktif dari radikal sehingga radikal menjadi inaktif (Nijveldt *et al.*, 2001).

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis penelitian ini adalah :

1. Pengaruh terapi ekstrak daun tempuyung dapat menurunkan kadar MDA pada tikus (*Rattus norvegicus*) model *rheumathoid arthritis* hasil induksi CFA.
2. Pengaruh terapi ekstrak daun tempuyung dapat menurunkan aktivitas protease sendi pada tikus (*Rattus norvegicus*) model *rheumathoid arthritis* hasil induksi CFA.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan dilaboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Faal Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Biomedik Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2015 hingga Oktober 2015.

4.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar dengan umur 2 bulan dan memiliki berat badan 200 g. Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Besar sampel dihitung dengan menggunakan rumus (Kusriningum, 2008):

$t(n-1)$	15
$5(n-1)$	15
$5n - 5$	15
$5n$	20
n	4

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk lima perlakuan diperlukan jumlah sampel atau ulangan paling sedikit empat kali dalam setiap kelompok, sehingga penelitian ini menggunakan hewan coba sebanyak 20 ekor tikus yang mana masing-masing kelompok menggunakan empat ekor tikus.

4.3 Rancangan Penelitian

Tabel 4.1. Rancangan kelompok penelitian

Variabel yang diamati	Ulangan			
	1	2	3	4
Kadar MDA dan Aktivitas protease Sendi				
Kelompok kontrol negatif				
Kelompok kontrol positif				
Kelompok T1 (terapi 50 mg/kg BB)				
Kelompok T2 (terapi 100 mg/kg BB)				
Kelompok T3 (terapi 200 mg/kg BB)				

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, masing-masing perlakuan terdiri dari 4 ekor hewan coba, yaitu kelompok kontrol hewan coba sehat (Kontrol -) yang merupakan hewan coba tanpa perlakuan, kelompok kontrol positif (Kontrol +) diinjeksi dengan CFA sebanyak 0.1 ml pada hari ke-1 dan 0,05 ml pada hari ke-8, kelompok terapi satu (T1) diinjeksi dengan CFA sebanyak 0.1 ml pada hari ke-1 dan 0,05 ml pada hari ke-8 kemudian diterapi dengan dosis 50 mg/kg BB pada hari ke-16 sampai hari ke-29, kelompok terapi dua (T2) diinjeksi dengan CFA sebanyak 0.1 ml pada hari ke-1 dan 0,05 ml pada hari ke-8 kemudian diterapi dengan

dosis 100 mg/kg BB pada hari ke-16 sampai hari ke-29, dan kelompok terapi tiga (T3) diinjeksi dengan CFA sebanyak 0.1 ml pada hari ke-1 dan 0,05 ml pada hari ke-8 kemudian diterapi dengan dosis 200 mg/kg BB pada hari ke-16 sampai hari ke-29. Rancangan kelompok penelitian dapat dilihat pada tabel 4.1. Pada hari ke-30 tikus dibedah, diambil serum dan jaringan sendinya (Lampiran 3).

4.4 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- Variabel bebas : Pemberian CFA dan pemberian terapi ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.).
- Variabel tergantung : Kadar MDA (Malondialdehida) dan Aktivitas protease sendi.
- Variabel kendali : Hewan coba strain Wistar jantan, berat badan, umur, pakan pellet, minum, suhu kandang, kelembaban kandang.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus, spuit 5 mL, spuit 1 mL, gunting, objek glass, scalpel, mortar, microtube, water bath 100°C, vortex, kertas saring, tabung reaksi 250 mL, tabung reaksi 10 mL, spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601*, *Omron CompAir Compressor Nebulizer*, micropipet, mortar dan Freezer.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), CFA, fosfat buffer saline (PBS), aquades, Na Phys, TCA 100 %, Standar MDA, Na-Thio 1%, pasir kuarsa, PBST-PMSF, Tris-HCL, etanol absolut, Kasein, larutan baku tirosin, NaCl fisiologis 0,9%, alkohol 70%, alkohol 90%, alkohol 95%, chloroform, alkohol absolut dan metanol.

4.6 Tahapan Penelitian

Tahapan dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut:

- Persiapan Hewan Coba
- Induksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA)
- Ekstraksi Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis L.*)
- Terapi Ekstrak Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis L.*)
- Euthanasi hewan coba, pengambilan serum dan Jaringan Sendi
- Pengukuran Kadar MDA
- Pengukuran Aktivitas Protease

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar sebanyak 20 ekor yang diperoleh dari Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, Malang dengan umur 2 bulan dan berat badan rata-rata 200 g. Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari dengan pemberian pakan berupa ransum basal standar *Association of Analytical*

Communities (AOAC) (2005) dengan komposisi karbohidrat, protein 10%, lemak 3%, mineral, vitamin, dan air 12%. Rata-rata konsumsi pakan tikus perhari (5 g/100 g BB/Hari) dan diberikan air minum adlibitum.

Tikus Masing-masing kelompok perlakuan ditempatkan dalam kandang berupa bak plastik dengan penutup berbahan kawat berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5 cm. Kandang diletakkan pada ruangan yang bebas kegaduhan, polutan, berventilasi cukup dengan suhu optimum 22 - 24°C dan kelembaban udara 50 - 60% (Asrini, 2013). Hewan coba telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan No. 412-KEP-UB.

4.7.2 Induksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA)

Sebanyak 20 ekor hewan coba (*Rattus norvegicus*) strain wistar dikelompokkan menjadi 5 kelompok dengan masing-masing kelompok berjumlah 4 ekor. Kelompok kontrol negatif (kelompok tikus sehat) tidak diberi perlakuan, sedangkan kelompok kontrol positif, T1, T2, dan T3 dibuat model *rheumatoid arthritis* dengan diinduksi Adjuvant Arthritis (CFA) yang telah dilaporkan sebagai model eksperimen oleh Prabowo pada tahun 2005. Tikus dibuat model *rheumatoid arthritis* dengan cara diinduksi CFA sebanyak 0,1 ml pada daerah *Coccygeal* pada hari ke-1 dan diinduksi kembali sebanyak 0,05 ml dibagian *metatarsophalangeal extremitas caudal sinister* dan *dexter* pada hari ke-8.

4.7.3 Ekstraksi Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis L.*)

Simplisia diperoleh dari daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) yang dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Ekstrak daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) dibuat sesuai dosis masing-masing terapi. Ekstraksi ini menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Maserasi adalah metode ekstraksi dengan prinsip pencapaian kesetimbangan konsentrasi, menggunakan pelarut yang direndamkan pada simplisia dalam suhu kamar. Menyiapkan daun tempuyung dan pelarutnya dengan perbandingan 1:4 serta alat yang digunakan, dimasukkan daun tempuyung ke dalam erlenmeyer tertutup, lalu dituang ethanol 96% ke dalam erlenmeyer tertutup tersebut, setelah itu dikocok, kemudian didiamkan selama 3 hari, setelah itu disaring ke dalam erlenmeyer vakum menggunakan corong buchner dan pompa vakum, lalu larutan hasil penyaringan tersebut dipekatkan menggunakan rotary evaporator. Pada proses rotary evaporator, hal pertama yang dilakukan adalah mengisi water bath dengan air hingga 2/3 kemudian dinyalakan waterbath sesuai dengan suhu yang didinginkan, lalu dinyalakan water pump untuk mengkondisikan suhu pada kondensor, setelah itu dipasang penampung destilat pada posisi yang benar kemudian klem dengan penjepit besi yang tersedia, dimasukkan sampel kedalam labu alas bulat, kemudian dipasang labu alas bulat dengan kondisi vacuum pump menyala dan kran diujung kondensor tertutup, lalu dinyalakan rotary dengan kecepatan yang diinginkan, setelah itu diturunkan

rotary dengan memutar kekanan handle hingga labu alas bulat tercelup ke dalam water bath, kemudian diangkat rotary ketika telah selesai dan biarkan selama 15 menit, lalu dimatikan dengan urutan: water bath, vaccum pump, rotary, water pump dan cabut semua kabel yang terhubung dengan aliran listrik. (**Lampiran 4**).

4.7.4 Terapi Ekstrak Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis L.*)

Terapi ekstrak daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) pada hewan coba dilakukan menggunakan sonde lambung sebanyak volume dosis per ekor per hari mulai dari hari ke-16 sampai pada hari ke-29 sesuai dengan dosis masing-masing kelompok, yaitu sebagai berikut:

- T1 (Kelompok hewan coba diinjeksi dengan CFA dan diberi terapi ekstrak daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) dengan dosis 50 mg/kg BB).
- T2 (Kelompok hewan coba diinjeksi dengan CFA dan diberi terapi ekstrak daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) dengan dosis 100 mg/kg BB).
- T3 (Kelompok hewan coba diinjeksi dengan CFA dan diberi terapi ekstrak daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) dengan dosis 200 mg/kg BB).

Perhitungan dosis yang diberikan untuk hewan coba telah dilampirkan (**Lampiran 5**).

4.7.5 Eutanasi, Pengambilan serum dan Jaringan Sendi

Eutanasi hewan coba dilakukan pada hari ke-30. Eutanasi hewan coba dilakukan dengan cara dislokasi leher kemudian dilakukan pembedahan. Pembedahan dilakukan pada bagian ekstremitas kaudal sinister dan dexter, tikus diletakan dengan posisi dorsal recumbency kemudian diambil bagian ekstremitas kaudal, diisolasi dan dipotong. Darah diambil melalui intracardial dan dimasukkan pada tabung venoject merah, kemudian dilakukan sentrifus untuk mengambil serumnya. Ekstremitas kaudal sinister dan dexter dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9% kemudian ekstremitas kaudal sinister dimasukkan dalam larutan *Phospat Buffer Saline-azida* (PBS-azida) pH 7,4. (Lampiran 6)

4.7.6 Pengukuran Kadar Malondialdehid (MDA)

a. Penentuan Kurva Standar MDA

Tahapan yang dilakukan untuk menentukan kurva standar MDA yaitu larutan stok MDA dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 µg/ml diambil masing-masing 100 µl, dimasukkan dalam microtube yang berbeda. Kemudian ditambahkan 550 µl akuades. Masing-masing tabung yang berisi 650 µl larutan ditambahkan 100 µl TCA 10%, 250 µl HCl 1 N dan 100 µl Na-Thio 1%. Campuran dari berbagai macam senyawa tersebut dijadikan satu dan dihomogenkan menggunakan vortex. Tabung ditutup dengan menggunakan plastik dan diberi lubang kecil. Tabung diinkubasi

pada penangas air dengan suhu 100°C selama 30 menit kemudian didinginkan pada suhu ruang. Larutan standar kemudian dibaca pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer (*Shimadzu UV-visible spechtofotometer UV-1601*) Kurva standar MDA diperoleh dari persamaan regresi antara absorbansi (y) dan konsentrasi MDA (x) (Amin,2009) (**Lampiran 7**).

b. Pengukuran Kadar MDA

Serum yang didapat dari darah diambil $100\ \mu\text{l}$ dan dimasukkan kedalam microtube. Kemudian ditambahkan akuades sebanyak $550\ \mu\text{l}$, TCA $100\ \mu\text{l}$, dan dihomogenkan menggunakan vortex. Kemudian ditambahkan Na-Thio 1% sebanyak $100\ \mu\text{l}$ dan kembali dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Tabung ditutup menggunakan plastik dan diberi lubang kecil. Tabung diinkubasi pada penangas air dengan suhu 100°C selama 30 menit kemudian didinginkan pada suhu ruang. Larutan standar kemudian dibaca pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer (*Shimadzu UV-visible spechtofotometer UV-1601*). Kurva standar MDA diperoleh dari persamaan regresi antara absorbansi (y) dan konsentrasi MDA (x) (Amin, 2009) (**Lampiran 7**).

4.7.7 Pengukuran Aktivitas Protease

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Tirosin

Sebanyak 1 ml larutan standar tirosin $10\ \mu\text{g/ml}$ diukur absorbansi pada rentang panjang gelombang 230-320 nm menggunakan spektro-

fotometer UV-Vis dan dicari absorbansi maksimum. Absorbansi paling tinggi dari rentang panjang gelombang tersebut merupakan panjang gelombang maksimum dan digunakan untuk membuat kurva baku tirosin dan pengukuran absorbansi sampel. (**Lampiran 8**).

b. Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Disiapkan 10 labu ukur 10 ml dan masing-masing diisi dengan larutan baku tirosin 20 $\mu\text{g/ml}$ sebanyak 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 dan 10 ml untuk membuat larutan standar tirosin 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 dan 20 $\mu\text{g/ml}$. Kemudian ditambah akuades sampai tanda batas lalu ditutup dan dikocok sampai homogen. Masing-masing 1 ml larutan standar tirosin pada konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 dan 20 $\mu\text{g/ml}$ diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh. Hasil absorbansi dibuat kurva baku tirosin. Blanko yang digunakan adalah akuades.

c. Isolasi Protease

Sendi 1 g yang diisolasi dari *metatarsophalangeal* dan *digiti* dipotong kecil dengan menggunakan gunting bedah, ditambah larutan PBS-Tween : PMSF (9:1) sebanyak 1 ml, ditambah sedikit pasir kuarsa dan digerus dengan menggunakan mortar dingin yang diletakkan di atas balok es. Kemudian homogenat ditambah larutan PBS-Tween : PMSF (9:1) sebanyak 4 ml dan dipindahkan ke dalam tabung polipropilen yang telah disterilisasi dengan autoklaf. Kemudian dihomogenkan selama 10 menit, disonikasi dengan sonikator selama 10 menit dan disentrifugasi

selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Kemudian supernatan diambil dan ditambah etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama semalam pada suhu 4°C hingga terbentuk endapan. Kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm, diambil pellet dan dikeringkan hingga bau etanol hilang. Kemudian pellet ditambah dengan larutan Tris-HCl 20 mM pH 6,8 dingin dengan perbandingan volume 1:1 dan dilakukan homogenasi.

d. Pengukuran Aktivitas Protease Hasil Isolasi dari Sendi

Sebanyak 200 µl kasein 500 µg/ml dimasukkan dalam tabung *microtube*, ditambah 300 µl larutan buffer fosfat pH 7 dan 100 µl enzim protease hasil isolasi, kemudian didiamkan selama 60 menit pada suhu 37°C di dalam inkubator. Kemudian ditambahkan 400 µl larutan TCA 4% (b/v) dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil 200 µl dan diencerkan 5 kali volume sampel dengan buffer fosfat lalu diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum tirosin yang diperoleh. Blanko yang digunakan dibuat dengan prosedur penentuan aktivitas, tetapi larutan kasein diganti dengan penambahan akuades.

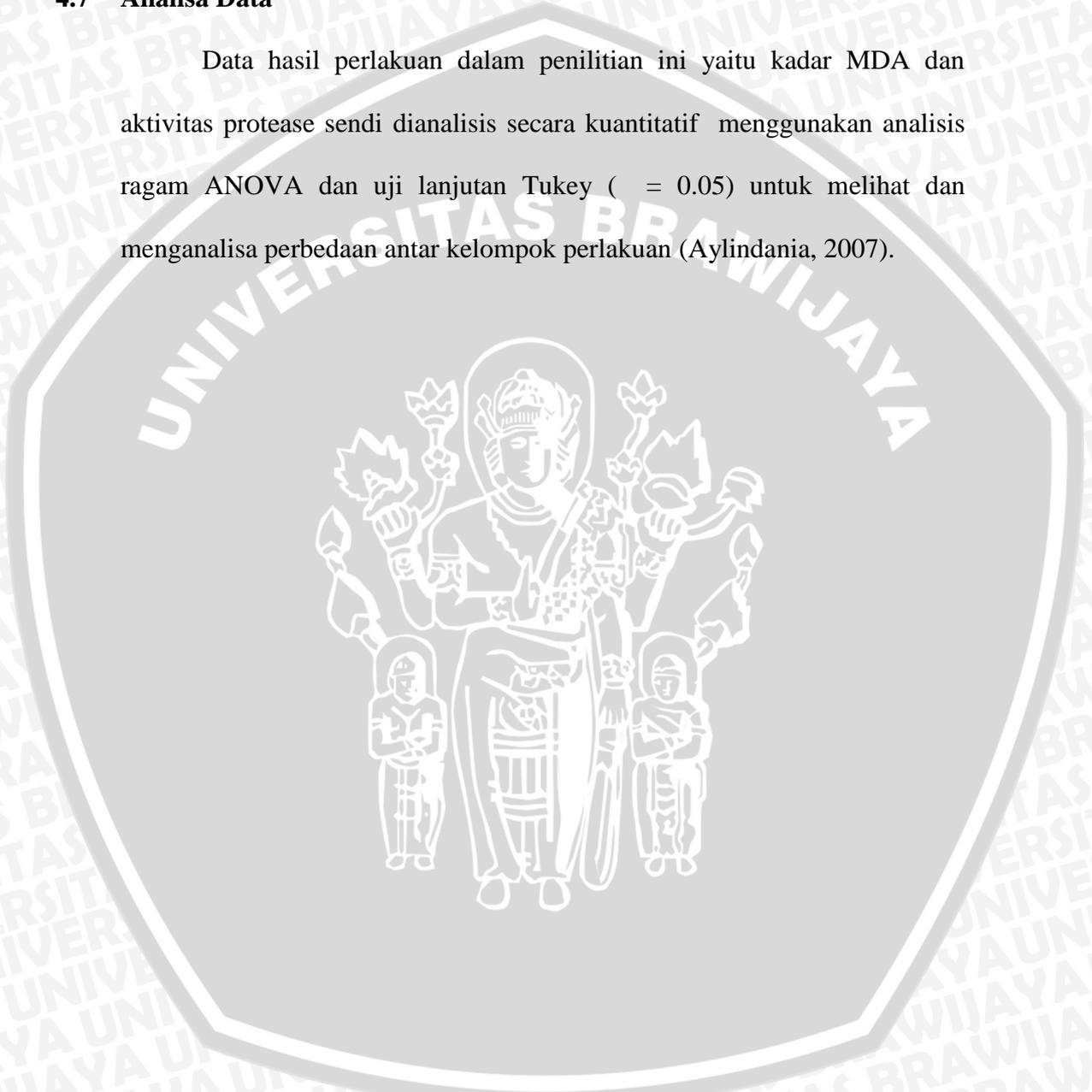
Aktivitas protease kemudian diukur dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{pxq} \times fp$$

Dimana :
v = volume total sampel (mL)
q = waktu inkubasi (mL)
 f_p = faktor pengenceran
p = jumlah enzim (mL)

4.7 Analisa Data

Data hasil perlakuan dalam penelitian ini yaitu kadar MDA dan aktivitas protease sendi dianalisis secara kuantitatif menggunakan analisis ragam ANOVA dan uji lanjutan Tukey ($\alpha = 0.05$) untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan (Aylindania, 2007).



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L) Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) pada Hewan Model *Rheumatoid Arthritis*.

Hasil pengukuran kadar malondialdehida tikus putih (*Rattus norvegicus*) model *Rheumatoid arthritis* yang diukur dengan metode TBA, didapatkan data seperti yang tertera pada Tabel 5.1. Malondialdehida merupakan produk akhir dari peroksidasi lipid akibat rusaknya membran sel oleh radikal bebas. Kadar MDA berbanding lurus dengan jumlah radikal bebas dalam jaringan. Malondialdehida merupakan biomarker kerusakan sel akibat radikal bebas. Pemberian induksi CFA akan mengakibatkan peningkatan keadaan *Rheumatoid Arthritis* yang ditandai dengan peningkatan kadar Malondialdehida (MDA) (Dong, 2009). Pengukuran kadar MDA menggunakan uji TBA.

Tabel 5.1 Kadar Malondialdehida (MDA) serum pada tikus (*Rattus norvegicus*)

Perlakuan	Rata-rata kadar Malondialdehida (MDA) mg/ml	Kadar MDA (%)
		Peningkatan Dari Kontrol Negatif
Kontrol Negatif (K-)	294,312 ±0,426 ^a	-
Kontrol Positif (K+)	621,937±0,746 ^d	111,318
Terapi 50 mg/kg BB	534,937±0,688 ^c	81,75
Terapi 100 mg/kg BB	449,375±0,520 ^b	52,67
Terapi 200 mg/kg BB	294,125±0,661 ^a	0,067

Keterangan : Perbedaan notasi a, b, c, dan d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan (p<0,05).

Hasil analisis statistika (One-Way ANOVA) menggunakan SPSS for Windows menunjukkan bahwa pengaruh terapi ekstrak daun tempuyung pada hewan model *Rheumatoid Arthritis* memberikan pengaruh yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap kadar MDA (Tabel 5.1 dan Lampiran 14). Hasil uji lanjutan BNJ menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol positif dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok terapi dosis 50 mg/kg BB, dan 100 mg/ BB. Kelompok terapi 200 mg/kg BB menunjukkan hasil tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan kelompok kontrol negatif, sehingga dosis 200 mg/kg BB adalah dosis terbaik untuk menurunkan kadar MDA.

Berdasarkan hasil perhitungan kadar MDA pada Tabel 5.1, kelompok kontrol negatif menunjukkan kadar MDA sebesar $294,312 \pm 0,426$ mg/mL. Kadar MDA pada kelompok kontrol negatif merupakan respon fisiologis tubuh yang dapat distabilkan oleh antioksidan endogen dan kadar MDA ini digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya peningkatan atau penurunan yang terjadi karena pengaruh perlakuan dikarenakan sampai saat ini belum ada standart normal untuk kadar MDA. Kadar MDA merupakan indikator adanya radikal bebas yang diakibatkan oleh proses peroksidasi lipid. Secara normal, radikal bebas terdapat dalam tubuh dalam jumlah kecil sebagai akibat proses respirasi dan metabolisme dalam tubuh (Chatherine and Lester Packer, 2003).

Kelompok kontrol positif atau kelompok hasil induksi CFA menunjukkan kadar MDA berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif

dan terjadi peningkatan kadar malondialdehida terhadap kelompok kontrol negatif sebesar 111,318 % (**Tabel 5.1 dan Lampiran 14**). Peningkatan kadar MDA pada tikus model *rheumatoid arthritis* dikarenakan induksi CFA yang menyebabkan peningkatan radikal bebas. Peningkatan kadar MDA induksi CFA tersebut sesuai dengan penelitian Valko pada tahun 2006 bahwa induksi CFA pada tikus (*Rattus norvegicus*) akan memicu terbentuknya radikal bebas dan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Radikal bebas dapat merusak lipid pada membran sel, DNA, dan protein yang menyebabkan stres oksidatif (Valko, 2006). Adanya stress oksidatif menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid dengan produk akhir berupa malondialdehida (MDA). Peningkatan ROS berbanding lurus dengan peningkatan MDA.

Radikal bebas *Reactive Oxygen Species* (ROS) dihasilkan dari proses fagositosis *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) oleh makrofag serta dihasilkan oleh sel inflamatori (Baratawidjaja, 2013). Proses fagositosis tersebut menghasilkan radikal bebas berupa *reactive oxygen species* (ROS). Produksi ROS yang berlebih memicu terjadinya stress oksidatif yang menyebabkan peroksidasi lipid pada membran sel sehingga terjadi kerusakan pada membran sel tersebut. Peroksidasi lipid merupakan reaksi berantai antara radikal bebas berupa radikal hidroksil (OH) dengan membran lipid yaitu *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) yang menghasilkan produk akhir berupa malondialdehida (MDA) (Khenouf *et al.*, 2010). Malondialdehida digunakan sebagai *marker* adanya stress oksidatif. Stress oksidatif merupakan keadaan dimana jumlah molekul radikal bebas di dalam tubuh berlebih dan

antioksidan endogen tidak mampu untuk menetralkannya. Keadaan stres oksidatif menimbulkan kerusakan oksidatif mulai dari tingkat sel, jaringan hingga ke organ tubuh. Semakin tinggi produksi ROS di dalam tubuh maka semakin tinggi pula tingkat stress oksidatif yang akan ditunjukkan dengan peningkatan kadar MDA.

Rata-rata kadar malondialdehida (MDA) dengan pengaruh terapi ekstrak daun tempuyung dosis 50 mg/kg BB yaitu sebesar $534,937 \pm 0,688$. Rata-rata kadar tersebut berbeda nyata dengan rata-rata kadar MDA pada kelompok tikus kontrol negatif dan kontrol positif dimana kontrol negatif memiliki rata-rata kadar MDA $294,312 \pm 0,426$ dan kontrol positif memiliki rata-rata kadar MDA sebesar $621,937 \pm 0,746$. Pemberian terapi daun tempuyung (*Sonchus arvensis L*) dengan dosis 50 mg/kg BB memiliki peningkatan kadar MDA sebesar 81,75 % terhadap kontrol negatif, sedangkan peningkatan kadar MDA dari kelompok tikus kontrol negatif ke kontrol positif yaitu sebesar 111,318% sehingga disimpulkan pemberian terapi daun tempuyung (*Sonchus arvensis L*) dengan dosis 50 mg/kg BB belum cukup efektif digunakan sebagai terapi .

Rata-rata kadar malondialdehida (MDA) dengan pengaruh terapi ekstrak daun tempuyung dosis 100 mg/kg BB yaitu sebesar $449,375 \pm 0,520$. Rata-rata kadar tersebut berbeda nyata dengan rata-rata kadar MDA yang ada pada kelompok tikus kontrol negatif dan juga kontrol positif. Pemberian terapi daun tempuyung (*Sonchus arvensis L*) dengan dosis 100 mg/kg BB memiliki peningkatan kadar MDA sebesar 52,66 % terhadap kontrol negatif,

sedangkan peningkatan kadar MDA dari kelompok tikus kontrol negatif ke kontrol positif yaitu sebesar 111,318% sehingga disimpulkan pemberian terapi daun tempuyung (*Sonchus arvensis L*) dengan dosis 100 mg/kg BB juga belum cukup efektif digunakan sebagai terapi .

Rata-rata kadar malondialdehida (MDA) dengan pengaruh terapi ekstrak daun tempuyung dosis 200 mg/kg BB yaitu sebesar $294,125 \pm 0,661$. Rata-rata kadar tersebut berbeda nyata dengan rata-rata kadar MDA yang ada pada kelompok tikus kontrol positif yang memiliki nilai rata-rata kadar MDA sebesar $621,937 \pm 0,746$, namun tidak berbeda nyata dengan tikus kelompok kontrol negatif yang memiliki nilai rata-rata kadar MDA sebesar $294,312 \pm 0,426$. Pengaruh terapi daun tempuyung (*Sonchus arvensis L*) dengan dosis 200 mg/kg BB memiliki peningkatan kadar MDA sebesar 0,067 % terhadap kontrol negatif, dengan demikian dapat diketahui bahwa ekstrak daun tempuyung dengan dosis 200 mg/kg BB merupakan dosis terbaik dari ekstrak daun tempuyung sebagai terapi *rheumatoid arthritis*.

Penurunan kadar MDA yang terjadi dikarenakan dalam ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L*) mengandung zat aktif berupa flavonoid yang berperan sebagai antioksidan. Antioksidan dalam daun tempuyung akan mampu menyeimbangkan radikal bebas. Keseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan mempengaruhi stres oksidatif sehingga berpengaruh terhadap penurunan kadar MDA (Trilaksani, 2005).

Antioksidan sudah dikenal sebagai senyawa untuk melawan suatu radikal bebas. Antioksidan dinyatakan sebagai senyawa yang secara nyata

dapat memperlambat oksidasi (Trilaksani, 2005). Antioksidan menurut Kunchayo dan Sunardi (2007) adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut dapat diredam. Induksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) pada penelitian ini akan meningkatkan kadar radikal bebas didalam tubuh, hal tersebut akan menyebabkan ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan endogen sehingga menyebabkan stres oksidatif. Oleh karena itu tubuh membutuhkan antioksidan eksogen untuk menyeimbangkan kadar radikal bebas didalam tubuh diantaranya menggunakan ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*).

Daun tempuyung mengandung senyawa flavonoid yang bersifat antioksidan. Senyawa tersebut akan menghambat oksidasi dengan cara menangkap radikal bebas, mereduksi, mendonorkan atom hidrogen dan meredam oksigen singlet hingga jumlah oksidan dan antioksidan seimbang (Kumaran dan Karunakaran, 2007). Efek flavonoid sebagai antioksidan dapat menstabilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) melalui reaksi dengan senyawa reaktif dari radikal sehingga radikal menjadi inaktif (Nijveldt *et al.*, 2001). Radikal bebas yang inaktif tidak akan bereaksi dengan asam lipid tidak jenuh sehingga kadar MDA akan menurun.

5.2 Pengaruh Terapi Ekstrak Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis L*) terhadap Aktivitas Protease Sendi pada Tikus (*Rattus norvegicus*) model *Rheumatoid Arthritis*.

Pengujian aktivitas protease dari jaringan sendi tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan untuk mengetahui efek terapi ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L*) terhadap kesembuhan inflamasi pada hewan model *Rheumatoid arthritis* akibat paparan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA).

Hasil pengukuran aktivitas protease pada jaringan sendi tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diukur dengan metode Walter didapatkan data seperti yang tertera pada Tabel 5.2. Aktivitas protease dinyatakan dalam unit. Satu unit aktivitas protease dapat didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mampu menghasilkan satu mikromol tirosin per menit. Pengukuran aktivitas protease dilakukan pada kondisi optimum yaitu PH 6,5, suhu 37°C dan waktu inkubasi 60 menit.

Tabel 5.2 Aktivitas protease sendi tikus (*Rattus norvegicus*) ($p < 0,05$)

Kelompok	Rata-rata Aktivitas Protease ($\mu\text{mol/ml.menit}$)	Aktivitas Protease (%)
		Peningkatan dari kontrol negatif
Kontrol negatif (K-)	0,119 \pm 0,009 ^a	
Kontrol positif (K+)	0,214 \pm 0,014 ^d	80 %
Terapi 50 mg/kgBB	0,190 \pm 0,009 ^c	59 %
Terapi 100 mg/kgBB	0,159 \pm 0,007 ^b	33 %
Terapi 200 mg/kgBB	0,138 \pm 0,006 ^a	15 %

Keterangan : Perbedaan notasi a, b, c, dan d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$).

Hasil uji statistik (One-Way ANOVA) menggunakan SPSS menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) antar kelompok perlakuan. Hal tersebut menunjukkan bahwa setiap perlakuan pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) memberikan pengaruh yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap aktivitas protease sendi (**Lampiran 11**). Hasil uji lanjutan BNJ menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol positif dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok terapi dosis 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB. Namun kelompok terapi 200 mg/kg BB tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan kelompok kontrol negatif, sehingga dosis 200 mg/kg BB merupakan dosis terbaik untuk menurunkan aktivitas protease.

Berdasarkan hasil perhitungan dari aktivitas protease pada Tabel 5.2, kelompok kontrol negatif menunjukan nilai aktivitas protease sebesar $0,119 \pm 0,009 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$. Protease merupakan enzim yang mengkatalisis pemecahan protein melalui hidrolisis ikatan peptida dari suatu molekul polipeptida. Aktivitas protease pada kondisi normal terdapat pada hewan yang merupakan respon fisiologis normal tubuh untuk membantu neutrofil dalam fagositosis dengan memecah protein dari sel yang mengalami kerusakan. Nilai aktivitas protease pada kelompok kontrol digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya peningkatan atau penurunan yang terjadi karena pengaruh perlakuan, hal tersebut dikarenakan sampai saat ini belum didapatkan standar normal aktivitas protease.

Kelompok kontrol positif atau kelompok yang diinduksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif dan terjadi peningkatan aktivitas protease terhadap tikus kontrol negatif sebesar 80 % (**Tabel 5.2 dan Lampiran 11**). Peningkatan aktivitas protease tersebut terjadi dikarenakan enzim protease dalam tubuh berperan dalam perbaikan sel yang mengalami kerusakan akibat inflamasi karena paparan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA). Akan tetapi peningkatan aktivitas protease pada jaringan yang mengalami inflamasi menyebabkan aktivitas protease berlebih dan tidak terkendali, sehingga menyebabkan kerusakan jaringan (Baratawijaya, 2013).

Radikal bebas *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) dihasilkan dari proses fagositosis *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) oleh makrofag serta dihasilkan oleh sel inflamatori (Baratawidjaja, 2013). Stress oksidatif oleh radikal bebas akan dapat menyebabkan peningkatan aktivitas protease. Produksi ROS yang berlebih akan mengaktifasi NF- B yang selanjutnya akan melepaskan sitokin, hal ini dapat memicu terjadinya infiltrasi neutrofil sehingga terjadi sekresi protease. Aktivitas protease yang tidak terkendali akan menyebabkan pemutusan ikatan peptida yang terdapat pada protein penyusun membran sel. Hal ini dapat menyebabkan terjadinya destruksi jaringan (Ninik, dkk., 2012).

Enzim protease yang terlibat dalam kerusakan jaringan adalah protease serin. Protease serin merupakan jenis protease yang tersimpan dalam neutrofil dan berperan sebagai pertahanan terhadap antigen maupun mikroba

dengan mekanisme penelanan. Pada kondisi inflamasi, aktivitas protease akan berlebih sehingga terjadi destruksi jaringan (Segal, 2005). Pengukuran aktivitas protease dilakukan untuk mengukur tingkat keparahan inflamasi, semakin tinggi nilai aktivitas protease maka semakin parah inflamasi yang terjadi.

Rata-rata aktivitas protease sendi dengan pemberian terapi ekstrak daun tempuyung dosis 50 mg/kg BB yaitu sebesar $0,190 \pm 0,009$. Rata-rata aktivitas protease sendi tersebut berbeda nyata dengan rata-rata aktivitas protease sendi yang ada pada kelompok tikus kontrol negatif dan kontrol positif dimana kontrol negatif memiliki rata-rata aktivitas protease sendi $0,119 \pm 0,009$ dan kontrol positif memiliki rata-rata aktivitas protease sendi sebesar $0,214 \pm 0,014$. Pemberian terapi daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L) dengan dosis 50 mg/kg BB memiliki peningkatan aktivitas protease sebesar 59 % terhadap kontrol negatif, sedangkan peningkatan aktivitas protease dari kelompok tikus kontrol negatif ke kontrol positif yaitu sebesar 80% sehingga dapat diketahui bahwa pemberian terapi ekstrak daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L) dengan dosis 50 mg/kg BB belum cukup efektif digunakan sebagai terapi.

Rata-rata aktivitas protease sendi dengan pemberian terapi ekstrak daun tempuyung dosis 100 mg/kg BB yaitu sebesar $0,159 \pm 0,007$. Rata-rata aktivitas protease sendi tersebut berbeda nyata dengan rata-rata aktivitas protease sendi yang ada pada kelompok tikus kontrol negatif dan kontrol positif. Pemberian terapi daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L) dengan dosis

100 mg/kg BB memiliki peningkatan aktivitas protease sebesar 33 % terhadap kontrol negatif, sedangkan peningkatan aktivitas protease dari kelompok tikus kontrol negatif ke kontrol positif yaitu sebesar 80% sehingga dapat diketahui bahwa pemberian terapi ekstrak daun tempuyung (*Sonchus arvensis L*) dengan dosis 100 mg/kg BB belum cukup efektif digunakan sebagai terapi.

Rata-rata aktivitas protease sendi dengan pemberian terapi ekstrak daun tempuyung dosis 200 mg/kg BB yaitu sebesar $0,138 \pm 0,006$. Rata-rata aktivitas protease sendi tersebut berbeda nyata dengan rata-rata aktivitas protease sendi yang ada pada kelompok tikus kontrol positif yang memiliki nilai rata-rata aktivitas protease sendi sebesar $0,214 \pm 0,014$, namun tidak berbeda nyata dengan tikus kelompok kontrol negatif yang memiliki nilai rata-rata aktivitas protease sendi sebesar $0,119 \pm 0,009$. Pemberian terapi ekstrak daun tempuyung (*Sonchus arvensis L*) dengan dosis 200 mg/kg BB memiliki peningkatan aktivitas protease sebesar 15 % terhadap kontrol negatif, dengan demikian dapat diketahui bahwa ekstrak daun tempuyung dengan dosis 200 mg/kg BB merupakan dosis terbaik dari ekstrak daun tempuyung sebagai terapi *rheumatoid arthritis*.

Penurunan aktivitas protease menunjukkan bahwa pemberian terapi dengan menggunakan ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L*) dapat mengakibatkan penurunan inflamasi. Hal tersebut dikarenakan dalam ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L*) mengandung zat aktif berupa flavonoid yang berperan sebagai antioksidan. Flavonoid berperan

sebagai antioksidan dengan mendonorkan atom hydrogen kepada radikal bebas sehingga ROS tidak akan mengaktivasi Nf-kB sehingga pelepasan sitokin proinflamatori seperti TNF- dan IL-1 akan dapat dihambat, hal tersebut menyebabkan inflamasi yang terjadi pada sinovial menurun karena produksi mediator inflamasi didalam jaringan semakin berkurang. Penurunan produksi sitokin proinflamatori menyebabkan penurunan aktivitas neutrofil di jaringan sehingga terjadi penurunan produksi dan aktivitas enzim protease. Flavonoid dengan dosis yang tepat mampu menurunkan inflamasi dengan cara menghambat migrasi neutrofil dan edema jaringan. Selain itu flavonoid juga secara selektif mampu menghambat produksi protease serin. Protease serin merupakan salah satu jenis protease yang berperan dalam kerusakan jaringan (Margareth and Miranda, 2009). Dengan demikian pemberian ekstrak etanol daun tempuyung mampu menurunkan aktivitas protease dan mengurangi tingkat keparahan inflamasi.

Penelitian ini menunjukkan bahwa terapi ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L*) mampu menurunkan kadar MDA. Hal tersebut dikarenakan kandungan flavonoid daun tempuyung berperan sebagai antioksidan. Kelompok tikus yang diterapi ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L*) dengan dosis 200 mg/kg BB mengalami kadar MDA tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif. Hasil tersebut didukung dengan penurunan aktivitas protease setelah dilakukan terapi ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L*). Dengan demikian pemberian ekstrak etanol daun tempuyung dengan dosis 200 mg/kg BB dapat

menurunkan tingkat keparahan inflamasi pada hewan model *Rheumatoid arthritis* yang ditunjukkan dengan penurunan kadar MDA dan penurunan aktivitas protease sendi.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan suatu kesimpulan bahwa :

1. Pengaruh terapi ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L*) menurunkan kadar MDA pada hewan model *Rheumatoid Arthritis* (RA) hasil induksi CFA.
2. Pengaruh terapi ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L*) menurunkan aktivitas protease sendi pada hewan model *Rheumatoid Arthritis* (RA) hasil induksi CFA.
3. Dosis terbaik ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L*) untuk terapi *Rheumatoid Arthritis* (RA) adalah 200 mg/kg BB berdasarkan penurunan kadar MDA dan penurunan aktivitas protease sendi.

6.2 SARAN

Diperlukan penelitian lebih lanjut akan varian dosis ekstrak etanol daun tempuyung yang dapat digunakan untuk terapi *Rheumatoid Arthritis* (RA) pada *pet animal*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ackerman and Rosai. 2004. *Surgical Bone AndJoint: Rheumatoid arthritis*. 9th. New York. Mosby . p. 2202
- Alamanos, Y., & Drosos, A.A., 2005, *Epidemiology of Adult Rheumatoid Arthritis*, *Autoimmunity Reviews*, 4(3):130-6
- Andriani, Y. 2007. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Betaglukan dari *Saccharomyces Cerevisiae* . *Jurnal Gradien 3 (1)*: 226-230.
- Angelo, Kenneth G. ,Saag and ,Jeffrey R. Curtis. 2006. *Treatment of rheumatoid arthritis*.University of Alabama at Birmingham, Birmingham.
- Arend, W.P. 2012. The innate Immune System in Rheumatoid Arthritis. 44 2224-223
- Arthritis Foundation, 2008, News from Arthritis Foundation, http://www.arthritis.org/files/images/newsroom/mediakits/Rheumatoid_Arthritis_Fact_Sheet.pdf, diakses pada tanggal 7 Oktober 2014.
- Arthritis Foundation. 2012. Data Prevalence of Arthritis. <http://id.prmob.net/radangsendi/amerika-serikat/osteoarthritis-718689.html>. Diakses pada tanggal 4 Oktober 2014.
- Asrini, R. 2013. *Aktivitas Enzim Protease Dan Gambaran Histopatologi Ginjal Pada Tikus (Rattus norvegicus) Fibrosis Ginjal Hasil Induksi Streptokinase [SKRIPSI]*. Program Studi Pendidikan Dokter Hewan. PKHUB. Malang.
- Aylindania, N. 2007. *Pengaruh Pemberian Teh Hijau (Camelia sinensis L.) Terhadap Aktivitas Radikal Bebas pada Hepar Mencit (Mus musculus)Diabetes [SKRIPSI]*. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN. Malang.
- Baratawidjaja, K.G. 2013. *Imunologi Dasar 10th Edition*. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia
- Barus, P. 2009. *Pemanfaatan Bahan Pengawet dan Antioksidan Alami pada Industri Bahan Makanan*. FMIPA. Universitas Sumatra Utara. Medan.
- Catherine A. Rice-evans & lester Packer, 2003. *Flavonoids In Health and Disease*.Marcel Dekker, Inc., USA.

- Campbell K.J. and N.D. Perkins. 2006. Regulation of NF-kappaB Function. *Biochem Soc Symp.* 73:165-180.
- Chen, T., Li, L., & Kochen, M.M., 2005, A Systematic Review: How to Choose Appropriate Health-Related Quality of Life (HRQOL) Measures in Routine General Practice, *Journal of Zhejiang University - SCIENCE B*, 6:936-940.
- Chevion, S., D.S. Moran, Y. Heled, Y. Shani, G. Regrev, B. Abbou, E. Berenshtein, E.R. Stadtman, and Y. Epstein. 2003. Plasma Antioxidants Status and Cell Injury After Severe Physical Exercise. *Proc.Nati.Acad.Sci.USA*, Vol 100, Issue9: 5119-5123.
- Choy E.H. and G.S. Panayi. 2001. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N England J med*;344:907-16
- Clifton O. Bingham. 2007. Rheumatoid arthritis histopatology. <http://www.hopkinsarthritis.org/arthritisinfo/rheumatoid-arthritis/rapathophysiology-2/#histopathology>. Di akses pada tanggal 21 Januari 2015, Malang
- Dong. 2009. The differential expressions of 78-kDa glucose-regulated protein of infiltrating plasma cells in peripheral joints with the histopathological variants of rheumatoid synovitis. Fourth Military Medical University. China
- Droge W. 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.* 82:47-95.
- Edyson. 2003. Pengaruh Pemberian Vitamin C dan E Terhadap Aktifitas Kadar MDA pada Eritrosit Rattus Novergicus Galur Wistar yang Diinduksi Tiroksin. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Engram, Barbara.1998. *Rencana Asuhan Keperawatan Medikal-Bedah*. Jakarta:EGC
- Fauziah. 2013. *Studi Terapi Rumput Laut Coklat (Sargassum Sp.) Terhadap Kadar Mda, Kadar Mmp-3 Dan Perbaikan Histologi Kaki Tikus Artritis Rheumatoid*. Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Malang.
- Freund, J., *Adv. Tuberc. Res.*, 7, 130 (1956)
- Gordon, M.M., Hampson, R., Capell, H.A., & Madhok, R., 2002, Illiteracy in Rheumatoid Arthritis Patients as Determined by the Rapid Estimate of Adult Literacy in Medicine (REALM) Score, *British Society for Rheumatology*, 41:750-754.

Hedrich, H.J. 2006. Taxonomy stock and strains. *J The laboratory Rat*:71-92.

Khennouf S., S.Amira, L. Arrar and A.Baghiani.2010. Effect of Some Phenolic Compounds and Quercus Tannins on Lipid Peroxidation. *J.World Applied Sciences* 8 (9): 1144-1149

Konturek PC, J. Kania, JW. Konturek, A. Nikiforuk, SJ. Konturek and EG. Hahn. 2003. *H. pylori* infection, atrophic gastritis, cytokines, gastrin, COX-2, PGE2 and impaired apoptosis in gastric carcinogenesis. *Med Sci Monit.* 9: SR53-60.

Kumaran, A. and R.J. Karunakaran. 2007. *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT* 40 : 344–352.

Kuncahyo, I. dan Sunardi. 2007. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi, L.) terhadap 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH)*. Fakultas Teknik, Universitas Setia Budi, Yogyakarta.

Lawrence S.G., Z. Musthafa, and A. Seweang. 2000. Radikal Bebas sebagai Prediktor Aterosklerosis pada Tikus Wistar Diabetes Melitus. *Jurnal Cermin Dunia Kedokteran.* 127: 32-33.

Lee, J., N. Koo, and D.B. Min. 2004. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Compre Rev. in Food Sci. and Food Safety.* 3: 21-33.

Lumbanraja, L.B., 2009, *Skrining Fitokimia dan Efek Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Tempuyung (Sonchus arvensis L.) Terhadap Radang Pada Tikus, SKRIPSI, Fakultas Farmasi, Universitas Sumatera Utara, Medan*

Liu. 2010. Increased Expression of MMP is Correlated With Poor Prognosis of Nasopharyngeal Carcinoma. *BMC Cancer Journal* 10 : 1-7

Margareth and Miranda J. Sarachine.2009. Biological Activities of Lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Science.*

Myers P. and D. Armitage. 2004. "*Rattus norvegicus*" *Animal Diversity*. http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_norvegicus.html. Diakses 2 Januari 2015.

Naiola, E., dan Widhyastuti, N. 2002. Isolasi, seleksi dan optimasi produksi protease dari beberapa isolat bakteri. *Hayati* 6:467-473.

- Ninik.A. Aulanni'am. and C. Mahdi. *Efek Terapi Ekstrak Air Daun Kedondong (Lannea coromandelica) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Aktivitas Protease pada Ileum Tikus Putih (Rattus norvegicus) Inflammatory Bowel Disease (IBD) Akibat Paparan Indometasin*. Veterinaria medica journal of Brawijaya University. 2012
- Nijveldt, R.J., E. van Nood, D.E.C. van Hoorn, P.G. Boelens, K. van Norren, and P.A.M. van Leeuwen. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical and Nutrition* 74: 418-425.
- Prabowo S. 2005 *Pengaruh Stresor Dingin Terhadap Proses Keradangan Pada Arthritis Ajuvan: Penelitian Eksperimental Pada Arthritis Ajuvan (Model Hewan Untuk Arthritis Rematoid)*. Disertasi. UNAIR.
- Putri, G.T. dan W. Basuki. 2011. Efek Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) Terhadap Nilai Absolut Neutrofil Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Galur Spargue dawley yang Dipapari Asap Rokok. *Medical Journal of Lampung University*, 2, II.
- Ramani Y.R. 2012. *Antiarthritic Activity of Acetone Extract of Terminalia Chebula*. Berhampur: India.
- Rao, M.M., Tanksale, A.M., Gatge, M.S., and Desphande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol And Mol Biol Rev* 62:597-635.
- Schuna, A.A., in Rheumatoid Arthritis, Dipiro, J.T., Talbert, R.L., Yee, G.C. Matzke, G.R., Wells, B.G. & Posey, L.M., (Eds), 2005, *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*, Sixth Edition, 1671-1683, McGraw Hill, Medical Publishing Division, New York.
- Segal,A.W. 2005. How neutrophils kill microbes.*Annu. Rev. Immunol.* 23, 197-223.
- Simpson, L.J., M. Scott, J. Boyle, and P.G. Gibson. 2005. Differential Proteolytic Enzyme Activity in Eosinophilic and Neutrophilic. The University of Newcastle, Callaghan. Australia. *Am Journal Respir Crit Care Med.* 172(5) : 559-569
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine : Principles and Procedures*. Elsevier Mosby. St. Louis. Missouri. USA.
- Sitanggang, M. dan Dewani, 2006, 33 Ramuan Penakluk Asam Urat, Agromedia Pustaka, Jakarta, 30

Suckow, M.A., H. Steven., and C.L. Frangklin. 2006. *The Laboratory Rat Second Edition*. A volume in American Coolege of Laboratory Animal Medicine. Academic Press.

Trilaksani, W. 2005. *Antioksidan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Valko M. 2006, Free Radical, Metal And Antioxidant In Oxidative Stress Induced Cancer, *J.Chem-BioI, Rusia, edisi 160,p. 1-40*.

Winarto, W.P., 2004, Tempuyung Tanaman Penghancur Batu Ginjal, Argo Media Pustaka, Tangerang

Wirakusumah, L.H. 2005. Fraksinasi dan karakterisasi senyawaaktif flavonoid dari ekstrak kasar metanol rimpang Bangle(*Zingiber cassumar Roxb.*). Skripsi Jurusan Kimia, FMIPA. Bogor: IPB.

Zhang, J., G. Johnston, B. Stebler, and E.T. Keller. 2001. *Hydrogen peroxide activates NFkappaB and the interleukin-6 promoter through NFkappaB-inducing kinase*. *Antioxid Redox Signal* ;3:493-504.



Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 412-KEP-UB

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

PENELITIAN BERJUDUL : TERAPI EKSTRAK DAUN TEMPUYUNG (*Sonicus
arvensis* L.) PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) STRAIN
WISTAR MODEL RHEUMATOID ARTHRITIS TERHADAP
AKTIVITAS PROTEASE HATI DAN EKSPRESI IFN- γ

PENELITI : HILDA YUANTI SYAHRA

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 22 Juni 2015

Ketua Komisi Etik Penelitian

Universitas Brawijaya



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

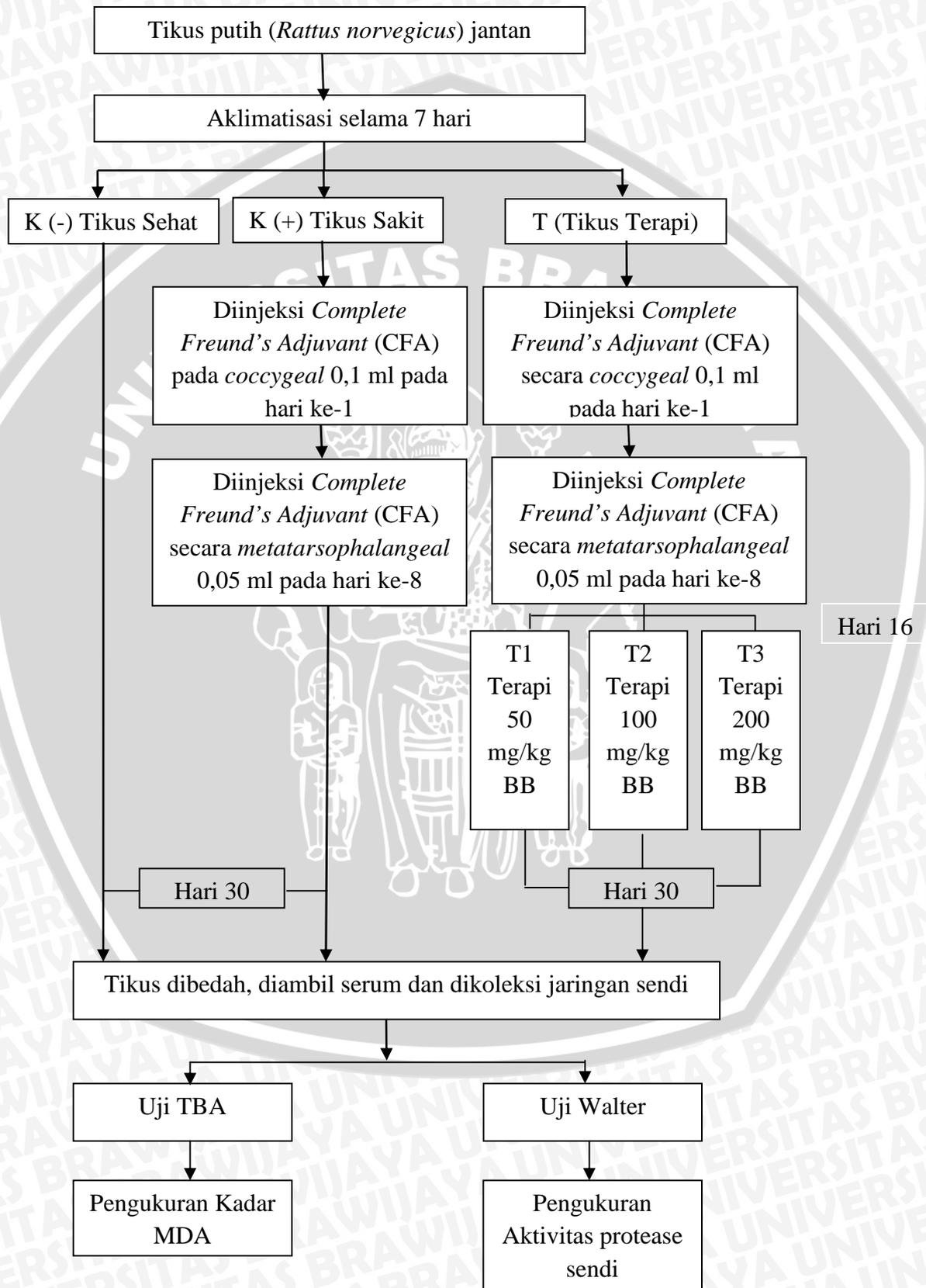
NIP. 19600903 198802 2 001



Lampiran 2. Keterangan Identifikasi Daun Tempuyung (*Shoncus arvensis L.*)

 DINAS KESEHATAN PROPINSI JAWA TIMUR UPT MATERIA MEDICA Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396 Batu (65313) KOTA BATU	
Nomor	: 074 / 435 / 101.8 / 2014
Sifat	: Biasa
Perihal	: Determinasi Tanaman Tempuyung
Memenuhi permohonan saudara :	
Nama/ NIM	: ADHITYA FAJAR (115130100111064) AWANGGA SMARADHAHANA (115130100111060) HILDA YUANTI S. (115130100111067) FIRDAUS K (115130100111063) NOURI NAZIHAH (115130107111029)
Fakultas	: KEDOKTERAN HEWAN , UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG
1. Perihal determinasi tanaman Tempuyung	Kingdom : Plantae Sub Kingdom : Tracheobionta (berpembuluh) Super Divisi : Spermatophyta Divisi : Magnoliophyta Sub divisi : Angiospermae Kelas : Dicotyledonaceae Sub kelas : Asteridae Bangsa : Asterales Suku : Compositae (Asteraceae) Marga : Sonchus Jenis : <i>Sonchus arvensis L.</i> Sinonim : - jombang, j. lajakina, galibug, galling, lempung, rayana (Sunda); Tempuyung (Jawa) Kunci determinasi : 1b - 2b - 3b - 4b - 6b - 7b - 9b - 10b - 11b - 12 b - 13b - 14a - 15 a - 109b - 119b - 120 a - 121a - 122 a - 1b - 12b - 23b
2. Morfologi	: Terna tahunan, tegak, tinggi 0,6 - 2 m, mengandung getah putih, dengan akar tunggang yang kuat. Batang berongga dan berusuk. Daun tunggal, bagian bawah tumbuh berkumpul pada pangkal membentuk roset akar. Helai daun berbentuk lanset atau lonjong, ujung runcing, pangkal bentuk jantung, tepi berbagi menyirip tidak teratur, panjang 6 - 48 cm, lebar 3 - 12 cm, warnanya hijau muda. Daun yang keluar dari tangkai bunga bentuknya lebih kecil dengan pangkal memeluk batang, letak berjauhan, berseling. Perbungaan berbentuk bonggol yang tergabung dalam malai, bertangkai, mahkota bentuk jarum, warnanya kuning cerah, lama kelamaan menjadi merah kecokelatan. Buah kotak, berusuk lima, bentuknya memanjang sekitar 4 mm, pipih, berambut, cokelat kekuningan. Akar tunggang warna putih kotor
3. Nama Simplisia	: Sonchi Folium/ Daun Tempuyung
4. Kandungan kimia	: mengandung oc-laktuserol, P-laktuserol, manitol, inositol, silika, kalium, flavonoid, dan taraksasterol. Daun mengandung saponin, flavonoid, polifenol.
4. Penggunaan	: Penelitian
5. Daftar Pustaka	: -Anonim, http://www.tanaman.obat.com/tempuyung , diakses tanggal 29 Oktober 2010 -Anonim, http://www.warintek.com/tapak_liman diakses tanggal 23 Oktober 2010 -Anonim, http://www.plantamor.co.id/tapak_liman , diakses tanggal 9 Desember 2010 -Steenis, CGGJ Van Dr , <i>FLORA</i> , 2008, Pradnya Paramita , Jakarta. - Syamsuhidayat, Sri sugati, Hutapea, Johny Ria.1991, <i>Inventaris Tanaman Obat Indonesia 1</i> , Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.
Demikian surat keterangan determinasi ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.	
Batu, 26 NOVEMBER 2014 Kepala UPT Materia Medica Batu 	

Lampiran 3. Skema Kerja Penelitian



Lampiran 4. Pembuatan Ekstrak Daun Tempuyung (*Shoncus arvensis L.*)

300 g Daun tempuyung kering

- dimasukkan kedalam erlenmeyer tertutup
- dituang etanol 96% dengan perbandingan 1:4
- dikocok
- didiamkan selama 3 hari
- disaring kedalam erlenmeyer vakum
- dipekatkan dengan rotary evaporation

Ekstrak daun tempuyung



Lampiran 5. Perhitungan dosis

1. Total Berat Kering (TBK) Daun Tempuyung

Perhitungan :

$$\begin{aligned} \text{TBK} &= (\text{dosis 1} + \text{dosis 2} + \text{dosis 3}) \times \text{BB} \times \text{jumlah tikus} \\ &= (50 + 100 + 200) \text{ mg/Kg} \times 200 \text{ gram} \times 4 \text{ ekor} \\ &= (350 \text{ mg} : 1000 \text{ gram}) \times 800 \text{ gram} \\ &= 280 \text{ g} \end{aligned}$$

2. Total Berat Kering sebanyak 300 gram diekstrak etanol menjadi 10 mL.

Perhitungan Pengenceran dapat dilihat sebagai berikut :

a. Sediaan 1 \rightarrow 300 gram = 10 mL

Konsentrasi 30 gram/mL. Selanjutnya diambil 1 mL dan diencerkan menggunakan perbandingan 1:9 dengan menambahkan 9 mL akuades.

b. Sediaan 2 \rightarrow 30 gram = 10 mL

Konsentrasi 3 gram/mL. Selanjutnya diambil 1 mL dan diencerkan menggunakan perbandingan 1:9 dengan menambahkan 9 mL akuades.

c. Sediaan 3 \rightarrow 3 gram = 10 mL

Konsentrasi 0,3 gram/mL. Selanjutnya diambil 1 mL dan diencerkan menggunakan perbandingan 1:9 dengan menambahkan 9 mL akuades.

d. Sediaan 4 \rightarrow 0,3 gram = 10 mL

Konsentrasi 0,03 gram/mL.

$$300 \text{ mg} = 10 \text{ mL}$$

$$30 \text{ mg} = 1 \text{ mL}$$

3. Perhitungan dosis

a. Kelompok C dosis 50 mg/Kg BB

$$\begin{aligned} \text{Dosis terapi per ekor} &= \text{dosis} \times \text{BB} \\ &= 50 \text{ mg/Kg BB} \times 200 \text{ gram} \\ &= (50 \text{ mg} : 1000 \text{ gram}) \times 200 \text{ gram} \\ &= 10 \text{ mg} \end{aligned}$$

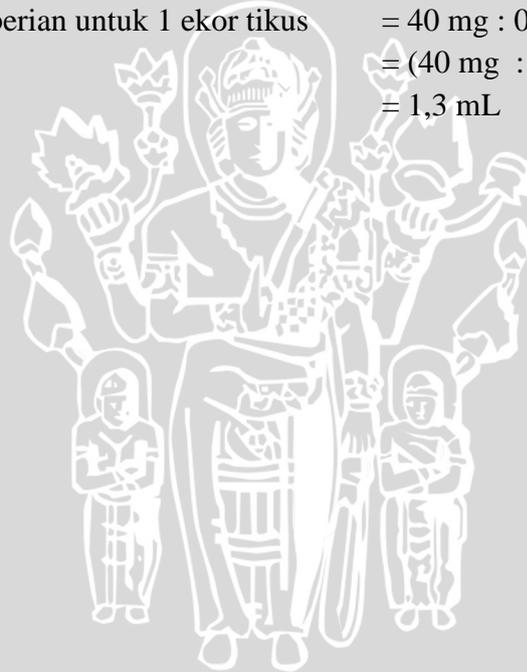
$$\begin{aligned} \text{Volume pemberian untuk 1 ekor tikus} &= 10 \text{ mg} : 0,03 \text{ gram/mL} \\ &= (10 \text{ mg} : 30 \text{ mg}) \times 1 \text{ mL} \\ &= 0,34 \text{ mL} \end{aligned}$$

b. Kelompok C dosis 100 mg/Kg BB

$$\begin{aligned}\text{Dosis terapi per ekor} &= \text{dosis} \times \text{BB} \\ &= 100 \text{ mg/Kg BB} \times 200 \text{ gram} \\ &= (100 \text{ mg} : 1000 \text{ gram}) \times 200 \text{ gram} \\ &= 20 \text{ mg} \\ \text{Volume pemberian untuk 1 ekor tikus} &= 20 \text{ mg} : 0,03 \text{ gram/mL} \\ &= (20 \text{ mg} : 30 \text{ mg}) \times 1 \text{ mL} \\ &= 0,67 \text{ mL}\end{aligned}$$

c. Kelompok C dosis 200 mg/Kg BB

$$\begin{aligned}\text{Dosis terapi per ekor} &= \text{dosis} \times \text{BB} \\ &= 200 \text{ mg/Kg BB} \times 200 \text{ gram} \\ &= (200 \text{ mg} : 1000 \text{ gram}) \times 200 \text{ gram} \\ &= 40 \text{ mg} \\ \text{Volume pemberian untuk 1 ekor tikus} &= 40 \text{ mg} : 0,03 \text{ gram/mL} \\ &= (40 \text{ mg} : 30 \text{ mg}) \times 1 \text{ mL} \\ &= 1,3 \text{ mL}\end{aligned}$$



Lampiran 6. Pembedahan Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan usia 2 bulan

- dieutanasi dengan cara dislokasi leher
- diletakkan dengan posisi dorsal recumbency
- diambil darah secara intracardial dan dimasukkan dalam tabung venoject
- diambil bagian ekstremitas kaudal, diisolasi dan dipotong
- dibilas dengan NaCl fisiologis 0,9%
- dimasukkan kedalam PBS-azida pH 7,4 ekstremitas kaudal sinister

Darah dan
Jaringan sendi



Lampiran 7. Pengukuran Kadar MDA

7.1 Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum MDA

100µl stok kit MDA dengan konsentrasi 0,1,2,3,4,5,6,7 dan 8 mg/ml

- dimasukkan dalam tabung reaksi kecil
- ditambahkan 550 µL akuades steril
- ditambah 100 µL TCA 10 % dan dihomogenkan dengan *vortex*
- ditambah 250 µL HCl 1 N dan dihomogenkan dengan *vortex*
- ditambah 100 µL Na-Thio 1% dan dihomogenkan dengan *vortex*
- disentrifugasi 500 rpm selama 10 menit

Supernatan

- diinkubasi pada waterbath 100⁰C selama 30 menit
- diangkat dan dibiarkan dalam suhu ruang
- Diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer

Absorbansi Larutan Standar dan kurva Standar MDA

7.2 Pengukuran Kadar MDA Homogenat

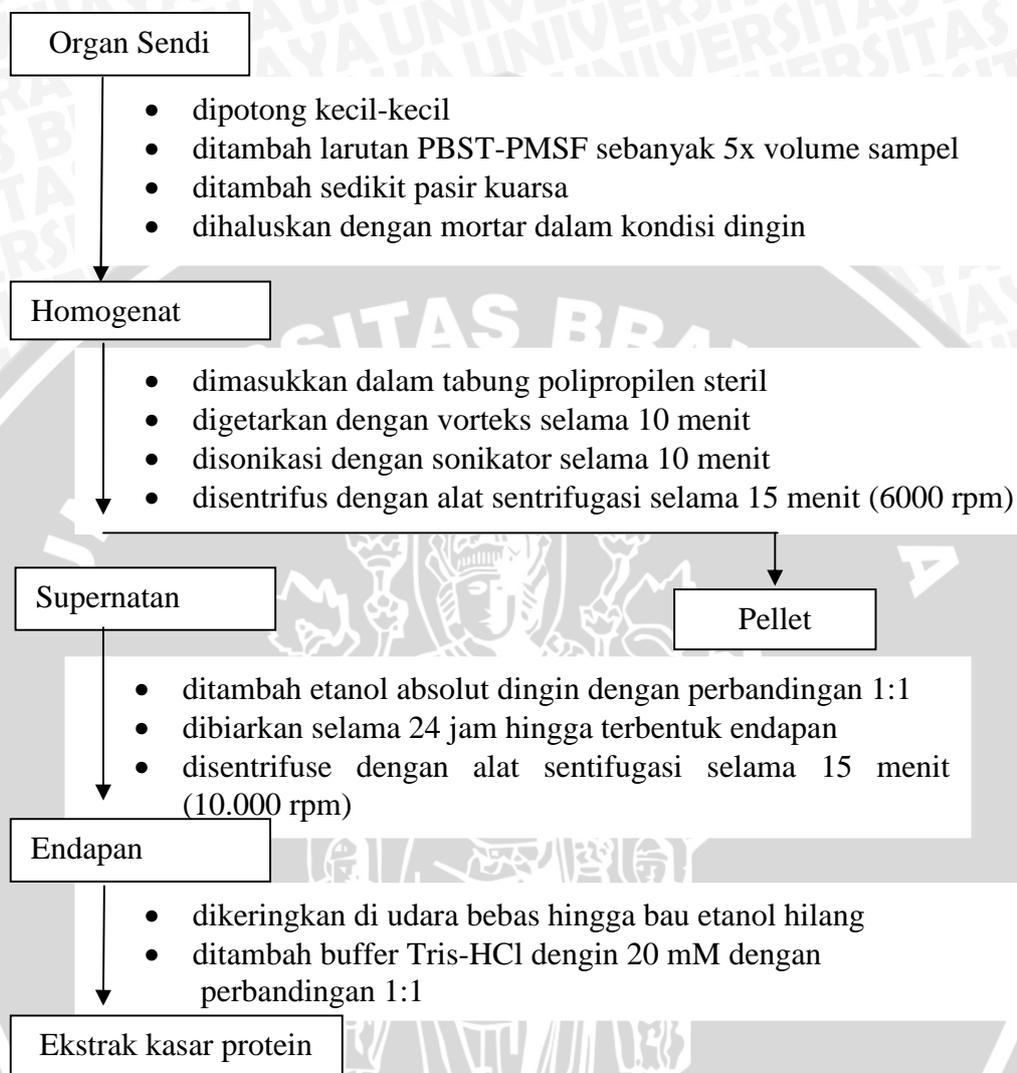
Supernatan

- diambil 100 µl sampel supernatan
- Ditambah 550 µl aquades ditambahkan 1 ml NaCl 0,9%
- Ditambah 100 µl Asam Trikloroasetat atau TCA 10%
- Dihomogenkan dengan vortex
- Ditambah 250 µl HCl 1 M
- Ditambah 100 µl Na-Thio 1%
- Dihomogenkan dengan vortex
- Dipanaskan dalam waterbath dengan suhu 100⁰C selama 20 menit
- Diangkat dan didinginkan pada suhu ruang
- Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada maksimum
- Diperoleh nilai absorbansi sampel

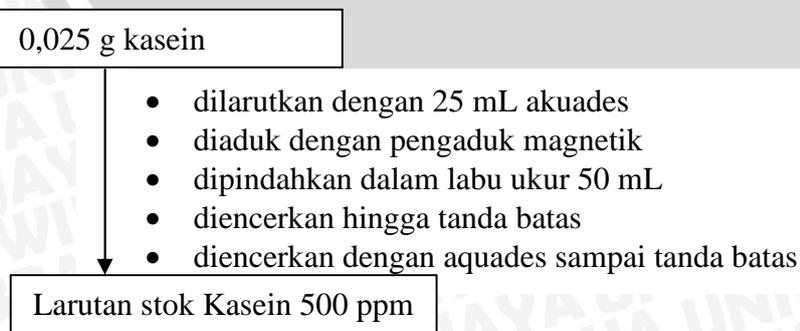
Hasil

Lampiran 8. Prosedur Pengukuran Aktivitas Protease

8.1 Isolasi Protein



8.2 Pembuatan Larutan Kasein



8.3 Pembuatan Larutan Stok Tirosin

0,025 g tirosin

- dilarutkan dengan 25 mL akuades
- diaduk dengan pengaduk magnetik
- dipindahkan dalam labu ukur 50 mL
- diencerkan hingga tanda batas
- diencerkan dengan aquades sampai tanda batas

Larutan stok tirosin 500 ppm

8.4 Pembuatan Larutan Baku Tirosin

4 mL Larutan baku tirosin 500 ppm

- dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL
- diencerkan dengan aquades sampai tanda batas

Larutan baku tirosin 20 ppm

- dipipet berturut-turut 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 mL
- dimasukkan masing-masing larutan kedalam labu ukur 10 mL
- diencerkan dengan aquades sampai tanda batas

Larutan baku tirosin 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 ppm

8.5 Pembuatan Panjang Gelombang Maksimum Tirosin

Larutan baku tirosin 20 ppm

- diukur absorbansinya pada maksimum tirosin

Panjang gelombang maksimum

8.6 Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Larutan baku tirosin 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 ppm

- dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam microtube
- diukur absorbansinya pada maksimum tirosin 200-300 nm

Kurva Baku Tirosin

8.7 Pengukuran Aktivitas Protease

Larutan kasein 500 ppm

- dipipet 200 μL
- dimasukkan dalam tabung reaksi
- ditambah 300 μL larutan buffer fosfat pH 7
- ditambah 100 μL ekstrak kasar protein
- diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit
- ditambah 400 μL larutan TCA 4%
- didinginkan pada suhu ruang selama 30 menit
- disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit

Endapan

Supernatan

- dipipet 100 μL
- ditambah buffer fosfat 5 kali volume sampel
- diukur serapannya pada maksimum tirosin 275 nm

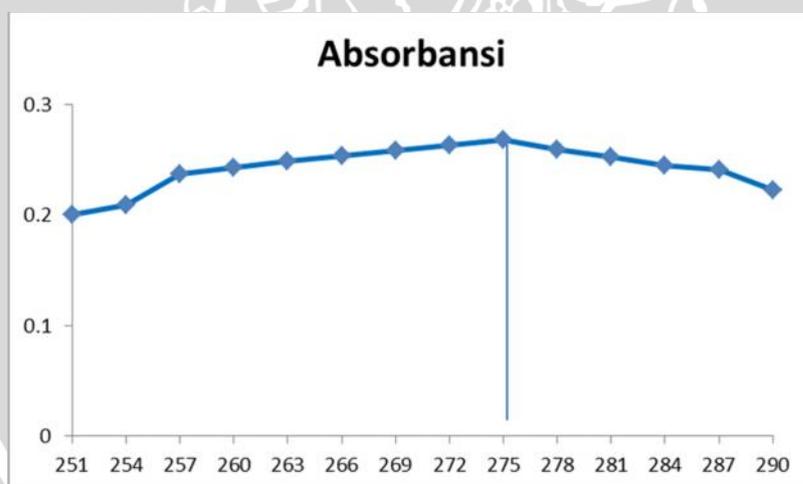
Hasil



Lampiran 9. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Tirosin

Tabel 9.1 Absorbansi Larutan Standar Tirosin 10 ppm

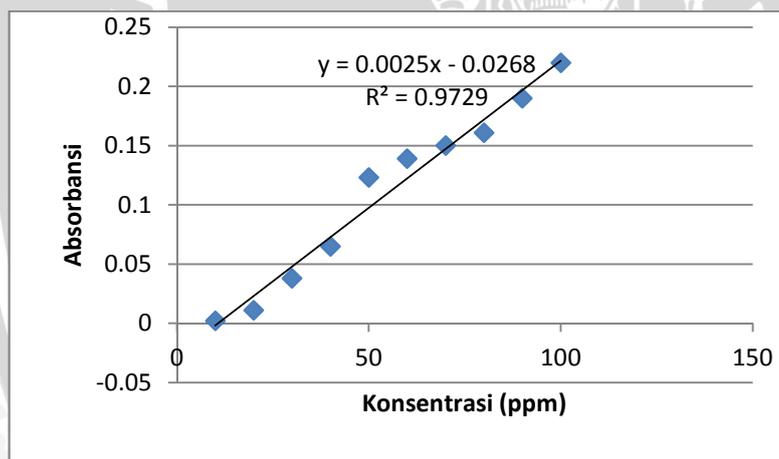
maks.	Absorbansi
251	0.201
254	0.209
257	0.237
260	0.243
263	0.249
266	0.254
269	0.259
272	0.263
275	0.268
278	0.26
281	0.253
284	0.245
287	0.241
290	0.223



Lampiran 10. Kurva Standar Tirosin

Tabel 10.1 Kurva baku tirosin

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
10	0,002
20	0,011
30	0,038
40	0,065
50	0,123
60	0,139
70	0,15
80	0,161
90	0,19
100	0,22



Tabel 10.2 Data Absorbansi Protease

Perlakuan	TIKUS			
	1	2	3	4
Sehat (-)	0,025	0,027	0,021	0,030
Sakit (Kontrol +)	0,074	0,069	0,060	0,065
Terapi 50	0,052	0,059	0,060	0,055
Terapi 100	0,046	0,042	0,039	0,045
Terapi 200 mg/kg BB	0,035	0,031	0,037	0,032

Lampiran 11. Perhitungan Aktivitas Protease

11.1 Rumus Perhitungan

Misal : Pengukuran aktivitas protease kontrol dengan waktu inkubasi 60 menit dan suhu 37°C

Persamaan kurva baku tirosin : $y = 0,0025x + 0,0268$

Dimana x = konsentrasi tirosin

$$\text{Maka } x = \frac{0,025+0,0268}{0,0025} = 25,5$$

Nilai x merupakan banyaknya tirosin yang terbentuk oleh enzim protease. Untuk menentukan aktivitas enzim protease digunakan persamaan :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times f_p$$

Dimana : v = volume total sampel (mL)
 q = waktu inkubasi (mL)
 f_p = faktor pengenceran
 P = jumlah enzim (mL)
 Mr = Berat Molekul Tirosin 181 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times f_p \\ &= \frac{25,5 \mu\text{g/mL}}{181 \mu\text{g}/\mu\text{mol}} \times \frac{1}{0,1 \text{ mL} \times 60 \text{ menit}} \times 5 \\ &= 0,14088398 \times 0,167 \times 5 = \mu\text{mol/mL.menit} \\ &= 0,1174 \mu\text{mol/mL.menit} \\ &= 0,1174 \text{ Unit} \end{aligned}$$

Satu unit aktivitas protease dinyatakan dengan banyaknya jumlah mikro mol yang terbentuk oleh 1 mL protease per menit.

Tabel 11.1 Data Konsentrasi Tirosin

Perlakuan	TIKUS			
	1	2	3	4
Sehat (-)	25,5	26,5	23,5	28,0
Sakit (kontrol +)	50,0	47,5	43,0	45,5
Terapi 50	39,0	42,5	43,0	40,5
Terapi 100	36,0	34,0	32,5	35,5
Terapi 200	30,5	28,5	31,5	29,0

Tabel 11.2 Data Aktivitas Enzim Protease

Perlakuan	Tikus				Rataan aktivitas enzim
	1	2	3	4	
Sehat	0,1174	0,1220	0,1028	0,1289	0.1191 ± 0,008689
Sakit	0,2302	0,2187	0,1980	0,2095	0.2141 ± 0.013683
Terapi 50	0,1796	0,1957	0,1980	0,1865	0.1899 ± 0.008510
Terapi 100	0,1657	0,1565	0,1496	0,1634	0.1588 ± 0.007279
Terapi 200	0,1404	0,1312	0,1450	0,1335	0.1375 ± 0,006339

Induksi CFA mampu meningkatkan aktivitas protease sendi tikus (*Rattus norvegicus*) dan ekstrak etanol daun Tempuyung (*Sonchus arvensis*) dapat menurunkan aktivitas protease. Presentasi peningkatan aktivitas enzim protease dari kontrol negative sebesar sebagai berikut:

Kelompok Kontrol

$$\begin{aligned} \text{Peningkatan aktivitas protease (\%)} &= \frac{\text{Rataan Sakit} - \text{Rataan Kontrol}}{\text{Rataan Kontrol}} \times 100\% \\ &= \frac{0,2141 - 0,1191}{0,1191} \times 100\% \\ &= 80\% \end{aligned}$$

Kelompok Terapi 50 gram/ekor

$$\begin{aligned} \text{Peningkatan aktivitas protease (\%)} &= \frac{\text{Rataan Sakit} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Kontrol}} \times 100\% \\ &= \frac{0,2141 - 0,1899}{0,1191} \times 100\% \\ &= 59,6\% \end{aligned}$$

Kelompok Terapi 100 gram/ekor

$$\begin{aligned} \text{Peningkatan aktivitas protease (\%)} &= \frac{\text{Rataan Sakit} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Kontrol}} \times 100\% \\ &= \frac{0,2141 - 0,1588}{0,1191} \times 100\% \\ &= 33\% \end{aligned}$$

Kelompok Terapi 200 gram/ekor

$$\begin{aligned} \text{Peningkatan aktivitas protease (\%)} &= \frac{\text{Rataan Sakit} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Kontrol}} \times 100\% \\ &= \frac{0,2141 - 0,1375}{0,1191} \times 100\% \\ &= 15\% \end{aligned}$$

Lampiran 12. Uji Statistika Aktivitas Protease

Tabel 12.1 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Aktivitas Protease

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,656	4	15	,632

* $P > 0,05$ data tidak berbeda

Tabel 12.2 Uji Statistik ANOVA

ANOVA

Aktivitas Protease

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,024	4	,006	62,716	,000
Within Groups	,001	15	,000		
Total	,026	19			

* $P < 0,05$ terdapat perbedaan antar perlakuan

Tabel 12.3 Pemberian Notasi pada Uji BNJ

Aktivitas protease

Tukey HSD

perlakuan	N	Subset for alpha = .05				
		1	a	b	c	d
K-	4		,1200			
T3	4		,1375			
T2	4			,1600		
T1	4				,1925	
K+	4					,2150
Sig.		,139	1,000	1,000	1,000	1,000

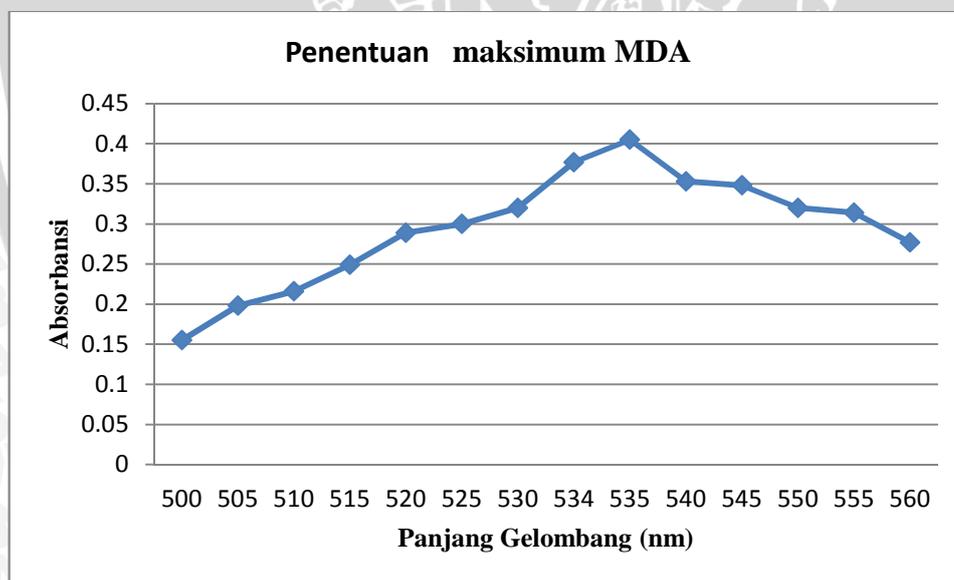
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

Lampiran 13. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Malondialdehida

Tabel 13.1 Absorbansi larutan standar

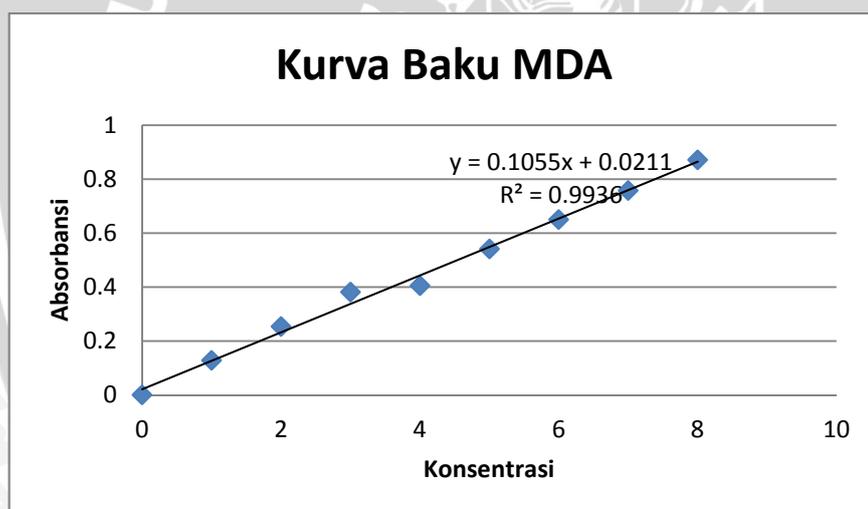
Panjang Gelombang	Absorbansi
500	0,155
505	0,198
510	0,216
515	0,249
520	0,289
525	0,3
530	0,32
534	0,377
535	0,405
540	0,353
545	0,348
550	0,32
555	0,314
560	0,277



Lampiran 14. Kurva Baku MDA dan Data Absorbansi MDA

Tabel 14.1 Absorbansi Kurva Baku MDA dengan panjang gelombang maksimum 535 nm

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi
0	0
1	0,128
2	0,253
3	0,381
4	0,405
5	0,541
6	0,65
7	0,758
8	0,871



Tabel 14.2 Data Absorbansi MDA

Perlakuan	TIKUS			
	1	2	3	4
Sehat (-)	0,110	0,109	0,112	0,108
Sakit (Kontrol +)	0,244	0,236	0,239	0,241
Terapi 50	0,201	0,209	0,199	0,202
Terapi 100	0,172	0,169	0,165	0,170
Terapi 200 mg/kg BB	0,111	0,120	0,119	0,090

Lampiran 15. Perhitungan Kadar MDA

Tabel 15.1 Data Pengukuran Kadar MDA

Perlakuan	Tikus				Rataan Kadar MDA
	1	2	3	4	
Sehat	306,5	304,0	311,5	301,5	294,312 ±0,426
Sakit	641,5	621,5	629,0	634,0	621,937±0,746
Terapi 50	534,0	554,0	529,0	536,5	534,937±0,688
Terapi 100	461,5	454,0	444,0	456,5	449,375±0,520
Terapi 200	309,0	331,5	329,0	256,5	294,125±0,661

Induksi *Complete Freund's Adjuvant* mampu meningkatkan kadar MDA tikus (*Rattus norvegicus*) dan terapi ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L) dapat menurunkan kadar MDA. Presentasi peningkatan kadar MDA dari kontrol negatif sebesar sebagai berikut:

Kelompok Kontrol

$$\begin{aligned} \text{Peningkatan kadar MDA (\%)} &= \frac{\text{Rataan Sakit} - \text{Rataan Kontrol}}{\text{Rataan Kontrol}} \times 100\% \\ &= \frac{621,9 - 294,3}{294,3} \times 100\% \\ &= 111,3\% \end{aligned}$$

Kelompok Terapi 50 gram/ekor

$$\begin{aligned} \text{Peningkatan kadar MDA (\%)} &= \frac{\text{Rataan Sakit} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Kontrol}} \times 100\% \\ &= \frac{621,9 - 534,9}{294,3} \times 100\% \\ &= 81,75\% \end{aligned}$$

Kelompok Terapi 100 gram/ekor

$$\begin{aligned} \text{Peningkatan kadar MDA (\%)} &= \frac{\text{Rataan Sakit} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Kontrol}} \times 100\% \\ &= \frac{621,9 - 449,3}{294,3} \times 100\% \\ &= 52,66\% \end{aligned}$$

Kelompok Terapi 200 gram/ekor

$$\begin{aligned} \text{Peningkatan kadar MDA (\%)} &= \frac{\text{Rataan Sakit} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Kontrol}} \times 100\% \\ &= \frac{621,9 - 294,1}{294,3} \times 100\% \\ &= 0,067\% \end{aligned}$$

Lampiran 16. Hasil Uji Statistika Kadar MDA

Tabel 16.1 Uji Homogenitas

PERLAKUAN		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
KADAR_MDA	KONTROL NEGATIF	.227	4		.957	4	.760
	KONTROL POSITIF	.133	4		1.000	4	1.000
	TERAPI 50 mg/kg BB	.318	4		.873	4	.310
	TERAPI 100 mg/kg BB	.250	4		.953	4	.734
	TERAPI 200 mg/kg BB	.279	4		.828	4	.162

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 16.2 Uji Statistik ANOVA

ANOVA					
KADAR_MDA	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	328520.800	4	82130.200	278.632	.000
Within Groups	4421.438	15	294.762		
Total	332942.238	19			

Tabel 16.3 Pemberian Notasi pada Uji BNJ

Tukey HSD

PERLAKUAN	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
KONTROL NEGATIF	4	3.05750E2			
TERAPI 200 mg/kg BB	4	3.06500E2			
TERAPI 100 mg/kg BB	4		4.54000E2		
TERAPI 50 mg/kg BB	4			5.38375E2	
KONTROL POSITIF	4				6.31500E2
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 17. Uji LCMS Flavonoid dalam Ekstrak Daun Tempuyung

