

**EKSPRESI TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF- $\alpha$ )  
DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI SENDI  
TIKUS ARTRITIS (*Rattus norvegicus*) YANG  
MENDAPATKAN TERAPI EKSTRAK  
BUAH KESEMEK JUNGGO  
(*Diospyros kaki L.f*)**

**SKRIPSI**

**Oleh :**

**NEALVIN IRVAN MANDELLA**

**081313016**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN  
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2013**

**EKSPRESI TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF- $\alpha$ )  
DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI SENDI  
TIKUS ARTRITIS (*Rattus norvegicus*) YANG  
MENDAPATKAN TERAPI EKSTRAK  
BUAH KESEMEEK JUNGGO  
(*Diospyros kaki L.f*)**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

oleh :

**NEALVIN IRVAN MANDELLA**

**0811313016**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN  
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2013**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

Ekspresi *Tumor Necrosis Faktor (TNF- $\alpha$ )* Dan Gambaran Histopatologi Sendi Tikus Arthritis (*Rattus norvegicus*) Yang Mendapatkan Terapi Ekstrak Buah Kesemek Junggo (*Diospyros kaki L.f*)

oleh :

**NEALVIN IRVAN MANDELLA**

**0811313016**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal 11 Februari 2013 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan

**Pembimbing I**

**Pembimbing II**

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

NIP. 19600903 1898802 2 001

**Dyah Kinasih Wuragil,S.Si.MP,M.Sc**

NIP. 19820914 200912 2 004

Mengetahui,

Ketua Program Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan  
Program Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh., MS**

NIP. 19480615 197702 2 001

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

NIP. 19600903 1898802 2 001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Nealvin Irvan Mandella

NIM : 0811313016

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Ekspresi *Tumor Necrosis Faktor* (TNF- $\alpha$ ) Dan Gambaran Histopatologi Sendi Tikus Arthritis (*Rattus norvegicus*) Yang Mendapatkan Terapi Ekstrak Air Buah Kesemek Junggo (*Diospyros kaki L.f*)

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 di isi 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, 27 Februari 2013  
Yang Menyatakan,

**Nealvin Irvan Mandella**  
NIM. 0811313016

repository.ub.ac.id

**Ekspresi *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) Dan Gambaran Histopatologi Sendi Tikus Arthritis (*Rattus norvegicus*) Yang Mendapatkan Terapi Ekstrak Buah Kesemek Junggo (*Diospyros kaki L.f*)**

**ABSTRAK**

Arthritis Rheumatoid merupakan salah satu jenis penyakit autoimun yang menyerang bagian sendi. Penyebab arthritis rheumatoid meliputi faktor genetik, hormon sex, infeksi dan umur. Pengobatan yang biasa digunakan yaitu dengan beraktivitas ringan dan obat sintesis berbahan herbal yang mengandung antioksidan khususnya golongan polifenol. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui ekspresi TNF- $\alpha$  dan gambaran histopatologi sendi pada tikus arthritis rheumatoid yang telah diterapi dengan ekstrak buah kesemek junggo. Dalam penelitian ini, tikus dibagi dalam 4 kelompok yaitu kontrol (A), arthritis rheumatoid (B), arthritis rheumatoid dengan terapi ekstrak buah kesemek junggo 750 mg/kgBB (C) dan arthritis rheumatoid dengan terapi ekstrak buah kesemek junggo 1000 mg/kgBB (D). Induksi arthritis rheumatoid dilakukan dengan injeksi dengan *Complete Freund Adjuvant* (CFA) sebanyak 0.1 ml pada bagian ekor. *Booster* dilakukan setelah 1 minggu pada bagian kaki belakang masing-masing 0,05 ml per ekor. Terapi dilakukan selama 2 minggu sebanyak 2 ml/ekor/hari setelah injeksi ke II. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa tulang rawan hialin pada tikus arthritis rheumatoid mengalami kerusakan. Setelah dilakukan terapi (kelompok C dan D) terjadi perbaikan struktur tulang rawan hialin. Ekspresi TNF- $\alpha$  ditunjukkan dengan persen area yaitu kelompok kontrol 0%, arthritis rheumatoid 475%, arthritis rheumatoid dengan terapi ekstrak kesemek junggo 750 mg/kgBB 62% dan arthritis rheumatoid dengan terapi ekstrak kesemek junggo 1000 mg/kgBB 44%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa perlakuan terapi ekstrak buah kesemek junggo pada kelompok (C) dan (D) memiliki ekspresi TNF- $\alpha$  yang jauh lebih rendah bila dibandingkan pada tikus arthritis rheumatoid (B).

Kata kunci : *arthritis rheumatoid*, *complete freund adjuvant* (CFA) , kesemek junggo (**Diospyros kaki L.**), *tumor necrosis factor* (TNF- $\alpha$ )

**Expression of *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) and Histopathological  
Apperance Joints Rheumatoid Arthritis in Rats (*Rattus norvegicus*) With  
Junggo Persimmon Exstrack Therapy**

**ABSTRACT**

Rheumatoid arthritis is a type of autoimmune disease that attacks the joints. The etiology of rheumatoid arthritis include genetic factors, sex hormones, infection and ageing. The common therapy rheumatoid arthritis is by physical therapy and by administering herbal drug with antioxidant activity such as poliphenol. The purpose of this study was to determine the expression of TNF- $\alpha$  and histopathologic apperance of rheumatoid arthritis joints in rat that had been treated with an extract of persimmon junggo. In this study, rats were divided into 4 groups: control (A), rheumatoid arthritis (B), rheumatoid arthritis with junggo persimmon therapy of 750 mg/kg BW (C) and rheumatoid arthritis with junggo persimmon therapy of 1000 mg/kg BW (D). Induction of rheumatoid arthritis was by conducted injection with Complete Freund Adjuvant (CFA) 0.1 ml on the tail. Booster made after 1 week on the back side of leg 0.05 ml/rat. Junggo persimmon ekstrack therapy wen conducted for 2 weeks as 2 ml/rat/day. Results from this eksperimen indicated that the hyaline cartilage in rat rheumatoid arthritis here damaged. After therapy (group C and D) show at that hyaline cartilage was repaired. Expression of TNF- $\alpha$  was shown by the percent area of were 0%, 475%, 62% and 44% fil group A, B, C and D repectively. It could be concluded that therapy of junggo persimmon extract could decrease the expression of TNF- $\alpha$  in rat rheumatoid arthritis.

**Keywords:** *rheumatoid arthritis*, *complete Freund adjuvant* (CFA), *junggo persimmon* (*Diospyros L. feet*), *tumor necrosis factor* (TNF- $\alpha$ )

## KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Tuhan Yang Maha Esa yang senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul **“Ekspresi *Tumor Necrosis Faktor (TNF- $\alpha$ )* Dan Gambaran Histopatologi Sendi Tikus Arthritis Rheumatoid (*Rattus norvegicus*) Yang Mendapatkan Terapi Ekstrak Air Buah Kesemek Junggo (*Diospyros kaki L.f*)”**. Penelitian ini dibawah payung penelitian yang diketuai oleh Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES yang bertujuan sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan.

Tidak lupa penulis ucapkan terima kasih kepada pihak – pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini :

1. Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES., selaku Dosen Pembimbing 1 dan selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan atas bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktu.
2. Dyah Kinasih Wuragil S.Si., MP., MS selaku Dosen Pembimbing II yang telah membimbing dengan kesabaran, koreksi dan waktu.
3. Drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P.,M.Biotech dan Drh. Handayu Untari selaku Dosen penguji atas koreksi, kritik, saran, kesabaran dan waktu.
4. Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh., MS selaku Ketua Program Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan demi kemajuan PKH UB.
5. Analis dan Staf Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Laboratorium Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Malang dan Laboratorium Biosciences Universitas Brawijaya, yang telah membantu penulis dalam penelitian.
6. dr.Rachmad Sarwo Bekti, S.Ked atas bimbingan dan arahan dalam menyelesaikan penulisan skripsi.
7. Bapak Nur, Bapak Iksan dan Ibu Nina selaku pemilik pohon kesemek junggo di Desa Junggo-Batu-Malang.
8. Teman-teman Arthritis-Kesemek “Arifin, Ali, Devi, Prima, Bornea dan Anjar” yang telah berjuang bersama dalam penelitian ini.
9. Teman-teman GAMETOGENESIS yang selalu memberikan dorongan,

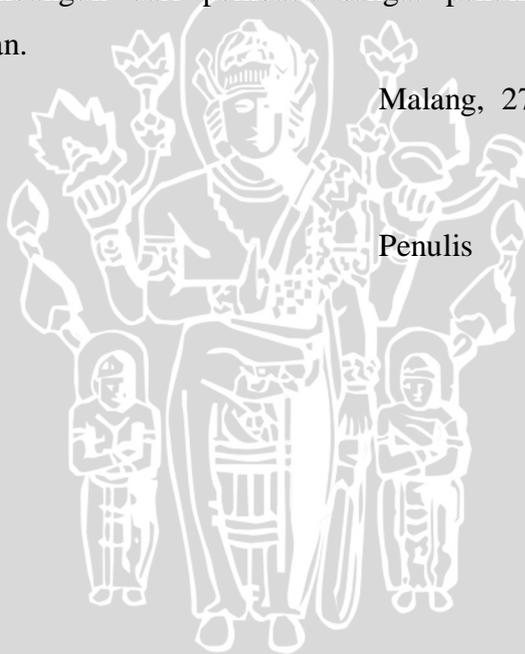
semangat, inspirasi dan keceriaan.

10. Keluarga penulis, Bapak dan Ibu tercinta yang senantiasa memberikan semangat dan doa. Adikku yang memberikan dukungan dan Helda yang selalu senantiasa menemani dengan setia pengerjaan skripsi ini.
11. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan skripsi ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca. Kritik dan saran yang membangun dari pembaca sangat penulis harapkan demi kesempurnaan penulisan.

Malang, 27 Februari 2013

Penulis



DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
HALAMAN PERNYATAAN .....	iii
ABSTRAK .....	vi
ABSTRACT .....	v
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
DAFTAR SINGKATAN .....	xiii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.4 Tujuan .....	4
1.5 Manfaat .....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Arthritis Rheumatoid .....	5
2.2 Hewan Coba Tikus .....	7
2.3 Induksi Arthritis Rheumatoid .....	8
2.4 <i>Tumor Necrosis Faktor (TNF-<math>\alpha</math>)</i> .....	9
2.5 Kesemek Junggo .....	11
<b>BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS</b> .....	<b>14</b>
3.1 Kerangka Konsep .....	14
3.2 Hipotesis .....	15
<b>BAB IV METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	<b>16</b>
4.1 Tempat dan Waktu .....	16
4.2 Bahan dan Alat Penelitian .....	16
4.2.1 Bahan Penelitian .....	16
4.2.2 Alat Penelitian .....	17
4.3 Persiapan Hewan Coba .....	17
4.4 Induksi Arthritis Rheumatoid Dengan CFA .....	18
4.5 Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Buah Kesemek Junggo .....	18
4.6 Pembuatan Preparat Histologi Dan Pewarnaan HE .....	19
4.7 Imunohistokimia .....	19
4.8 Rancangan Penelitian .....	20
4.9 Variabel Penelitian .....	20
4.10 Analisis Data .....	21
<b>BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>22</b>
5.1 Ekspresi <i>Tumor Necrosis Faktor (TNF-<math>\alpha</math>)</i> Pada Sendi Kaki .....	22
5.2 Histologi Sendi Kaki Dengan Pewarnaan HE .....	26
5.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Kesemek Junggo .....	29



BAB VI PENUTUP .....	32
6.1 Kesimpulan .....	32
6.2 Saran .....	32
BAB V DAFTAR PUSTAKA .....	33
LAMPIRAN .....	35



**DAFTAR TABEL**

Tabel 5.1 Ekspresi *Tumor Necrosis Faktor* TNF- $\alpha$  .....

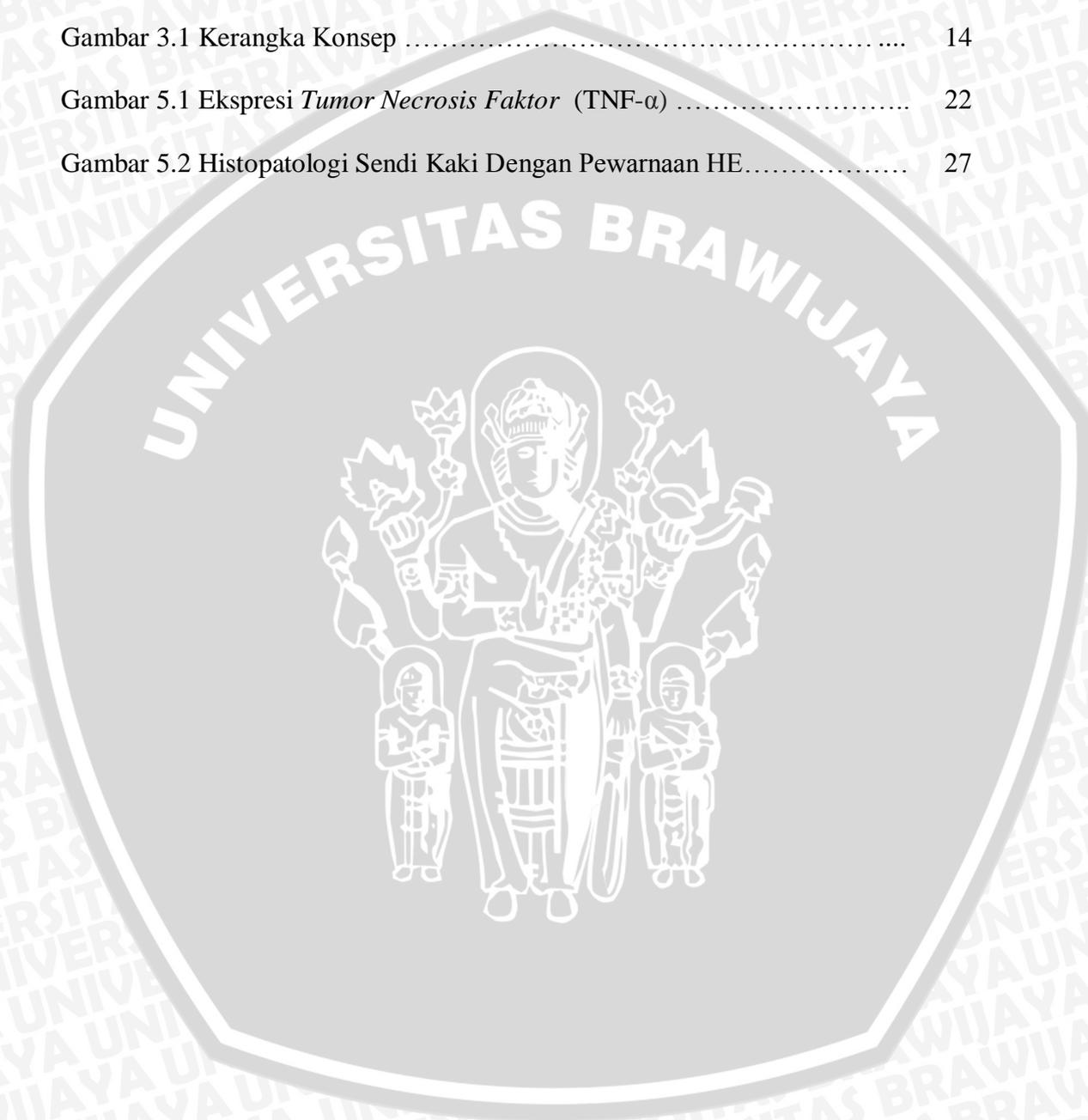
Halaman

25



## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 2.1 Gambaran Klinis Arthritis Rheumatoid Pada Anjing.....	6
Gambar 3.1 Kerangka Konsep .....	14
Gambar 5.1 Ekspresi <i>Tumor Necrosis Faktor</i> (TNF- $\alpha$ ) .....	22
Gambar 5.2 Histopatologi Sendi Kaki Dengan Pewarnaan HE.....	27



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
Lampiran 1. Rancangan Penelitian .....	36
Lampiran 2. Alur Penelitian .....	37
Lampiran 3. Langkah=langkah Uji Pewarnaan <i>Imunohistokimia</i> .....	38
Lampiran 4. Diagram Antar Ulangan Dalam Setiap Perlakuan .....	39
Lampiran 5. Diagram Antar Perlakuan .....	39
Lampiran 6. One-Sample Kolmogrov-Swirnov Test.....	39
Lampiran 7. Test of Homogeneity of Variens.....	40
Lampiran 8. Multiple Comparisons .....	40
Lampiran 9. Turkey HSD.....	41
Lampiran 10. Hasil Uji ANOVA.....	41
Lampiran 11. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) .....	41
Lampiran 12. Perhitungan Dosis .....	42
Lampiran 13. Pembuatan PBS-Azida .....	43
Lampiran 14. Pembuatan Larutan NaCl-fis 0,9% .....	43
Lampiran 15. Pembuatan PFA 4% .....	43
Lampiran 16. Komposisi Ransum Pakan .....	44
Lampiran 17. Pembuatan Preparat <i>Hematoxylyn Eosin</i> (HE) .....	45
Lampiran 18. Sertifikat Laik Etik .....	46
Lampiran 19. Sertifikat Keterangan Identifikasi .....	47

## DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APC	<i>Antigen-Presenting Cell</i>
AR	Arthritis reumatoid
BNT	Beda Nyata Terkecil
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
FMIPA	Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrogen Peroksida
HCl	Asam klorida
HE	Hematoksilin-Eosin
IFN	<i>Interferon</i>
IHK	<i>Imunohistokimia</i>
IL	Interleukin
MHC	<i>Major Histoncompability Complex</i>
MMP	Matrix Metalloproteinase
NaCl	Natrium klorida
NO	Oksida nitrit
OH	Radikal Hidroksil
PFA	Formaldehide
PBS	<i>Phospate Buffer Saline</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Arthritis rheumatoid merupakan salah satu jenis penyakit autoimun, dimana sistem pertahanan alami tubuh menyerang bagian sendi yang ditandai dengan terdapatnya sinovitis erosif simetrik dan peningkatan sitokin berupa *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ). Penyebab arthritis rheumatoid meliputi faktor genetik, hormon sex, infeksi dan umur. Hal ini juga diketahui berpengaruh kuat dalam menentukan pola morbiditas penyakit ini, secara etiologi arthritis rheumatoid yang sebenarnya belum dapat diketahui dengan pasti (Schwartz, 2007). Patofisiologis arthritis rheumatoid yaitu sel inflamatori teraktivasi (sel T) yang mengakibatkan membran synovial mengalami hyperplasia, peningkatan vaskulariasi dan infiltrasi sel-sel sehingga *Antigen Presenting Cell* (APC) menjadi aktif yang menghasilkan IL-1, IL-6 dan TNF- $\alpha$  sehingga terjadi arthritis rheumatoid (Abiyoso, dkk. 1994). Penelitian oleh Zeng QY, *et al.* (2008) menunjukkan prevalensi arthritis rheumatoid di Indonesia cukup tinggi yaitu antara 23,6%-31,3%.

*Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) merupakan sitokin yang disekresikan oleh makrofag dan memiliki peranan sebagai proliferasi sel, differensiasi, apoptosis, metabolisme lipid dan koagulasi (Abiyoso, dkk, 1994). Hubungan TNF- $\alpha$  dengan arthritis rheumatoid yaitu apabila TNF- $\alpha$  mengalami peningkatan yang dihasilkan oleh makrofag yang aktif maka TNF- $\alpha$  ini menjadi pemicu inflamasi dan kerusakan jaringan sehingga akhirnya terjadi arthritis rheumatoid (Suk dkk, 2001). Buah Kesemek Junggo lebih dikenal dengan buah kaki yang memiliki

kandungan antara lain tanin yang cukup tinggi sebagai antioksidan sehingga dapat menekan radikal bebas maupun sitokin (Baswarsiati, 2009).

Berdasarkan pengalaman empiris penelitian bahwa dengan menggunakan hewan coba kelinci diketahui bahwa ekstrak buah kesemek junggo dapat menyembuhkan arthritis rheumatoid (Zeng, 2008). Hal ini dapat dimungkinkan bahwa buah kesemek junggo memiliki kandungan tanin yang tinggi sehingga mempunyai peranan sebagai antioksidan. Dalam penelitian ini akan dikaji tentang pengaruh ekstrak buah kesemek junggo sebagai bahan terapi arthritis rheumatoid berdasarkan ekspresi TNF- $\alpha$  dan gambaran histopatologi sendi tikus arthritis rheumatoid.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang akan dipecahkan dalam penelitian ini adalah

- 1) Bagaimanakah ekspresi TNF- $\alpha$  pada tikus arthritis rheumatoid yang diterapi dengan ekstrak buah kesemek junggo (*Diospyros kaki L.f*)?
- 2) Bagaimanakah gambaran histopatologi sendi pada tikus arthritis rheumatoid yang diterapi dengan ekstrak buah kesemek junggo (*Diospyros kaki L.f*)?

## 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

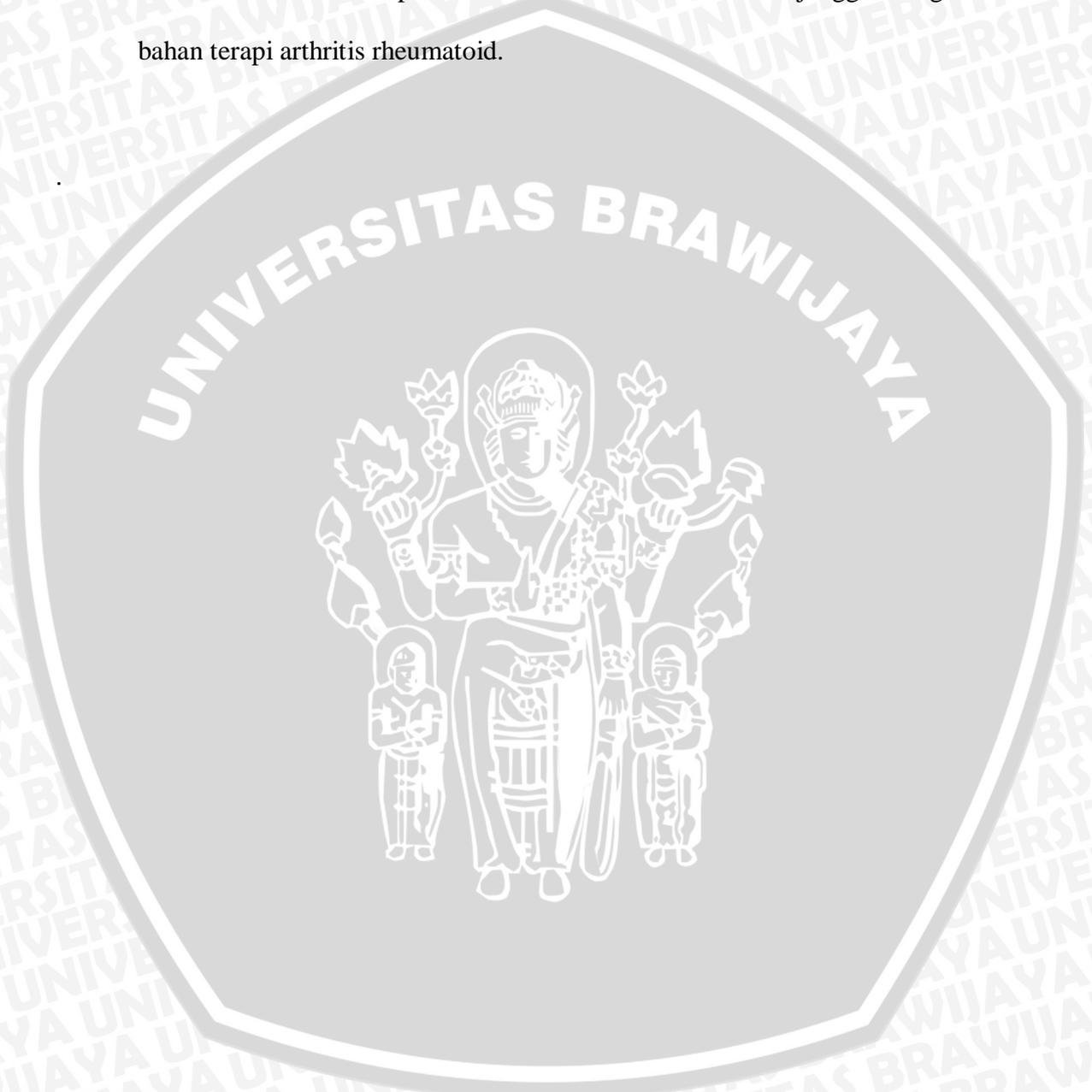
- 1) Hewan model arthritis rheumatoid yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) dari Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dengan umur 8-12 minggu dan berat badan antara 150-250 gram yang telah mendapatkan persetujuan Komisi Laik Etik No. 120-KEP-UB (lampiran 18).
- 2) Pembuatan arthritis rheumatoid pada hewan model tikus dilakukan dengan cara injeksi *Complete Freund Adjuvant* (CFA) 0,1 ml pada ekor (intradermal) dan dilakukan *booster* setelah 1 minggu pada kaki belakang masing-masing 0,05 ml (Prabowo, 2005).
- 3) Ekstrak buah kesemek junggo yang digunakan sebagai bahan terapi adalah ekstrak air dari daging buah yang diperoleh dengan cara maserasi dan pemberian dosis 750 mg/kgBB dan 1000 mg/kgBB sebanyak 2 ml/ekor/hari.
- 4) Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF- $\alpha$  dan kondisi jaringan tulang rawan hialin yang diamati secara deskriptif serta perhitungan persentase area yang menggunakan program *Axio Vixion*.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

- 1) Untuk mengetahui ekspresi TNF- $\alpha$  pada tikus arthritis rheumatoid yang telah diterapi dengan ekstrak buah kesemek junggo (*Diospyros kaki L.f*).
- 2) Untuk mengetahui gambaran histopatologi sendi pada tikus arthritis rheumatoid yang telah diterapi dengan ekstrak buah kesemek junggo (*Diospyros kaki L.f*).

### 1.5 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi dalam persiapan hewan coba arthritis rheumatoid.
2. Memberikan informasi pemanfaatan ekstrak buah kesemek junggo sebagai bahan terapi arthritis rheumatoid.



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Arthritis Rheumatoid

Istilah arthritis berasal dari bahasa Yunani yaitu *Arthon* (sendi) dan *itis* (radang). Arthritis rheumatoid merupakan suatu penyakit yang menyebabkan rasa nyeri, bengkak, kaku dan penurunan fungsi sendi. Pemeriksaan radiologi akan tampak terjadi pembengkakan jaringan ikat, *osteoporosis*, hilangnya celah sendi, erosi tulang dan *deformitas* yang menetap (Abiyoso, dkk. 1994).

Dampak penting dari arthritis rheumatoid adalah kerusakan sendi dan kecacatan. Kerusakan sendi pada arthritis rheumatoid terjadi terutama dalam 2 tahun pertama sehingga diagnosa dini dan terapi sangat penting untuk mencegah terjadinya kecacatan pada pasien. Arthritis rheumatoid tidak hanya menyebabkan peradangan sendi kronik umum, melainkan dapat meliputi banyak organ. Sebagian besar kasus arthritis rheumatoid dapat mengakibatkan kerusakan sendi yang progresif, kecacatan dan kematian dini (Nasution dan Sumariyono, 2006).

Rata-rata penderita arthritis rheumatoid mengalami destruksi tulang rawan sendi, erosi tulang dan kerusakan fungsi sendi. Dalam keadaan normal sendi mengalami *remodeling* melalui perusakan (degradasi) tulang oleh osteoklas dan deposisi matriks baru oleh osteoblas. Keseimbangan ini berubah pada penderita arthritis rheumatoid, dimana kerusakan tulang lebih besar dibandingkan pembentukannya (Kavanaugh dan Lipsky, 1999). Salah satu enzim proteolitik yang dihasilkan oleh kondrosit dan berperan pada degradasi kolagen proteoglikan adalah kelompok enzim metaloproteinase seperti kolagenase dan stromelisin.

Ketidakeimbangan protease dan inhibitornya dapat mengakibatkan degradasi matriks kartilago secara berlebihan (Suryana, 2006).

Degradasi molekul matriks merupakan bagian dari proses *remodeling* dalam pertumbuhan, perkembangan dan *turnover* matriks pada orang dewasa. Proses tersebut tidak selalu menunjukkan keadaan patologis dan diatur secara seksama oleh berbagai sitokin, faktor pertumbuhan, hormon yang mengatur sintese protease (proteinase) dan inhibilatornya. Keadaan tersebut dapat menjadi patofisiologis seperti pada arthritis rheumatoid (Poole, 2005).



**Gambar 2.1** Gambaran klinis Arthritis Rheumatoid pada anjing (Poole, 2005).

Gambar diatas merupakan contoh arthritis rheumatoid pada anjing yang menunjukkan bahwa pembengkakan pada sepasang kakinya. Hal ini dapat terjadi karena secara patofisiologis arthritis rheumatoid menyerang membran synovial pada pasien arthritis rheumatoid mengalami hiperplasia, peningkatan vaskularisasi, dan infiltrasi sel-sel pencetus inflamasi, terutama sel T CD4<sup>+</sup>. Sel T CD4<sup>+</sup> ini sangat berperan dalam respon imun. Arthritis rheumatoid ini sangat berhubungan dengan *Major Histocompatibility Complex (MHC) class II Human Leucosit Antigen (HLA)*. Fungsi utama molekul HLA class II untuk

mempresentasikan antigen kepada CD4<sup>+</sup> sel T. Antigen ini bisa berupa antigen eksogen, seperti protein virus atau protein antigen endogen. Antigen mengaktivasi sel T CD4<sup>+</sup> yang menstimulasi monosit, makrofag dan syinovial fibroblas untuk memproduksi IL-1, IL-6 dan TNF- $\alpha$  untuk mensekresikan matriks metaloproteinase melalui hubungan antar sel dengan bantuan CD69 dan CD11 melalui pelepasan mediator-mediator pelarut seperti *Interferon* (IFN)- $\gamma$  dan IL-17. IL-1, IL-6 dan TNF- $\alpha$  merupakan kunci terjadinya inflamasi pada arthritis rheumatoid (Abiyoso, dkk. 1994).

## 2.2 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Arthritis Rheumatoid

Hewan coba merupakan hewan yang sengaja dipelihara yang digunakan sebagai hewan model untuk mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan penelitian. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) umum digunakan sebagai hewan model arthritis rheumatoid dikarenakan memiliki beberapa keunggulan yaitu kadar asam amino dan sistem metabolismenya yang hampir sama dengan manusia sehingga memudahkan dalam melakukan penelitian (Miller *et al*, 2010). *Rattus norvegicus* memiliki ciri antara lain rambut tubuh berwarna putih dan mata yang merah, panjang tubuh total 440 mm, panjang ekor 205 mm dan bobot *Rattus norvegicus* pada usia dewasa adalah sekitar 250-500 gram (Potter, 2007).

Sistem klasifikasi tikus *Rattus norvegicus* menurut Sharp dan La Regina (1998) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>
Galur	: Sprague Dawley
	Wistar
	Long evans

### 2.3 Induksi Arthritis Rheumatoid

*Adjuvant* merupakan substansi bahan kimia yang diinjeksikan bersama-sama dengan antigen yang dapat meningkatkan respon imun dalam tubuh dengan cara memperluas permukaan antigen dan menghambat degradasi antigen dalam tubuh antigen. Penambahan *adjuvant* pada antigen tersebut bertujuan untuk mendapatkan antibodi yang lebih banyak sehingga terjadi inflamasi. Inflamasi sendiri merupakan suatu respon protektif normal terhadap luka jaringan yang disebabkan oleh trauma fisik maupun zat kimia yang merusak atau zat mikrobiologik dan usaha tubuh untuk menginaktivasi atau merusak organisme

yang menyerang. Inflamasi ini dicetuskan oleh pelepasan mediator kimiawi dari jaringan yang rusak dan migrasi sel. *Adjuvant* memiliki sifat antara lain melepas antigen sedikit demi sedikit sehingga memperpanjang antigen dengan sistem imun, mempertahankan integritas antigen, mempunyai sasaran *Antigen Presenting Cell* (APC), menginduksi CD8, memacu respon imun dengan afinitas tinggi dan mempunyai kapasitas untuk mengintervensi sistem imun yang selektif (sel B dan sel T) (Mycek, 2001).

*Complete Freund Adjuvant* (CFA) merupakan suatu *adjuvant* yang mengandung *Mycobacterium Butyricum* yang digunakan untuk meningkatkan immunogenisitas dan merangsang respon imun yang lebih besar dari pada antigen yang sendirian atau bahan kimia yang dapat merusak sel maupun jaringan sehingga dapat terjadi inflamasi. Penggunaan CFA yang berlebih dalam tubuh dapat menyebabkan terjadinya peradangan, indurasi atau nekrosis pada hewan coba. Beberapa kasus peradangan pada hewan coba terjadi pada injeksi CFA yang lebih dari satu kali injeksi (Anonymous, 2005).

#### **2.4 Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ )**

*Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) merupakan sitokin yang memiliki berat molekul sebesar 26 kDa yang kemudian dipecah menjadi 17 kDa dan terdiri dari protein asam amino (Green, Eynon dan Flavel, 1998). TNF- $\alpha$  ini dihasilkan oleh makrofag dan sel T yang memiliki target sel dan efek biologis antara lain endotel (aktivasi, inflamasi), neutrofil (aktivasi), hypothalamus (demam), liver (sintesis protein fase akut), otot (katabolisme) dan beberapa sel lain (apoptosis). TNF- $\alpha$  juga

menjadi mediator untuk imunitas alami dan imunitas spesifik selain itu juga sebagai mediator yang penting untuk menjembatani antara respon imun spesifik dengan proses inflamasi akut. Pada dosis rendah (kurang dari  $10^{-9}$  M) TNF- $\alpha$  bertindak sebagai regulator parakrin dan autokrin dari sel-sel endotel, antineoplastik (secara langsung), menimbulkan panas, respon fase akut sistemik, merangsang sekresi (limfokin, kolagen dan kolagenase) dan mengaktifkan sel endotel sebagai mediator pada inflamasi (Abbas, *et al.*, 2003).

*Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) juga dapat teraktivasi oleh faktor-faktor lain seperti faktor eksogen dan endogen. Faktor eksogen meliputi molekul yang berhubungan dengan proses infeksius seperti enterotoksin, protein dinding sel jamur, virus dan komponen dari parasit. Selain itu zat pemacu kimia non spesifik seperti phorbol ester dan kalsium ionosfor juga dapat sebagai pemacu yang efektif untuk memproduksi TNF- $\alpha$ . Faktor endogen meliputi sitokin-sitokin yang lain dibawah kondisi yang sama (IL-1, TNF- $\alpha$  itu sendiri) (Green dan Flavel, 2000). TNF- $\alpha$  memiliki peranan yang besar dalam aktivasi sistem imun dibandingkan dengan sitokin yang lainnya karena berperan dalam sistem imun alami dan spesifik, merangsang sel-sel endotel untuk mengekspresikan molekul adhesi, mendukung proses kemotoksis sel-sel inflamasi, mengaktifasi sel-sel inflamasi, merangsang sel-sel lainnya untuk meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I dan mendukung fungsi sel T sitotoksik (Suk dkk, 2001).

Peningkatan TNF- $\alpha$  pada level reseptor dapat terjadi pada berbagai macam infeksi seperti inflamasi, autoimun, neoplastik dan mekanisme inflamasi pada plak aterosklerotik. TNF- $\alpha$  mempunyai efek pada sel pembuluh darah yaitu

mengaktivasi endotel pada terjadinya adhesi leukosit dan aktivasi prokoagulan yang dapat meningkatkan kerusakan leukemik serta mengaktifkan neutrofil. Peningkatan leukosit pada endotel dan adhesi leukosit pada pembuluh darah (Suk, dkk. 2001).

### 2.5 Buah Kesemek Junggo (*Diospyros kaki L.f.*)

Buah kesemek junggo lebih dikenal dengan sebutan buah kaki atau Persimmon (***Diospyros kaki L.***). Famili **Ebenaceae** jenis ini hanya mampu tumbuh di dataran tinggi. Buah kesemek junggo merupakan tanaman asli dari China dan Jepang yang dikembangkan secara luas dan dikomersialkan. Sedangkan untuk daerah Asia Tenggara buah kesemek junggo hanya mampu tumbuh di Malaysia, Thailand dan Indonesia (pulau Jawa dan Sumatra). Buah kesemek Junggo mempunyai lingkaran sekitar 21-23 cm, lebar buah 7,5-8,5 cm, panjang buah sekitar 8-8,5 cm, dengan berat sekitar 170-210 gram per buah dan memiliki daya simpan lebih dari 14 hari serta produktivitasnya 400-500 kg/pohon/tahun (Baswarsiati, 2009).

Kandungan gula 22,7–33,2% , kandungan asam 0,07–0,09% dan kandungan vitamin C 6,3 –6,86%. mg/100 gram dan kandungan tanin 3,85-3,93 mg/100 gram. Selain itu buah kesemek junggo juga banyak mengandung potasium dan vitamin A serta kandungan energi 320 KJ per 100 gram bahan. Rasa masam merupakan penciri khusus pada buah yang satu ini karena kandungan taninnya yang tinggi. Perlakuan 45% alkohol yang disimpan selama 14 hari menghasilkan penurunan kandungan tanin dan rasa masam buah kesemek junggo (Baswarsiati, 2009).

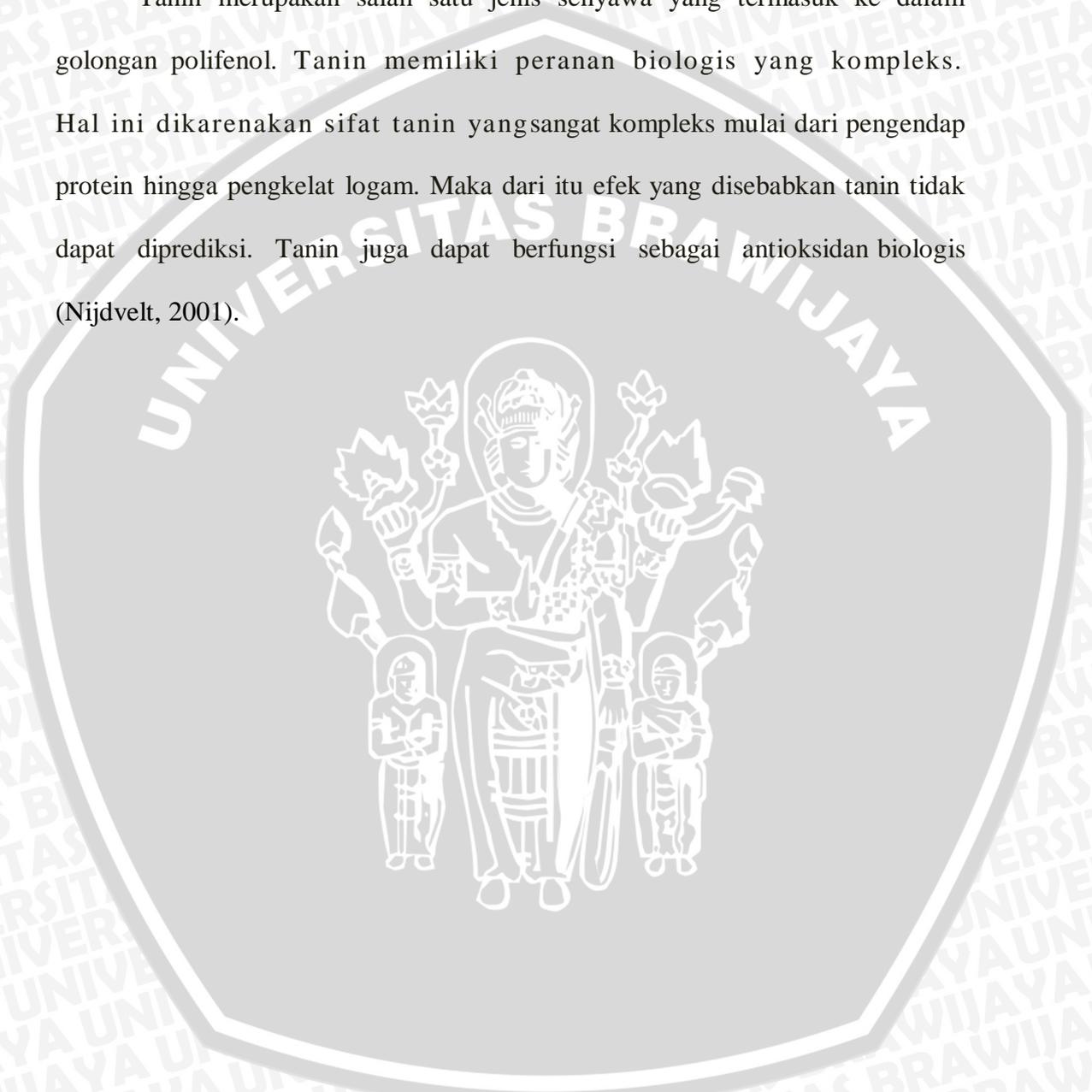
Taksonomi dari buah Kesemek Junggo sebagai berikut:

Kingdom	:Plantae
Divisio	:Spermatophyta
Subdivisio	:Angiospermae
Klas	:Magnoliopsida
Subklas	:Dilleniidae
Ordo	:Ebenales
Famili	:Ebenaceae
Genus	: <i>Diospyros</i>
Spesies	: <i>Diospyros kaki L.f</i>

Buah kesemek junggo memiliki khasiat yang luar biasa dalam menjaga kesehatan tubuh karena memiliki kandungan tanin, vitamin C dan A yang jauh lebih tinggi apabila dibandingkan dengan semangka dan apel. Setiap 100 gram kesemek mengandung kalori 78 kkal, protein 0,8 gram, lemak 0,5 gram, karbohidrat 20 gram (terutama fruktosa dan glukosa), kalsium 6 mg, vitamin A 2.710 mg, vitamin C 11 mg dan vitamin B1 0,05 mg serta nilai energinya 320 kJ/100 gram. Kandungan seratnya yang 2 kali lebih banyak daripada buah apel, maka sangat cocok untuk menjalankan program diet. Selain itu juga dapat mencegah konstipasi atau sembelit, terdapat juga senyawa antioksidan didalamnya yang bermanfaat untuk mencegah penuaan dini, menguatkan paru-paru, batuk disertai dahak kental, limpa, mencegah kanker dan pengerasan pembuluh darah serta menstabilkan tekanan darah supaya tidak melewati ambang batas (hipertensi). Sedangkan buah kesemek Junggo yang telah kering memiliki

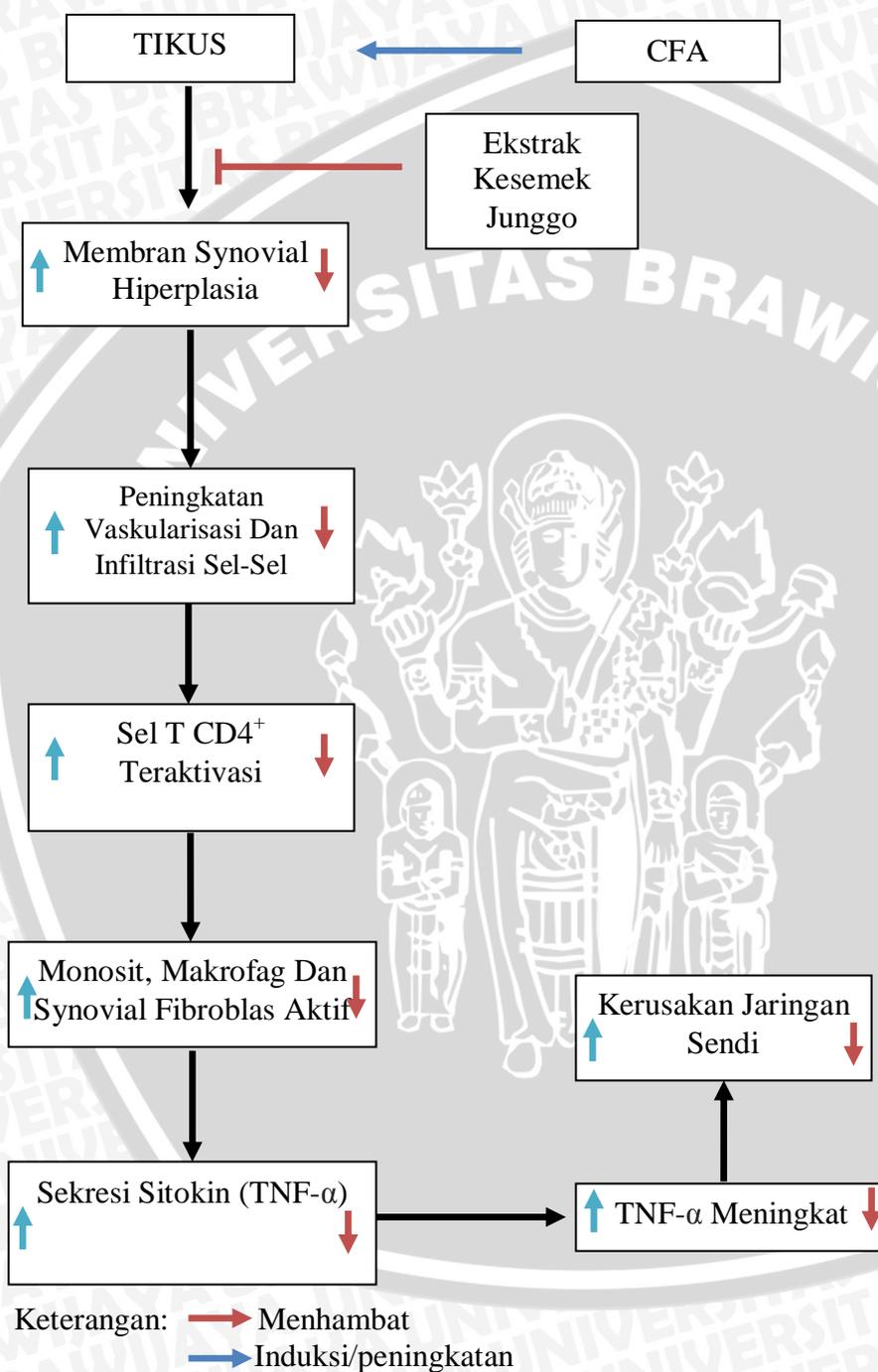
kandungan vitamin C yang tinggi sehingga sangat efektif untuk mencegah flu (Baswarsiati, 2009).

Tanin merupakan salah satu jenis senyawa yang termasuk ke dalam golongan polifenol. Tanin memiliki peranan biologis yang kompleks. Hal ini dikarenakan sifat tanin yang sangat kompleks mulai dari pengendap protein hingga pengkelat logam. Maka dari itu efek yang disebabkan tanin tidak dapat diprediksi. Tanin juga dapat berfungsi sebagai antioksidan biologis (Nijdvelt, 2001).



### BAB III Kerangka Konsep dan Hipotesis Penelitian

#### 3.1 Kerangka Konsep



**Gambar 3.1** : Kerangka Konsep Penelitian

Tikus yang diinjeksi *Complete Freund Adjuvant* (CFA) menyebabkan terjadinya stimulus sehingga membran synovial mengalami hiperplasia yang mengakibatkan terjadinya peningkatan vaskularisasi dan infiltrasi sel-sel pada sel T CD4<sup>+</sup>. Selanjutnya sel T CD4<sup>+</sup> teraktivasi dan menstimulasi monosit, makrofag dan synovial fibroblas sehingga menyebabkan sekresi sitokin proinflamatori diantaranya TNF- $\alpha$ . Peningkatan TNF- $\alpha$  mengakibatkan kerusakan jaringan pada sendi. Terapi ekstrak buah kesemek junggo berfungsi untuk menghambat terjadinya inflamasi sehingga menurunkan hiperplasia membran synovial, menyebabkan penurunan vaskularisasi dan infiltrasi sel-sel pada sel T CD4<sup>+</sup>, menurunkan sekresi TNF- $\alpha$  dan memperbaiki kerusakan jaringan tulang rawan hialin pada sendi kaki.

### 3.2 Hipotesis

Terapi ekstrak buah kesemek junggo dapat menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  dan memperbaiki jaringan tulang rawan hialin pada tikus (*Rattus norvegicus*) arthritis rheumatoid yang diinduksi CFA.

## BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Brawijaya Malang.

Penelitian dilakukan pada bulan September 2012 sampai Januari 2013.

### 4.2 Bahan dan Alat Penelitian

#### 4.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain ekstrak buah kesemek junggo (*Diospyros kaki. L.f*) dan hewan coba yaitu tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* berumur 8-12 minggu. Berat badan tikus antara 150-250 gram. Penentuan jumlah sampel dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

$$t(n-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ekstrak buah Kesemek Junggo, *Complte Freund Adjuvant* (CFA), aquades, alkohol 70%,

90%, NaCl-fisiologis, antibodi poliklonal *goat* TNF- $\alpha$ , larutan PBS, PFA 4%, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Fetal Bovine Serum* (FBS), *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP), *Diamino Benzidine* (DAB), *Mayer Hematoxylen*, *Eosin*, *Entellan*, Etanol, *Proplyne* murni, *Gliserin*, *Parafin*, *Xylol*, *Formaldehid* 37% dan larutan Azida.

#### 4.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini yaitu bak pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat bedah, seperangkat alat gelas (gelas objek, cawan petri, labu takar, gelas ukuran 100 ml, pipet tetes, pengaduk kaca, tabung mikro, tabung polipropilen, vortex, sentrifuse, autoclave, mortar, penangas air, *water bath*, neraca analitik, mikropipet, eppendof, *disposable syringe*, oven, pH meter, mikroskop cahaya, botol semprot, tabung reaksi, timer, tabung mikro, lemari pendingin, pengaduk kaca, mikropipet, corong, pisau dan incubator.

#### 4.3 Persiapan Hewan Coba

Tikus yang digunakan untuk penelitian diadaptasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian makanan berupa ransum basal pada semua tikus. Tikus dibagi dalam 4 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor tikus. Tikus diletakan dalam tempat yang bahannya terbuat dari plastik yang memiliki diameter 80 cm dengan tinggi 40 cm. Tempat tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Alas tempatnya mudah dibersihkan dan disanitasi.

Komposisi ransum basal disusun berdasarkan standar AOAC (2005) yaitu mengandung karbohidrat, protein, lemak, mineral, vitamin, dan air.

#### **4.4 Induksi Arthritis Rheumatoid Dengan *Complete Freund Adjuvant* (CFA)**

*Complete Freund Adjuvant* (CFA) ini diinjeksikan pertama kali sebanyak 0,1 ml pada bagian ekor tikus dalam kondisi sehat. Setelah dilakukan penyuntikan ditunggu selama satu minggu untuk mengetahui efek dari injeksi tersebut. Injeksi kedua juga menggunakan CFA dilakukan pada kaki belakang diminggu kedua selama 1 minggu sebanyak 0,05 ml 1 kaki.

#### **4.5 Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Buah Kesemek Junggo**

Pembuatan ekstrak buah kesemek junggo dilakukan dengan metode maserasi yaitu dosis I 750 mg berat kering daging buah direndam dalam 50 ml aquades dan direbus selama 1 jam dalam panci alumunium dengan suhu maksimal 70° celcius dengan kompor listrik hingga volume air ekstrak buah kesemek junggo menjadi 10 ml. Kemudian disaring menggunakan kertas saring dan digunakan sebagai bahan terapi sedangkan untuk dosis II yaitu 1000 mg berat kering daging buah direndam dalam 50 ml aquades dan direbus selama 1 jam dalam panci alumunium dengan suhu maksimal 70° celcius dengan kompor listrik hingga volume air ekstrak buah kesemek junggo menjadi 10 ml. Kemudian disaring menggunakan kertas saring dan digunakan sebagai bahan terapi. Pemberian ekstrak buah kesemek junggo pada tikus arthritis rheumatoid dilakukan dengan cara menyonde sebanyak 2 ml/ekor/hari. Pemberian terapi ini

hanya diberikan untuk kelompok C dan D dengan jumlah pemberian sama yaitu 2 ml/ekor/hari selama 2 minggu (Zeng, 2008).

#### **4.6 Pembuatan Preparat Histologi Dengan Pewarnan *Hematoxylin Eosin* (HE)**

Proses pembuatan preparat histopatologi dilakukan dengan beberapa tahap yaitu pemotongan organ, isolasi, fiksasi, dehidrasi, embedding, blok paraffin dan pewarnaan HE (lampiran 17).

#### **4.7 Imunohistokimia (IHK)**

Langkah-langkah dalam metode pewarnaan *Imunohistokimia* yaitu preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 1x15 menit selanjutnya ditetesi 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit selama 3 kali dan diblok dengan 5% FBS (*Fetal Bovine Serum*) selama 1 jam. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali selanjutnya diinkubasi dengan antibodi primer selama 1 jam dengan suhu ruang dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Berikutnya diinkubasi dengan antibodi sekunder selama 1 jam dengan suhu ruang. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali.

Preparat ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radish Peroxidase*) selama 40 menit. Kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Ditetesi dengan DAB (*Diamano Benzidine*) selama 10 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Selanjutnya *counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 10 menit. Dicuci dengan air mengalir.

Dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Tahapan terakhir di *mounting* dengan *entellan* dan ditutup dengan *cover glass*. Hasil diamati menggunakan mikroskop (Calnek, 1997).

#### 4.8 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan merupakan eksperimental berupa terapi ekstrak buah kesemek junggo (*Diospyros kaki L.f.*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinjeksi *Complete Freund Adjuvant* (CFA), penentuan kadar TNF- $\alpha$  dan gambaran histopatologi sendi tikus (*Rattus norvegicus*). Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari lima ekor tikus sebagai ulangan.

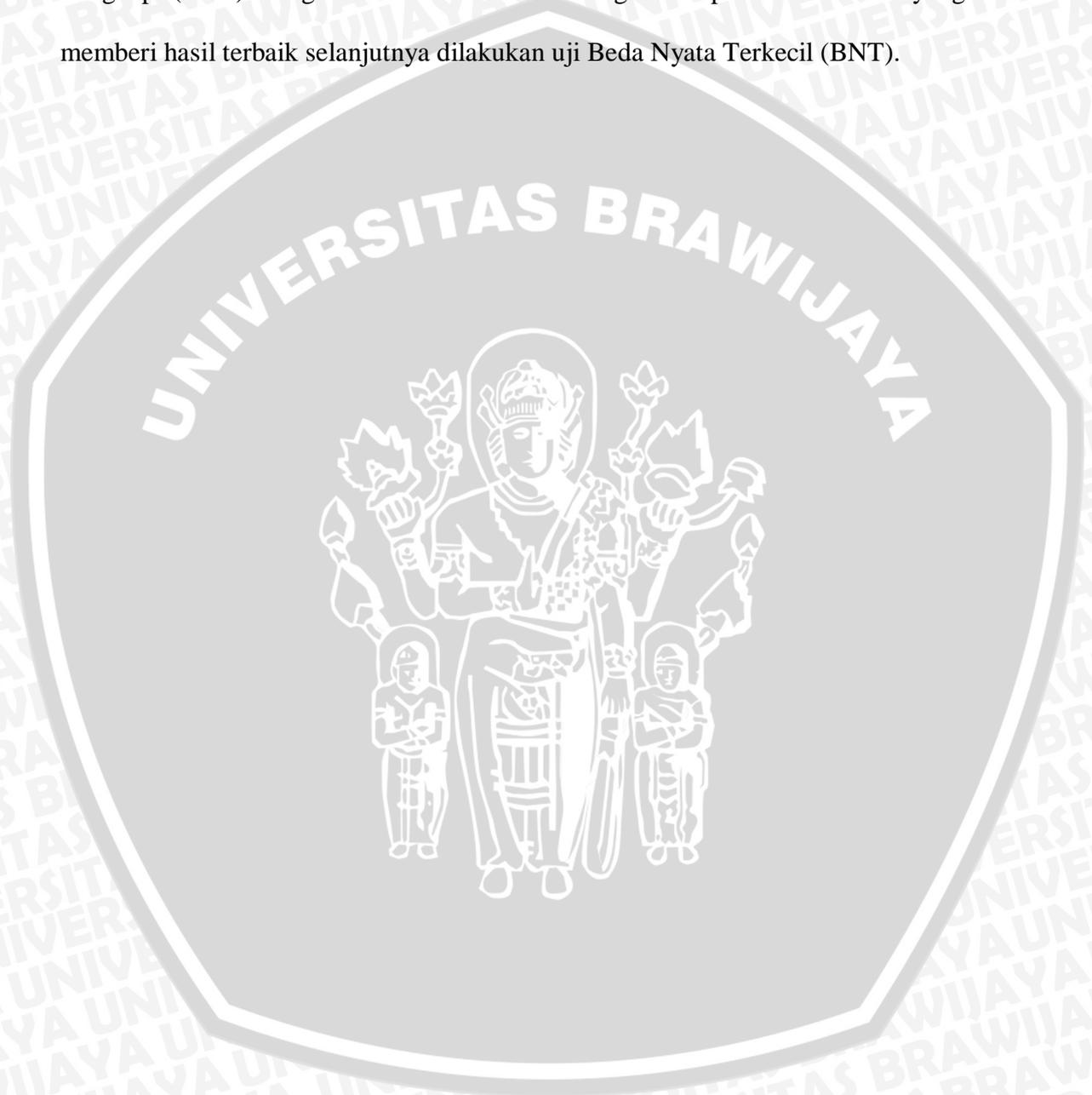
#### 4.9 Variabel Penelitian

Variabel Hewan coba dibagi menjadi tiga kelompok besar yaitu kelompok A merupakan tikus kontrol tanpa perlakuan, kelompok B tikus arthritis rheumatoid, kelompok C arthritis rheumatoid dengan terapi ekstrak buah kesemek junggo. Diamati pada penelitian ini yaitu:

1. Variabel bebas : Dosis ekstrak buah kesemek junggo pada tikus arthritis rheumatoid.
2. Variabel tergantung : Ekspresi TNF- $\alpha$  dan gambaran histopatologi jaringan sendi.
3. Variabel kontrol : Tikus (*Rattus norvegicus*) dalam keadaan normal.

#### 4.10 Analisis Data

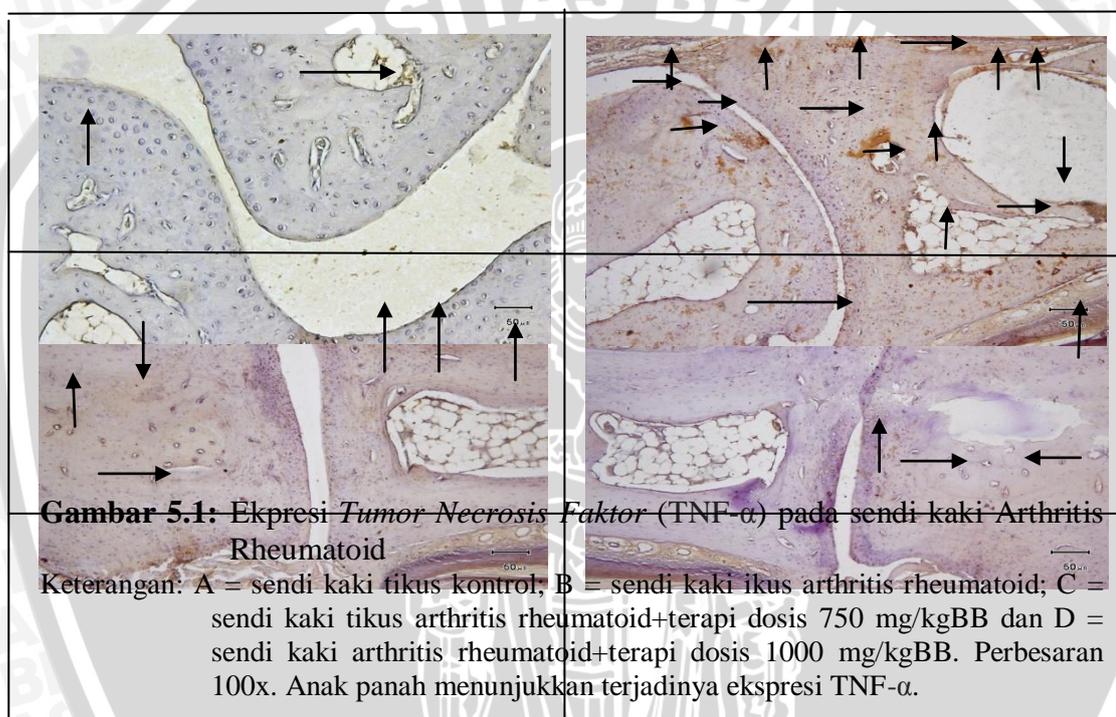
Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan ANOVA. Untuk mengetahui perlakuan mana yang memberi hasil terbaik selanjutnya dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).



## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Ekspresi *Tumor Necrosis Faktor* (TNF- $\alpha$ ) Pada Sendi Kaki *Arthritis Rheumatoid*

Ekspresi *Tumor Necrosis Faktor* (TNF- $\alpha$ ) pada tikus *Arthritis rheumatoid* dapat ditunjukkan pada gambar dibawah ini:



Hasil pewarnaan dengan metode *Imunohistokimia* (IHK) menunjukkan bahwa adanya ekspresi TNF- $\alpha$  pada setiap perlakuan yang terlihat dengan munculnya warna coklat pada bagian sitoplasma. Gambar 5.1 (A) merupakan kelompok tikus kontrol dimana sel yang terekspresikan oleh TNF- $\alpha$  pada sitoplasma sangat sedikit. Gambar 5.1 (B) merupakan tikus arthritis rheumatoid yang memiliki banyak warna coklat pada sitoplasma apabila dibandingkan dengan perlakuan lain. Hal ini dikarenakan TNF- $\alpha$  berupa sitokin meningkat sehingga

menunjukkan adanya inflamasi sel yang merupakan tanda dari arthritis rheumatoid. Gambar 5.1 (C) merupakan kelompok arthritis rheumatoid yang mendapatkan terapi ekstrak buah kesemek junggo dosis 750 mg/kgBB dimana pada kelompok ini terlihat penurunan warna coklat pada sitoplasma dibandingkan dengan gambar 5.1 (B) karena terapi ekstrak buah kesemek junggo mampu memberi efek untuk menurunkan TNF- $\alpha$ . Gambar 5.1 (D) merupakan kelompok arthritis rheumatoid yang mendapat terapi ekstrak buah kesemek junggo 1000 mg/kgBB, dimana dengan dosis yang lebih besar mampu menurunkan keberadaan TNF- $\alpha$  lebih banyak dari pada gambar 5.1 (C) dikarenakan pemberian dosis yang lebih tinggi mampu menurunkan TNF- $\alpha$  sehingga terekspresikan hampir sama dengan gambar 5.1 (A).

Penelitian Zeng, 2008 menunjukkan bahwa induksi menghasilkan jenis arthritis yang bersifat kronik dikarenakan TNF- $\alpha$  yang terekspresikan akibat dari proliferasi sel-sel mesotelium dan jaringan ikat pada tulang rawan hialin yang melapisi permukaannya sehingga jaringan ikat bentuknya tidak teratur sehingga menunjukkan erosi dengan begitu sitoplasma dalam tulang rawan hialin aktif sehingga memicu terjadinya ekspresi TNF- $\alpha$  pada sitoplasma (Green and Flavell, 2000).

*Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) itu sendiri merupakan sitokin yang disekresikan oleh makrofag sehingga memiliki peranan penting dalam terjadinya inflamasi. Keberadaan ekspresi sitokin TNF- $\alpha$  ini dikarena saat injeksi CFA maka akan terjadi kerusakan membran synovial yang menyebabkan vaskularisasi dan

infiltrasi sel-sel meningkat pada sel T CD4<sup>+</sup> (sel inflamatori) yang selanjutnya mengaktifasi makrofag sehingga memproduksi sitokin (TNF- $\alpha$ ) yang mengakibatkan terjadinya inflamasi. Ekspresi TNF- $\alpha$  pada penelitian ini ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada jaringan sendi tepatnya pada sitoplasma dikarenakan saat antigen masuk kedalam tubuh akan menjadi benda asing yang selanjutnya dikenali oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) berupa makrofag sehingga antigen tersebut menjadi kecil-kecil yang akan berikatan dengan MHC dan antigen tersebut dibawa kepermukaan sitoplasma yang selanjutnya berikatan dengan sel T CD4<sup>+</sup> sehingga menghasilkan sitokin berupa TNF- $\alpha$  yang terekspresikan (Green dan Flavell, 2000).

Sesuai dengan penelitian terdahulu (Zeng, 2008) bahwa proses terjadinya inflamasi dikarenakan pada tulang rawan hialin tepatnya di sitoplasma jumlah sitokin TNF- $\alpha$  mengalami peningkatan dikarenakan makrofag dalam sendi aktif sehingga TNF- $\alpha$  terekspresikan pada sitoplasma yang ditandai dengan banyaknya warna coklat pada tulang rawan hialin setelah dilakukan pewarnaan dengan *Imunohistokimia*.

**Tabel 5.1 Ekspresi Tumor Necrosis Faktor (TNF- $\alpha$ ) Pada Tikus Perlakuan**

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Ekspresi TNF- $\alpha$	Peningkatan Ekspresi TNF- $\alpha$ terhadap kontrol (%)
Kontrol (A)	1,557 $\pm$ 0,528154 <sup>a</sup>	0
Arthritis Rheumatoid (B)	8,959 $\pm$ 0,558148 <sup>b</sup>	475
Arthritis Rheumatoid+Terapi 750 mg	2,531 $\pm$ 0,28193 <sup>c</sup>	62

(C)				
Arthritis				
Rheumatoid+Terapi	1000	2,251±0,206014 <sup>c</sup>		44
mg (D)				

Peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  dapat dilihat pada Tabel 5.1 yang ditunjukkan dari persentase area melalui hasil foto preparat sendi kaki pada semua kelompok setelah dilakukan pewarnaan *Imunohistokimia* sehingga diperoleh nilai rata-rata dalam setiap kelompok. Sesuai dengan data diatas bahwa persentase antar kelompok mengalami perbedaan yaitu pada kelompok kontrol (A) 0%, kelompok arthritis rheumatoid (B) mengalami kenaikan yaitu 475% sedangkan kelompok arthritis rheumatoid dengan terapi 750 mg/kgBB (C) dan arthritis rheumatoid dengan terapi 1000 mg/kgBB (D) mengalami penurunan yaitu 62% dan 44% nilai-nilai persentase dalam setiap kelompok diperoleh dengan cara mengambil 5 foto dalam 1 kelompok karena dalam satu kelompok terdapat 5 ulangan. Dengan demikian diperoleh hasil peningkatan maupun penurunan antar kelompok. Sesuai pernyataan (Calnek, 1997) bahwa nilai persen area dapat diperoleh dari hasil foto sesuai bidang pandangnya yang ditentukan dari banyaknya ulangan dalam 1 kelompok.

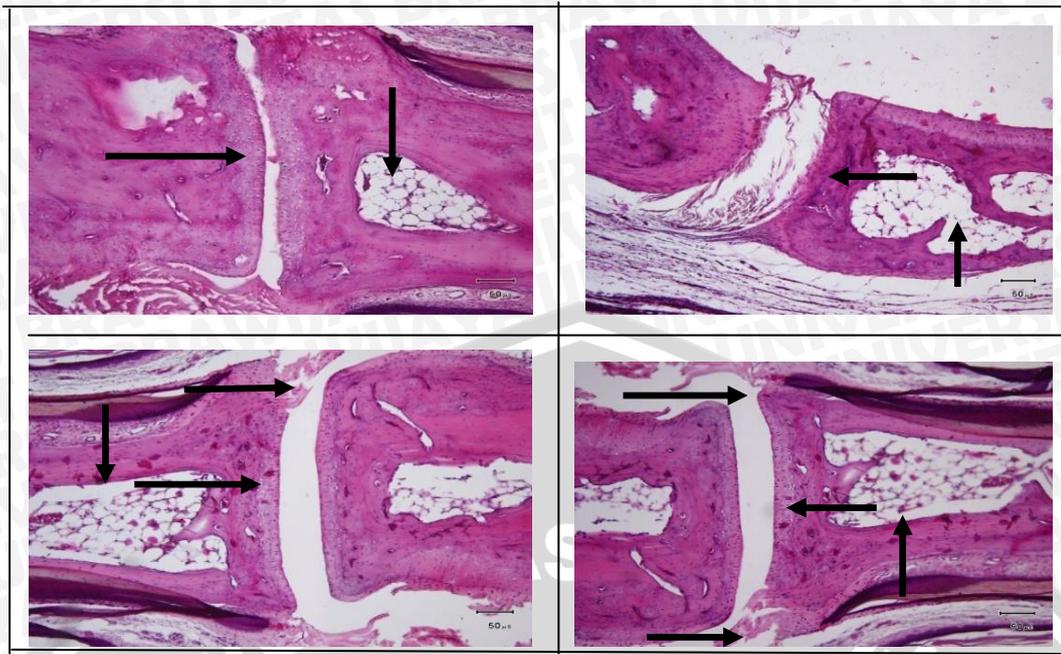
Persentase area merupakan banyaknya jumlah sel dalam luas bidang setelah dilakukan foto pada area yang diinginkan dengan menggunakan program *axio vixon*. Hasil yang diperoleh kemudian dikonversikan kedalam persentase yang dapat menandai suatu kenaikan maupun penurunan sel dalam suatu penyakit dan dilakukan penghitungan secara persentase yaitu dengan rumus rata-rata sakit dikurangi dengan rata-rata kontrol dibagi dengan rata-rata kontrol dikalikan dengan 100% (Calnek, 1997). Pengujian lanjutan dilakukan dengan uji BNT untuk

menentukan perlakuan yang memberikan hasil terbaik. Tabel 5.1 menunjukkan bahwa kelompok C dan D menunjukkan hasil terbaik dibandingkan dengan kelompok yang lain.

Persentase diatas juga didukung dengan pengamatan secara makroskopis yaitu dengan pengukuran pada bagian kaki belakang yang diukur menggunakan jangka sorong. Sesuai pengukuran jangka sorong kelompok arthritis rheumatoid (B) mengalami kebengkaan 2 kali lipat bila dibandingkan dengan kelompok kontrol (A) dan pada kelompok arthritis rheumatoid dengan terapi 750 mg/kgBB (C) serta arthritis rheumatoid dengan terapi 1000 mg/kgBB (D) mengalami penurunan ukuran sebesar 3/4 lebih kecil dibandingkan kelompok arthritis rheumatoid (B).

## **5.2 Histopatogi Sendi Kaki Arthritis Rheumatoid Dengan Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)**

Pengamatan dilakukan pada bagian sendi kaki belakang. Hal ini dikarenakan arthritis rheumatoid banyak menyerang bagian kaki belakang. Sesuai gambaran histopatologi dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) dapat dilihat adanya perubahan struktur tulang rawan hialin (kartilago) yang ditunjukkan pada Gambar 5.2 yaitu



**Gambar 5.2:** Hasil Pewarnaan HE pada Sendi Kaki Arthritis Rheumatoid

Keterangan: A = sendi kaki tikus kontrol; B = sendi kaki tikus arthritis rheumatoid; C = sendi kaki arthritis rheumatoid+terapi dosis 750 mg/kgBB dan D = sendi kaki arthritis rheumatoid+terapi dosis 1000 mg/kgBB. Perbesaran 100x. Anak panah menunjukkan terjadinya perubahan struktur tulang rawan hialin (kartilago) antar perlakuan.

Gambar 5.2 menunjukkan perbandingan kondisi kerusakan tulang rawan hialin yang ditunjukkan oleh anak panah pada sendi kaki belakang tikus. Gambar 5.2 (A) merupakan kelompok tikus sehat dimana stuktur tulang rawan hialin tetap normal dan tidak mengalami gangguan atau perubahan. Gambar 5.2 (B) merupakan kelompok arthritis rheumatoid dimana stuktur tulang rawan hialin yang tidak beraturan atau rusak hal ini dikarenakan sel mesenkim pada tulang rawan hialin dalam posisi yang tidak berkelompok sehingga mengakibatkan perubahan struktur tulang rawan hialin apabila dibandingkan pada gambar 5.2 (A). Gambar 5.2 (C) merupakan kelompok arthritis rheumatoid yang diterapi dengan ekstrak buah kesemek junggo dosis 750 mg/kgBB dapat dilihat strukturnya yang sudah membaik atau hampir kembali pada struktur normalnya. Hal ini dikarenakan sebagian dari sel mesenkim sudah berkelompok sehingga

membentuk struktur yang lebih baik apabila dibandingkan dengan Gambar 5.2 (B). Gambar 5.2 (D) merupakan kelompok arthritis rheumatoid yang diterapi dengan ekstrak buah kesemek junggo dosis 1000 mg/kgBB dapat dilihat perubahan struktur tulang rawan hialin yang sudah membaik dibandingkan dengan Gambar 5.2 (C) hal ini dikarenakan sel mesenkim sebagian besar sudah mengelompok kembali dan membentuk struktur tulang rawan hialin yang hampir sama dengan keadaan Gambar 5.2 (A).

Kerusakan sendi kaki pada tulang rawan hialin terjadi karena injeksi CFA mengakibatkan makrofag teraktivasi sehingga memproduksi sitokin (TNF- $\alpha$ ). Hal ini memicu terjadinya inflamasi sehingga mengakibatkan kerusakan jaringan pada tulang rawan hialin. Meningkatnya TNF- $\alpha$  pada sendi kaki maka akan merusak struktur sel yang terdapat pada tulang rawan hialin karena sendi merupakan pertautan antar tulang sehingga dengan mudah TNF- $\alpha$  merusak susunan sel mesenkim pada tulang rawan hialin sehingga mengakibatkan kerusakan jaringan pada tulang rawan hialin yang ditunjukkan pada Gambar 5.2 (B). Proses penyembuhan tulang rawan hialin (kartilago) sebagai dampak terapi dengan ekstrak buah kesemek junggo yaitu adanya perbaikan sel mesenkim yang pada saat tersebut berada dalam kondisi tidak beraturan maka akan dikelompokkan kembali oleh kondroblas yang merupakan pusat pembentukan tulang rawan hialin. Setelah dikelompokkan sel mesenkim membesar dan akan menghasilkan bahan dasar yaitu amorf dan prokolagen. Bahan-bahan tersebut memicu kondroblas mengalami pembelahan sehingga memperluas area tulang rawan hialin yang dikenal dengan pertumbuhan *interstitial*. Selanjutnya pada bagian tepi tulang rawan

hialin mengalami pertumbuhan atau kembali normal. Penyembuhan tulang rawan hialin dapat dilihat sesuai gambar yaitu Gambar 5.1 (C) dan (D) menunjukkan bahwa sudah terjadi perbaikan tulang rawan hialin yang hampir sesuai dengan kondisi normalnya.

Menurut Gotlin (2002) sel mesenkim ini berperan penting dalam tulang rawan hialin karena dapat menumbuhkan jaringan ikat dewasa melalui sifat dari sel mesenkim itu sendiri yaitu mampu membuat matrik dalam sel mesenkim mengumpulkan filamen-filamen dan membentuk serabut dengan begitu sel mesenkim dapat memperbaiki struktur tulang rawan hialin. Apabila mengalami kerusakan dengan tingginya aktivitas makrofag pada tempat inflamasi memicu terjadinya kerusakan tulang rawan hialin yang disebabkan sel-sel mesenkim tidak dalam satu kelompok. Untuk mengembalikan sel mesenkim dalam satu kelompok lagi dibutuhkan terapi obat herbal yang memiliki kandungan antioksidan yang tinggi seperti golongan polifenol yang menyebabkan kembalinya struktur tulang rawan hialin kearah normal.

### **5.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Kesemek Junggo Sebagai Bahan Terapi**

Buah kesemek junggo merupakan buah yang didalamnya memiliki kandungan polifenol berupa tanin yang mana memiliki peranan penting dalam proses penyembuhan arthritis rheumatoid yang dapat dilihat dengan penurunan jumlah sel yang terekspresikan oleh sitokin yaitu TNF- $\alpha$  pada sitoplasma dan perbaikan tulang rawan hialin. Kerja dari tanin itu sendiri yaitu saat terjadi

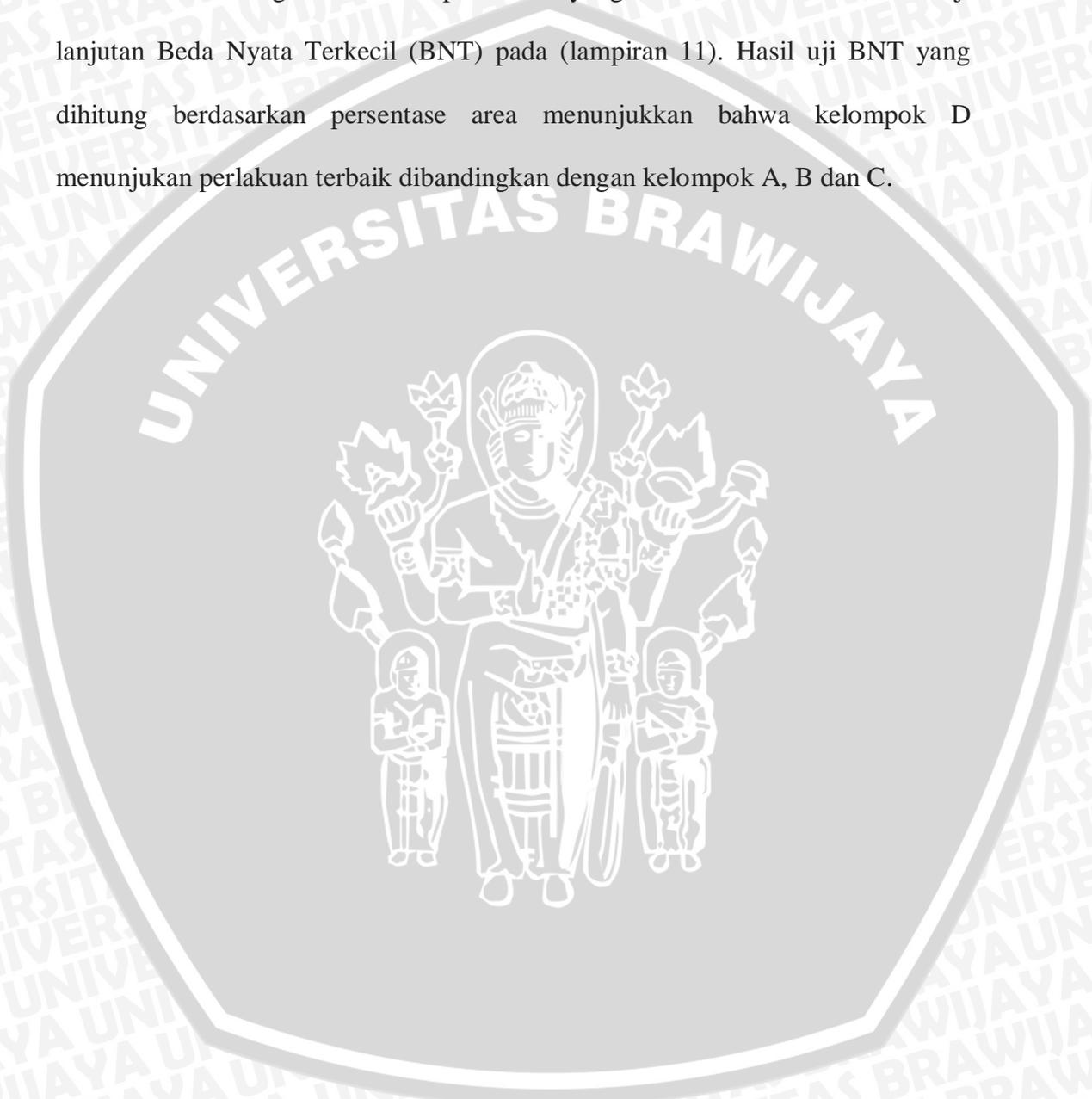
inflamasi maka elektrolit didalam tubuh menjadi tidak berpasangan sehingga makrofag memproduksi sitokin. Hal ini disebabkan karena kemampuan tanin dalam menyumbangkan elektrolit sehingga elektrolit kembali memiliki pasangan yang dapat menstabilkan sitokin. Dengan demikian terjadi perputaran atau *resonansi* terhadap gugus kimia tanin sehingga proses penyembuhan inflamasi pada sendi kaki dapat berjalan dengan baik yang ditandai dengan penurunan jumlah sel TNF- $\alpha$  yang terekspresi pada tulang rawan hialin dan kembalinya struktur normal tulang rawan hialin (kartilago) .

Menurut Nijdvelt (2001) mekanisme kerja tanin dalam menurunkan jumlah TNF- $\alpha$  yaitu melalui gugus -OH tanin dengan ATP dari enzim kinase yang berikatan akan menghambat TNF- $\alpha$  sehingga mengakibatkan penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  pada tulang rawan hialin. Sedangkan menurut De-jian jian (2004) akibat pemberian ekstrak buah kesemek junggo mampu menyebabkan sel mesenkim dapat ditekan dan mengelompok kembali, sehingga produksi sitokin proinflamasi yang memicu terjadinya inflamasi juga akan ditekan. Dengan demikian akan terjadi proses penyembuhan tulang rawan hialin dengan baik sehingga mampu memperbaiki struktur jaringan tulang rawan hialin pada tikus putih arthritis rheumatoid.

Pemberian ekstrak buah kesemek junggo sebagai bahan terapi arthritis rheumatoid mampu memberi pengaruh yang nyata antar perlakuan ( $p < 0.05$ ) sesuai (lampiran 11). Hal ini menunjukkan bahwa terapi ekstrak buah kesemek junggo pada tikus arthritis rheumatoid dapat menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada sendi kaki. Perbandingan jumlah sel yang mengekspresi TNF- $\alpha$  pada setiap perlakuan

ditunjukkan pada tabel 5.1 dan gambar 5.1 serta perbaiki tulang rawan hialin pada Gambar 5.2.

Untuk mengetahui hasil perlakuan yang terbaik maka dilakukan uji lanjutan Beda Nyata Terkecil (BNT) pada (lampiran 11). Hasil uji BNT yang dihitung berdasarkan persentase area menunjukkan bahwa kelompok D menunjukkan perlakuan terbaik dibandingkan dengan kelompok A, B dan C.



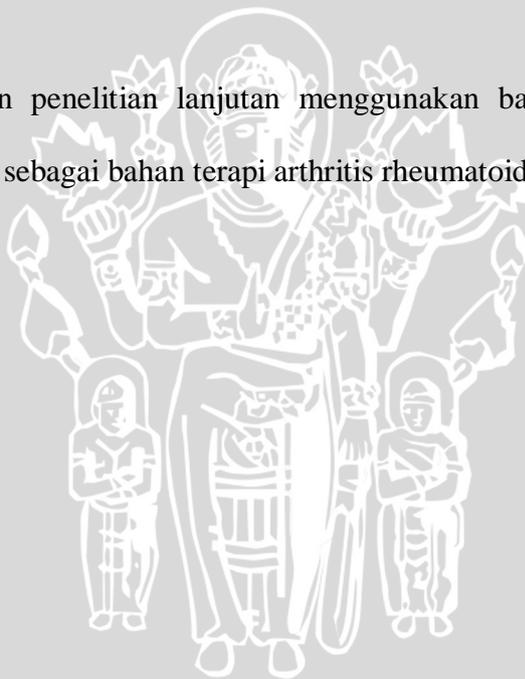
## BAB VI PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

- 1) Pemberian terapi ekstrak buah kesemek junggo terhadap tikus arthritis rheumatoid mampu memperbaiki kerusakan struktur tulang rawan hialin.
- 2) Pemberian terapi ekstrak buah kesemek junggo terhadap tikus arthritis rheumatoid mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada sendi kaki.

### 6.2 Saran

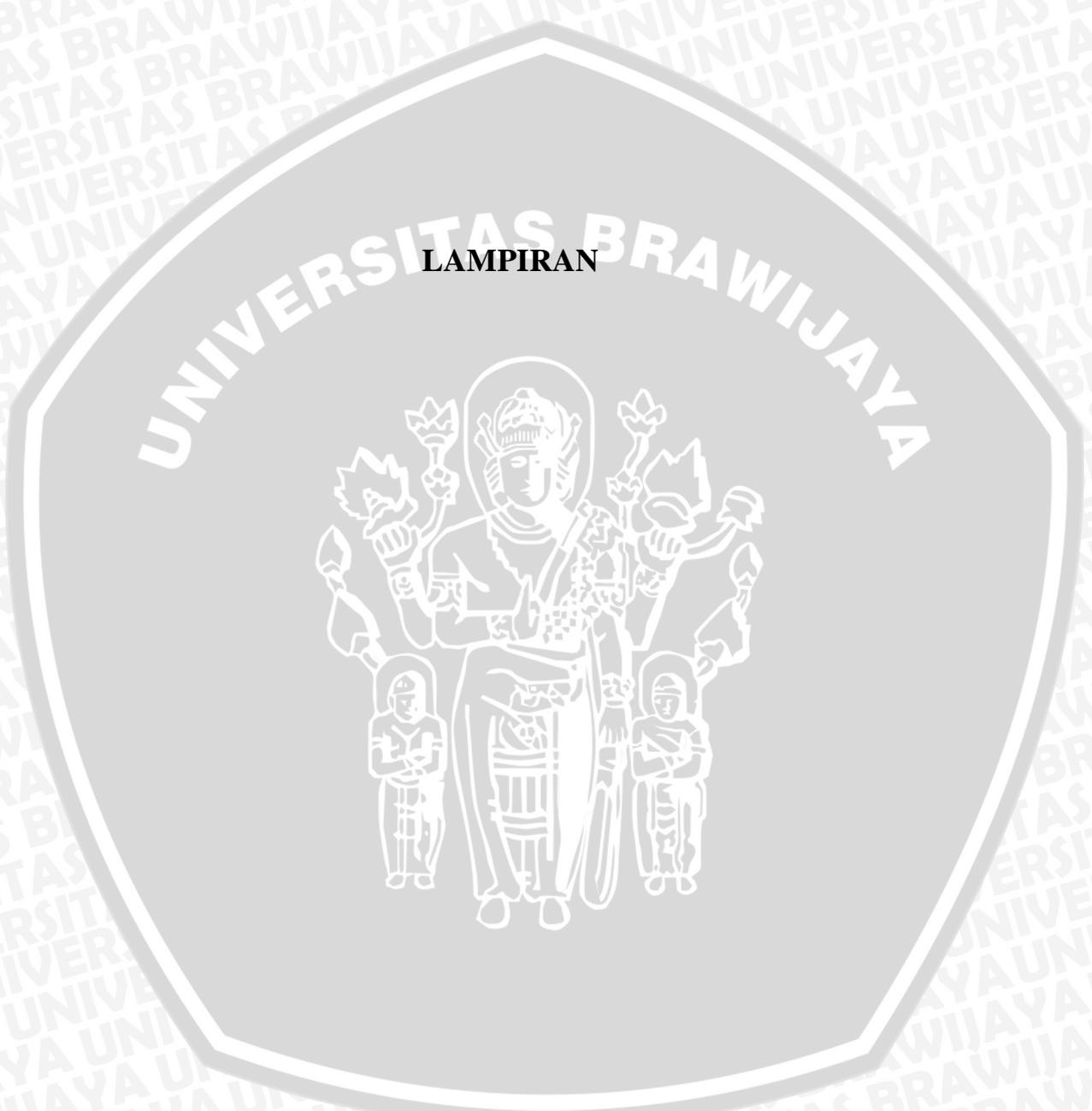
Perlu dilakukan penelitian lanjutan menggunakan bahan terapi herbal selain kesemek junggo sebagai bahan terapi arthritis rheumatoid.



## DAFTAR PUSTAKA

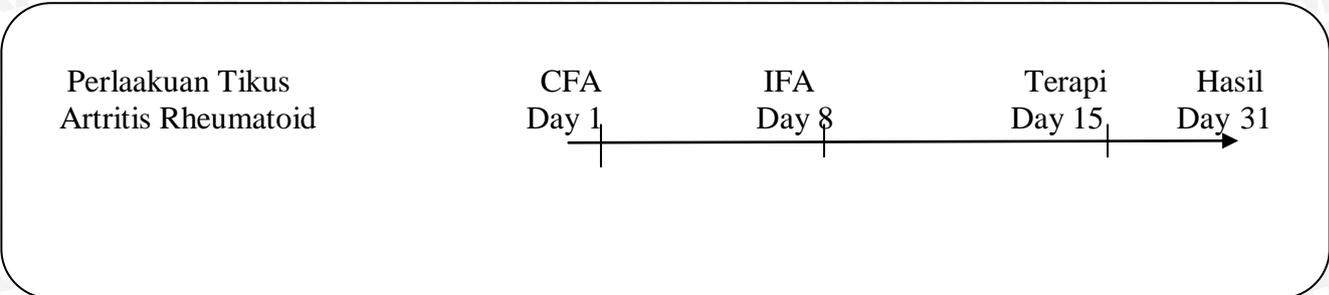
- Abbas, A. K., A.H. Lichtman, and J.S. Pober. 2000. *General Properties of the Immune Response*. In : Cellular and Molecular Immunology. WB Saunders Co. Philadelphia
- Abiyoso, A., D. Rudijanto, D.W. Hendrawan, H. Soeatmadji, H.M. Kalim, Soedirjo, dan H. Achmad. 1994. Ilmu Penyakit Dalam. Laboratium Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Malang
- Anonymous. 2005. Kandungan *Complete Freund Adjuvant* (CFA). Jakarta
- Baswarsiati. 2009. *Kesemek Junggo*. Jakarta : Rajawali Press dan Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB
- Calnek, B.W. 1997. *Imunohistokimia*. Ames: Iowa State University Press
- De-jian jian. 2004. Pharmacological Effects of Tanin. *Drug. Journal Kedokteran Hewan* 8(4):257-263
- Green, E.A, E.E. Eynon, and R.A. Flavell. 1998. Local expression of TNF-a in disease arthritis rheumatoid. *Immunity*, 9: 733-743.
- Green, E.A, and R.A. Flavell. 2000. The temporal importance of TNF-a expression in the development of arthritis reumatoid. *Journal Immunity*, 12: 459-469.
- Gotlin, G. 2002. The Osteoclast Clin Orthop. *Journal Kedokteran* 6(3):164-168.
- Junquiera, L.C, and J. Carneiro. 2007. *Basic Histology*. The McGraw-Hill Companies
- Kavanaugh, A.F, and P. Lipsky. 1999. *Reumatoid Arthritis Inflammation, Basic Principle and Clinical Corelates*. Edition, Lippincott William and Wilkins. Philadelphia.
- Kusriningrum. 2008. Perancangan Percobaan. Airlangga University Press. Surabaya. Hal 21.
- Miller, S.D, J.C. Russel, H.E. MacInes, J. Abdelkrim, and R.M. Fewster. 2010. Multiple peternity in wild population of invasive *Rattus* species. *New Zeland Journal of Ecology* 34(3): 360-362.
- Mycek. J. 2001. Farmakologi. Edisi ke-2. Penerbit: Widya Madika

- Nasution, A.R, dan Sumariyono. 2006. *Introduksi Reumatologi*. In : Sundoyo, A. W.
- Nijveldt, E. 2001. Tanin: A Review of Probable Mechanism of Action and Potential Application. *Am Journal Clin Nurt*: 74: 418-425.
- Office of Animal Care and Institutional Biosafety (OACIB). 2005. *Guidelines – Polyclonal Antibodies Production*. Diakses tanggal 5 Mei 2012.
- Pfeffer, K. 2003 Biological Functions Of *Tumor Necrosis Factor* Cytokines And Their Receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 185–191
- Poole, H. 2005. Analysis Of Cytokoin In Disease *Arthritis Rheumatoid*. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 13: 91-98.
- Potter, W.P. 2007. *Rats and Mice :Introduction and use In Research*. Health Sciences Center for Educational Resources University of Washington.
- Prabowo, S. 2005. Pengaruh Stresor Dingin Terhadap Proses Keradangan Pada Arthritis Adjuvant: Penelitian Ekspresi mental pada Arthritis Adjuvant (Model Hewan Untuk AR). [Tesis].Iptunair J. Pharm.
- Schwartz, D.A. 2002. The Genetics of Innate Immunity and Arthritis Rheumatoid. *Chest Journal* 121 : 62S–68S
- Sharp, P.E, and M.C. La Regina. 1998. *The Laboratory and Sensitivitas Arthritis Rheumatoid Rat*. America: CRC Press LLC
- Shiel, W.C. 2006. *Rheumatoid Arthritis*. Medicinenet. Com. Diakses tanggal 5 Mei 2012.
- Suk, K, S.Kim, Y.H. Kim, K.A. Kim, I. Chang, H. Yagita, M. Shong, and M.S. Lee. 2001. IFN-g/TNF-a synergism as the final effector in autoimmune arthritis rheumatoid. *Journal of Immunology*, 166: 4441-4489.
- Suryana, B.P. 2006. *Agen Biologik Dalam Terapi Penyakit Reumatik*. In : Sundoyo, A. W, dkk. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam, jilid 2, edisis 4. Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FKUI. Jakarta.
- Zeng, Q.Y. 2008. Effect of tumor necrosis factor a on disease arthritis reumatoid. *Journal of Experimental Medicine*, 180: 995-1004.



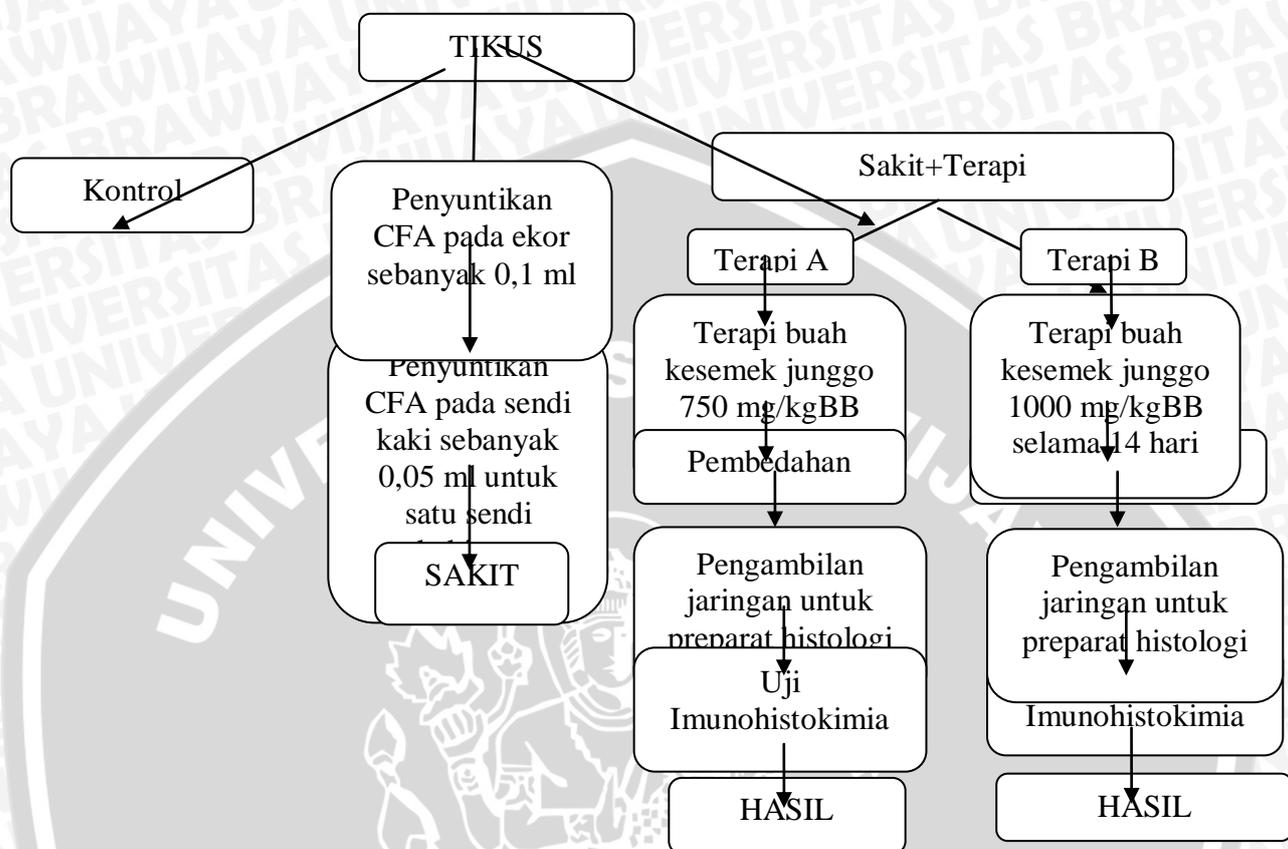
LAMPIRAN

## 1. Rancangan Perlakuan



- 0,1ml dengan menggunakan *Complete Freund Adjuvant* (CFA).
- Hari 8 dilakukan penyuntikan pada bagian sendi kakinya yang 1 kaki sebanyak 0,05 ml dengan menggunakan *Complete Freund Adjuvant* (CFA).
- Hari 18 dilakukan terapi dengan buah Kesemek Junggo yang diberikan sebanyak 750 mg/kgBB dengan 1000 mg/kgBB yang telah dibagi 2 kelompok terapi.
- Hari 31 dilakukan pembedahan untuk memperoleh hasil yaitu ekspresi *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) dan gambaran Histopatologi sendi kaki.

## 2. Alur Penelitian



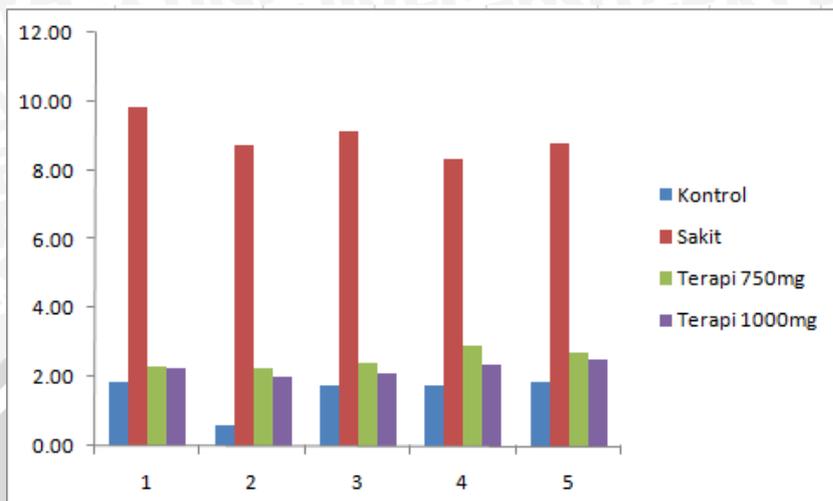
## 3. Langkah-langkah Uji Pewarnaan Imunohistokimia

## Preparat Sendi Kaki

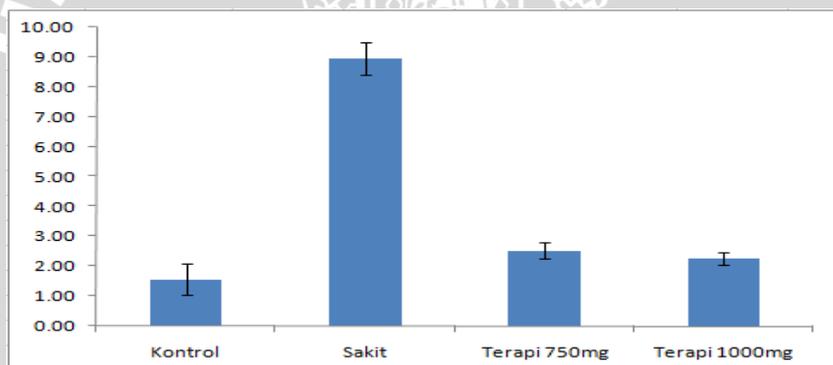
- 1) Dicuci PBS pH 7,4 selama 1X5 menit
- 2) Ditetesi 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit
- 3) Dicuci PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
- 4) Diblok 5% FBS (*Fetal Bovine Serum*) selama 1 jam
- 5) Dicuci PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
- 6) Diinkubasi dengan antibodi sekuender selama 1 jam dengan suhu ruang
- 7) Dicuci PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
- 8) Ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radin Peroxidase*) selama 40 menit
- 9) Dicuci PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
- 10) Ditetesi dengan DAB (*Diamano Benzidine*) selama 10 menit
- 11) Dicuci PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
- 12) *Counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 10 menit
- 13) Dicuci dengan air mengalir
- 14) Dibilas dengan aquades dan dikeringkan
- 15) Di *maunting* dengan *entellan* dan ditutup dengan cover glass

## HASIL

4. Diagram Antar Ulangan Dalam Setiap Perlakuan



5. Diagram Antar Perlakuan



6. One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Persentase
N		20
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	3.8244
	Std. Deviation	3.08721
Most Extreme Differences	Absolute	.364
	Positive	.364
	Negative	-.199
Kolmogorov-Smirnov Z		1.630
Asymp. Sig. (2-tailed)		.010

7. Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.



7. Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.319	3	16	.303

8. Multiple Comparisons

**Persentase**

**Tukey HSD**

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	Sakit	-7.40160	.26696	.000	-8.1654	-6.6378
	terapi 750mg	-.97420	.26696	.010	-1.7380	-.2104
	terapi 1000mg	-.69460	.26696	.081	-1.4584	.0692
Sakit	Control	7.40160	.26696	.000	6.6378	8.1654
	terapi 750mg	6.42740	.26696	.000	5.6636	7.1912
	terapi 1000mg	6.70700	.26696	.000	5.9432	7.4708
terapi 750mg	Control	.97420	.26696	.010	.2104	1.7380
	Sakit	-6.42740	.26696	.000	-7.1912	-5.6636
	terapi 1000mg	.27960	.26696	.725	-.4842	1.0434
terapi 1000mg	Control	.69460	.26696	.081	-.0692	1.4584
	Sakit	-6.70700	.26696	.000	-7.4708	-5.9432
	terapi 750mg	-.27960	.26696	.725	-1.0434	.4842

9. Tukey HSD

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3



Control	5	1.5568		
terapi 1000mg	5	2.2514	2.2514	
terapi 750mg	5		2.5310	
Sakit	5			8.9584
Sig.		.081	.725	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

### 10 Hasil Uji ANOVA

Persentase	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	178.236	3	59.412	333.454	.000
Within Groups	2.851	16	.178		
Total	181.087	19			

berpengaruh nyata, jadi dianalisis lanjutan (BNT)

### 11 Uji BNT

$$BNT(\alpha) = t_{\frac{\alpha}{2};v} \sqrt{KTG \left( \frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B} \right)}$$

t tabel 2.472878  
 KTG 0.178171  
 BNT (0,05) 0.660164

$\alpha = 0,05$

v = db galat

n = banyak pengamatan

A	1.556711	A
B	8.958546	B
C	2.531043	C



Interpretasi

berdasarkan uji BNT, dapat disimpulkan bahwa:

1. perlakuan A dan B mempunyai pengaruh yang berbeda
2. perlakuan A dan C mempunyai pengaruh yang berbeda
3. perlakuan A dan D mempunyai pengaruh yang berbeda
4. perlakuan B dan C mempunyai pengaruh yang berbeda
5. perlakuan B dan D mempunyai pengaruh yang berbeda
6. perlakuan C dan D mempunyai pengaruh yang sama

#### 12. Perhitungan Dosis

Perhitungan dosis I ini yaitu berat kering dari daging buah kesemek junggo 750 mg selanjutnya diberikan aquades sebanyak 50 ml. Volume aquades dijadikan sampai 10ml dan dibagi 5 tikus karena dalam 1 perlakuan terdapat 5 ulangan sehingga diperoleh hasil 2 ml setiap ekor. Untuk dosis II berat kering dari daging buah kesemek junggo 750 mg selanjutnya diberikan aquades sebanyak 50 ml. Volume aquades dijadikan sampai 10ml dan dibagi 5 tikus karena dalam 1 perlakuan terdapat 5 ulangan sehingga diperoleh hasil 2 ml setiap ekor (Zeng,2008).

### 13. Pembuatan PBS-Azida

Diambil 200 ml larutan PBS dengan pH 7,4 dalam gelas kimia 250 ml. Kemudian ditambah 8 tetes larutan azida 1 % ( $\text{NaN}_3$ ) dengan menggunakan pipet tetes. Dihomogenkan larutan tersebut dengan magnetic stirrer (Junquiera, 2007).

### 14. Pembuatan Larutan NaCl-fis 0,9%

$$\text{Rumus NaCl-fis } 0,9\% = (0,9/100) \times 500 \text{ ml} = 4,5 \text{ g}$$

Ditimbang NaCl sebanyak 4,5 gram dan dilarutkan terlebih dahulu dalam 100 ml aquades steril. Dipindahkan kedalam labu ukur 500 ml dan diencerkan dengan aquades steril hingga tanda batas (Junquiera, 2007).

### 15. Pembuatan Paraformaldehid (PFA) 4%

$$\text{Rumus: } V_1 M_2 = V_2 M_1$$

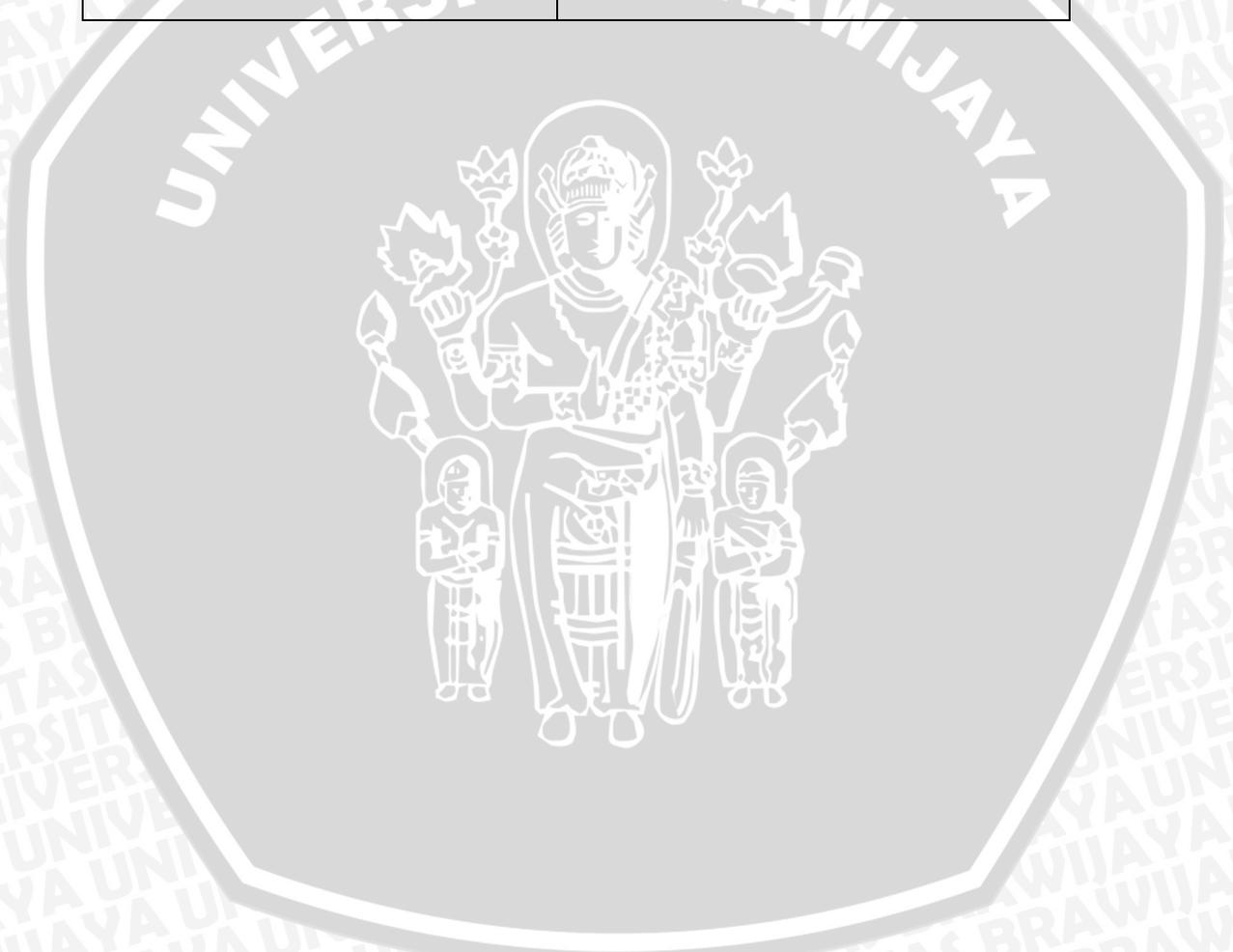
$$V_1 \times 37\% = 100 \text{ ml} \times 4\%$$

$$V_1 = 10,8 \text{ mL}$$

Langkah pertama yaitu membuat larutan NaCl-fis 0,9% sebagai pelarut caranya ditimbang NaCl sebanyak 1,8 gram lalu dilarutkan dalam 200 ml aquades dan distirer. Larutan PFA 4% dapat dibuat dengan mengambil 10,8 ml formadehid 37% dimasukkan dalam labu ukur 100 ml dan ditambah NaCl fisiologis sampai tanda batas (Junquiera, 2007).

16. Tabel Komposisi Ransum Tikus Percobaan

Bahan-Bahan	Jumlah (%)
Protein kasein	$X = 1.60 \times 100\%N$ sampel (10% port)
Minyak jagung	$[(8-X) \times \% \text{ekstrak eter}] / 100$
Campuran mineral	$[(5-X) \times \% \text{kadar abu}] / 100$
Campuran vitamin	1
CMC	$[(1-X) \times \% \text{kadar serat kasar}] / 100$
Air	$[(5-X) \times \% \text{kadar air}] / 100$
Maizena	Untuk membuat 100%



17. Pembuatan Preparat *Hematoxylin Eosin* (HE)

Diisolasi dan dipotong organ kaki belakang bilas dengan NaCl-fis 0,9% dan disimpan dalam PBS-azida pH 7,4

Fiksasi dengan suhu 4° C dan dalam keadaan teragitasi

Dehidrasi menggunakan etanol dari 70% sampai absolute selama 10-30 menit dalam keadaan teragitasi dan suhu 4° C

Infiltrasi menggunakan propylene murni dalam keadaan teragitasi dengan suhu ruang selama 30 menit

Embeding: objek glass diolesi gliserin dan dalam keadaan hangat

Blok paraffin: jaringan dimasukkan kedalam paraffin dan jaringan dipotong sesuai posisinya

Sectioning: blok paraffin dipotong dengan ketebalan 4 µm. Potongan ditempatkan pada air hangat dengan suhu 37° C.

Pewarnaan HE: xylol 5 mnt, alcohol 100%, 96%, 80% 2 mnt, bilas air 1 mnt, ditetesi mayer HE tunggu 7,5 mnt, bilas air 1 mnt, ditetesi eosin (0,5%) alcohol asam asetat 1 mnt, bilas air 15 dtk, bilas alcohol 86% 15 dtk, 96% 30 dtk, 100% 45 dtk dan terakhir xylol 2 mnt

18. Serbuk Lark Lark





**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELOMPOK ETIK  
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 120-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** :PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK AIR BUAH  
KESEMEK JUNGGO (*Diospyros kaki* L.F.) PADA TIKUS  
PUTIH (*Rattus norvegicus*) ARTRITIS AJUVAN

**PENELITI** : DEVI WIDIYANA

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT** : PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN/UNIVERSITAS  
BRAWIJAYA

**DINYATAKAN** : LAIK ETIK

Malang, 16 Januari 2013  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya

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



## 19. Sertifikat Keterangan Identifikasi



LABORATORIUM TAKSONOMI DAN STRUKTUR TUMBUHAN  
 JURUSAN BIOLOGI, FAKULTAS MIPA  
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
 JALAN VETERAN, MALANG 65145  
 Telepon/faks: 0341-575841

---

**KETERANGAN IDENTIFIKASI**


---

No. 0053/Takso.Identifikasi/03/2012

Kepala Laboratorium Taksonomi dan Struktur Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:

Nama (NIM) : Devi Widiyana (0811310013)  
 Nealvin Irvan M. (0811313016)  
 Arifin Wibowo (0811313003)  
 Much. Ali Mahsan (0811313015)  
 Bornea Pertiwi Putri (0811313005)

Instansi : Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya

Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1965), volume II, halaman 184-189, diidentifikasi sebagai:

**Family** : **Ebenaceae**  
**Genus** : **Diospyros**  
**Spesies** : **Diospyros kaki L.f.**

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 14 Maret 2012

Kepala Laboratorium  
 Taksonomi dan Struktur Tumbuhan,



Rodiyati Azrianingsih, MSc. PhD  
 NIP. 19700128 199412 2 001