

TERAPI EKSTRAK RUMPUT LAUT COKLAT (*Sargassum duplicatum bory*) TERHADAP AKTIVITAS ENZIM PROTEASE DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI JARINGAN SENDI (*Proximal Interphalangeal*) TIKUS ARTRITIS AJUVAN STRESOR DINGIN

SKRIPSI

Oleh:
BENI SEPFO BUDI PRIBADI
115130107111024



PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

TERAPI EKSTRAK RUMPUT LAUT COKLAT (*Sargassum duplicatum bory*) TERHADAP AKTIVITAS ENZIM PROTEASE DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI JARINGAN SENDI (*Proximal Interphalangeal*) TIKUS ARTRITIS AJUVAN STRESOR DINGIN

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

BENI SEPFO BUDI PRIBADI
115130107111024



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**



LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

TERAPI EKSTRAK RUMPUT LAUT COKLAT (*Sargassum duplicatum bory*) TERHADAP
AKTIVITAS ENZIM PROTEASE DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI JARINGAN SENDI
(*Proximal Interphalangeal*) TIKUS ARTRITIS
AJUVAN STRESOR DINGIN

oleh:

Beni Sepfo Budi Pribadi
115130107111024

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 19 Desember 2017
Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

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

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

Mengetahui,
Dekan Program Studi Kedokteran Hewan
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

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

IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul Skripsi : Terapi Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum Duplicatum Bory*) Terhadap Aktivitas Enzim Protease Dan Gambaran Histopatologi Jaringan Sendi (*Proximal Interphalangeal*) Tikus Arthritis Ajuvan Stresor Dingin

Nama Mahasiswa : Beni Sepfo Budi Pribadi

NIM : 115130107111024

Program Studi : Kedokteran Hewan

TIM PEMBIMBING

Pembimbing 1 : Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

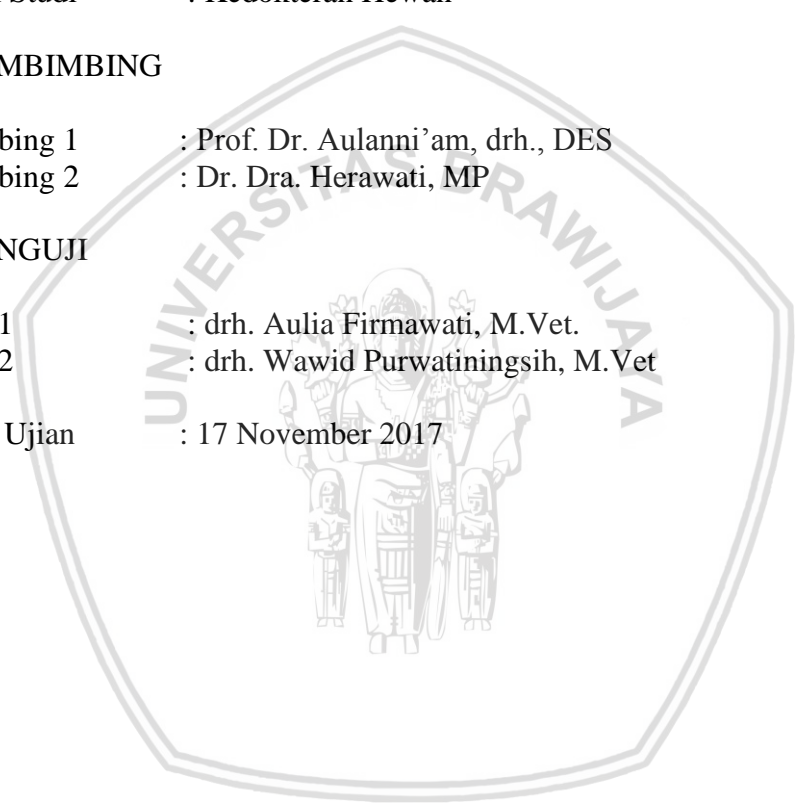
Pembimbing 2 : Dr. Dra. Herawati, MP

TIM PENGUJI

Penguji 1 : drh. Aulia Firmawati, M.Vet.

Penguji 2 : drh. Wawid Purwatiningsih, M.Vet

Tanggal Ujian : 17 November 2017



LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Beni Sepfo Budi Pribadi

NIM : 115130107111024

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Terapi Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum Duplicatum Bory*)
Terhadap Aktivitas Enzim Protease dan Gambaran Histopatologi
Jaringan Sendi (*Proximal Interphalangeal*) Tikus Arthritis Ajuvan
Terpapar Stresor Dingin

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 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 saya terima.

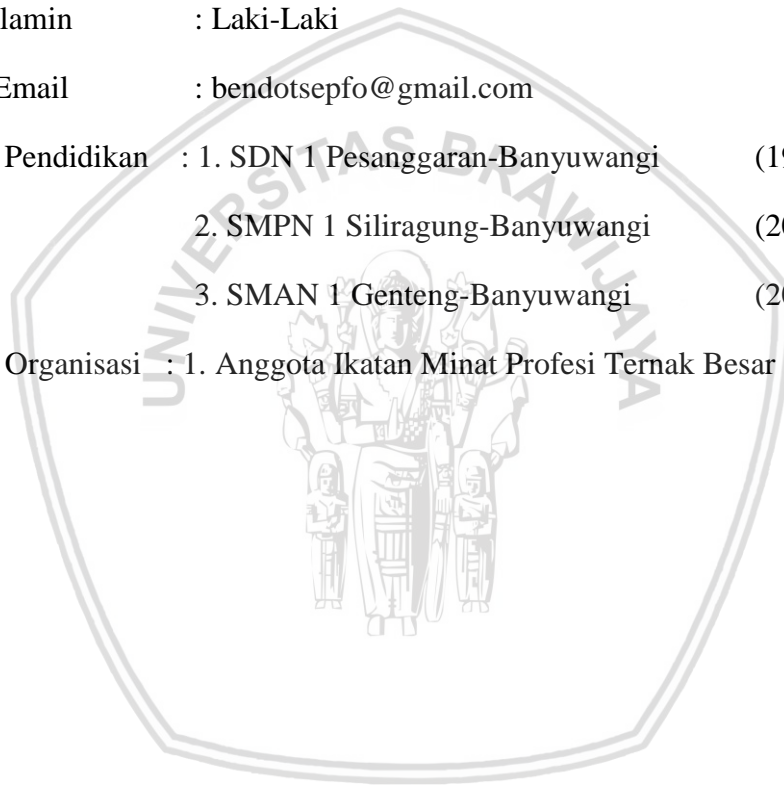
Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran

Malang, 19 Desember 2018

(Beni Sepfo Budi Pribadi)
NIM. 115130107111024

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama : Beni Sepfo Budi Pribadi
NIM : 115130107111024
Tempat, Tanggal Lahir : Banyuwangi, 4 September 1993
Agama : Islam
Alamat : Dsn. Krajan RT 02 RW 03 Pesanggaran Banyuwangi
Jenis Kelamin : Laki-Laki
Alamat Email : bendotsepfo@gmail.com
Riwayat Pendidikan : 1. SDN 1 Pesanggaran-Banyuwangi (1999 – 2005)
2. SMPN 1 Siliragung-Banyuwangi (2005 – 2008)
3. SMAN 1 Genteng-Banyuwangi (2008 – 2011)
Riwayat Organisasi : 1. Anggota Ikatan Minat Profesi Ternak Besar



KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Tuhan Yang Maha Esa yang senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga dapat menyelesaikan Proposal Skripsi yang berjudul “**Terapi Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum bory*) terhadap Aktivitas Enzim Protease dan Gambaran Histopatologi Jaringan Sendi (*Proximal Interphalangeal*) Tikus Artritis Ajuvan Terpapar Stresor Dingin**”. Penelitian ini sebagai salah satu syarat memperoleh gelar sarjana Kedokteran Hewan. Tidak lupa penulis ucapkan terima kasih kepada pihak – pihak yang telah membantu terselesaikannya laporan ini :

1. Prof.Dr.Aulanni'am.drh.DES selaku dosen pembimbing pertama atas bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktunya.
2. Dr.Dra.Herawati.MP selaku dosen pembimbing kedua yang telah membimbing dengan kesabaran, koreksi dan waktunya.
3. drh. Aulia Firmawati.M.Vet. dan drh. Wawid Purwatiningsih, M.Vet selaku dosen penguji atas koreksi, kritik, saran, kesabaran dan waktu.
4. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Ketua Program Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan demi kemajuan PKH UB.
5. Vivi Shofia, S.Si dan Hilman Nurmahdi S.Si yang telah banyak membantu penulis dalam penelitian ini sehingga penelitian dapat berjalan dengan baik dan lancar.
6. Keluarga penulis, Ayah, Mama, Kakak dan Adik tercinta yang senantiasa memberikan semangat dan doa yang tiada henti demi keberhasilan.

7. Keluarga besar Bebeluck yang senantiasa memberikan bantuan dan dukungan dalam penyelesaian penulisan skripsi.
8. Teman-teman kelompok penelitian “Adhit, Alda, Dedi, Esa dan Ja’far” yang telah berjuang bersama dalam penelitian ini.
9. 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 selanjutnya.

Malang, Januari 2018

Penulis

**TERAPI EKSTRAK RUMPUT LAUT COKLAT (*Sargassum duplicatum bory*) TERHADAP
AKTIVITAS ENZIM PROTEASE DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI JARINGAN
SENDI (*Proximal Interphalangeal*) TIKUS ARTRITIS
AJUVAN STRESOR DINGIN**

ABSTRAK

Arthritis reumatoid merupakan penyakit autoimun yang menyerang sendi yang dapat menyebabkan inflamasi pada membran sinovial. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*) dalam menurunkan aktifitas protease yang dilakukan dengan metode spektrofotometri dan mengetahui gambaran histologi jaringan sendi tikus arthritis ajuvan dengan metode *Hematosiklin Eosin* (HE). Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus yang terdiri dari 4 perlakuan yaitu (1) merupakan tikus kontrol negatif, (2) tikus kontrol positif, (3) tikus arthritis ajuvan dipapar stresor dingin pada suhu 5⁰C, (4) tikus arthritis ajuvan diberi paparan stresor dingin pada suhu 5⁰C kemudian diterapi ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*) dengan dosis 400mg/kg BB selama 14 hari. Untuk membuat keadaan arthritis reumatoid dilakukan dengan injeksi *Complete Freund Adjuvant* (CFA) sebanyak 0,1 ml pada pangkal ekor. *Booster* dilakukan setelah 1 minggu pada bagian kaki belakang masing-masing 0,05 ml. Data dianalisis menggunakan ANOVA dan dilakukan uji lanjutan BNJ 0,05% untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan. Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak rumput laut coklat dengan dosis 400 mg/kgBB secara signifikan ($p < 0,05$) mampu menurunkan aktivitas protease sebesar 54,84% dan dapat memperbaiki struktur pada jaringan sendi *proximal interphalangeal* pada tikus arthritis ajuvan yang terpapar stresor dingin. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak rumput laut coklat dapat digunakan sebagai terapi herbal pada tikus arthritis ajuvan.

Kata kunci : Arthritis reumatoid, *Complete Freund Adjuvant* (CFA), protease, rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*.), stresor dingin.

Therapy Effect Of Brown Seaweed (*Sargassum duplicatum bory*) Extract On The Protease Enzyme Activities And Histopathological Joint (*Proximal Interphalangeal*) In Arthritis Adjuvant Rats (*Rattus Norvegicus*) Exposed to Cold Stressors

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease that attacks the joints that can cause inflammation of the synovial membrane. The purpose of this study was to determine the effect of extracts of brown seaweed (*Sargassum duplicatum bory*) in reducing protease activity conducted by the method spectrophotometric and determine histological joint tissue of arthritis adjuvant rats by the method Hematosiklin eosin (HE). This study using rats that consists of 4 treatments: (1) negative control rats, (2) positive control rats, (3) the arthritis adjuvant rats was exposed to cold stressor at temperature of 5⁰C, (4) arthritis adjuvant rats by exposed to cold stressor at temperature of 5⁰C further treated with extract of brown seaweed with a dose of 400mg / kg for 14 days. To make matters rheumatoid arthritis is done by injection Complete Freund's Adjuvant (CFA) 0.1 ml at the base of the tail. Booster done after one week on the back of each leg of 0.05 ml. Data were analyzed using ANOVA and BNJ test advanced 0.05% to view and analyze the differences between the treatment groups. The results showed brown seaweed extract at a dose of 400 mg / kg significantly (p <0.05) were able to decrease the protease activity of 54.84% and can improve the structure of the joint tissue *proximal interphalangeal* in adjuvant arthritis rats exposed to cold stressor. The conclusion of this study is a brown seaweed extract can be used as an herbal therapy in adjuvant arthritis rats.

Keywords: Rheumatoid arthritis, Complete Freund's Adjuvant (CFA), protease, brown seaweed (*Sargassum duplicatum Bory*), cold stressor.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
ABSTRAK	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan.....	4
1.5 Manfaat.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Arthritis Reumatoid	6
2.2 Hewan Coba arthritis Reumatoid dibuat dengan injeksi CFA	7
2.3 Mekanisme Complete freund's Adjuvant (CFA)	8
2.4 Stresor dingin.....	9
2.5 Rumput Laut Coklat (<i>Sargassum duplicatum bory</i>).....	10
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	
PENELITIAN	12
3.1 Kerangka Konseptual	12
3.2 Hipotesis Penelitian	13
BAB IV METODE PENELITIAN	14
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	14
4.2 Bahan Penelitian	14
4.2.1 Hewan Coba	14
4.2.2 Alat dan Bahan Penelitian	14
4.3 Tahapan Penelitian	15
4.3.1 Penetapan Sampel Penelitian.....	15
4.3.2 Pembagian Kelompok Penelitian	16
4.3.3 Rancangan Penelitian	17
4.3.4 Variabel Penelitian	17
4.4 Prosedur Kerja	18
4.4.1 Persiapan Hewan Model.....	18
4.4.2 Prosedur Induksi Arthritis Adjuvan Menggunakan CFA..	20
4.4.3 Prosedur Pemberian Stresor Dingin	20
4.4.3 Prosedur Pemberian Stresor Dingin	20
4.4.4 Pembuatan Ekstrak Etanol Rumput Laut Coklat.....	20
4.4.5 Pemberian Terapi Ekstrak Etanol Rumput Laut Coklat	21
4.4.6 Prosedur Pengambilan Jaringan Sinovial	21

4.4.7 Pembuatan Preparat Histopatologi dengan metode HE	21
4.4.8 Isolasi Protease dan Uji Aktivitas Enzim Protease.....	23
4.5 Analisa Data	23
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASA.....	24
5.1 Terapi Ekstrak Rumput Laut Coklat terhadap Aktifitas Enzim Protease Tikus Arthritis Ajuvan Terpapar Stresor Dingin	24
5.2 Terapi Ekstrak Ethanol Rumput Laut Coklat Pengaruh terhadap Gambaran Histopatologi Jaringan Sendi Tikus Arthritis Ajuvan terpapar Stresor Dingin.....	27
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN.....	32
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	



Daftar Tabel

Tabel		Halaman
4.1	Kelompok Penelitian.....	16
5.1	Aktivitas protease serum darah tikus artritis ajuvan terpapar stresor dingin yang diterapi dengan ekstrak rumput laut coklat.....	25



Daftar Gambar

Gambar		Halaman
2.1	<i>Ratus norvegicus strain Wistar</i>	8
2.2	Rumput Laut Coklat (<i>Sargassum duplicatum bory</i>)	11
3.1	Kerangka Konseptual	12
5.1	Gambar Histopatologi Jaringan Sendi <i>Proximal Interphalangeal</i>	28



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Sertifikasi Laik Etik	27
2 Skema Penelitian.....	28
3 Pembuatan dan Penentuan Dosis Ekstrak Rumput Laut Coklat	29
4 Analisa Statistik menggunakan SPSS	40
5 Perhitungan Presentase Aktivitas Protease	44
6 Diagram Kerja Pengukuran Aktivitas Protease.....	45
7 Pengukuran Aktivitas Protease.....	46



DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APC	<i>Antigen-Presenting Cell</i>
AR	Arthritis reumatoid
BNJ	Beda Nyata Jujur
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
H ₂ O ₂	Hidrogen Peroksida
HCl	Asam Hidroklorida
HE	Hematoksin-Eosin
IL	Interleukin
NaCl	Natrium klorida
NO	Nitrit oxide
NSAID	<i>Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menurut Arthritis Foundation (2012) bahwa sekitar 20 persen *pet animal* di Amerika menderita artritis reumatoid pada usia tua. Artritis reumatoid (AR) merupakan penyakit autoimun yang menyebabkan peradangan pada sendi, antara lain pergelangan tangan, jari tangan, sendi bahu, sendi lutut, dan panggul. Artritis reumatoid umumnya menyerang pada sendi kiri dan sendi kanan secara bersamaan. Artritis reumatoid disebabkan oleh suatu ekspresi patologik respon imun yang dikendalikan secara genetik terhadap suatu rangsangan antigen (Darmawan, 1993). Penyakit artritis reumatoid dapat berlangsung secara terus-menerus dan semakin lama akan bertambah lebih berat, tetapi ada juga berlangsung selama sehari-hari dan berlangsung kronis, yaitu sembuh dan kambuh kembali secara berulang-ulang sehingga menyebabkan kerusakan sendi secara menetap (Brooke, 1994).

Penelitian ini menggunakan artritis ajuvan sebagai hewan coba yang di injeksi dengan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis*. Tanda-tanda artritis reumatoid diketahui melalui gejala klinis yaitu adanya peradangan pada sendi ekstremitas. Sedangkan stresor dingin akan meningkatkan proses peradangan dengan terjadinya peningkatan *interleukin* pada plasma dan jaringan sendi (Prabowo, 2004).

Protease merupakan salah satu kelompok mediator inflamasi yang mampu menyebabkan kerusakan jaringan selama proses inflamasi. Protease dibutuhkan secara fisiologis untuk kehidupan organisme pada tumbuhan, hewan, dan

mikroorganisme karena protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein. Tripsin, kimotripsin, pepsin dan renin merupakan protease hewan pada umumnya yang paling banyak dikenal. (Gupta dkk, 2002).

Farmakologi untuk Arthritis reumatoid adalah obat-obat golongan immunosupresan (misalnya azatioprin, metotreksat, siklosporin), obat anti inflamasi non steroid (misalnya diklofenak, indometasin, piroksikam, ketorolak) dan kortikosteroid (misalnya metilprednisolon dan deksametason). Pengobatan arthritis reumatoid yang bersifat kronik ini, memberikan efek samping yang cukup banyak. maka dari itu penelitian ini menggunakan *Sargassum duplicatum bory* dengan dosis 400mg/kg BB. *Sargassum duplicatum bory* merupakan salah satu jenis rumput laut coklat di Indonesia yang melimpah dan memiliki potensi sebagai antioksidan. Ekstrak rumput laut coklat memiliki kandungan antioksidan yang berperan dalam proteksi untuk menghambat reaksi oksidasi sehingga dapat mempengaruhi aktivitas enzim protease dan memperbaiki gambaran histopatologi jaringan sendi *Proximal Interphalangeal* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) arthritis ajuvan (Jhamandas *et al.*, 2005).

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian terapi ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) arthritis ajuvan yang terpapar stresor dingin berpengaruh terhadap penurunan aktivitas enzim protease?

2. Apakah terapi ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*) berpengaruh terhadap perbaikan histopatologi jaringan sendi *Proximal Interphalangeal* pada kaki tikus (*Rattus norvegicus*) artritis ajuvan yang terpapar stresor dingin ?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang berusia 10-12 minggu berat badan 100-250 gram yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta serta mendapatkan sertifikasi laik etik penelitian oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No. 326-KEP-UB (**Lampiran 1**).
2. Pembuatan keadaan artritis reumatoid pada hewan model tikus artritis dilakukan dengan cara induksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) sebanyak 0,1 mL dengan konsentrasi *mycobacterium tuberculosis* 1- mg/mL dibagian pangkal ekor secara intradermal pada hari ke-1 dan diberikan booster 0,1 mL CFA setelah 14 hari secara intradermal pada kaki kanan dan kiri (Prabowo, 2005).
3. Pemberian stresor dingin dilakukan dengan memasukkan tikus (*Rattus norvegicus*) artritis ajuvan ke dalam *cold chamber* yang diatur pada suhu 5⁰ C selama 15 menit.

4. Rumpun laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*) diperoleh dari perairan laut Madura dan dilakukan taksonomi di Balai Materia Medica di Batu Malang terlebih dulu.
5. Dosis terapi ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*) yang digunakan adalah 400 mg/kg BB.
6. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah aktivitas enzim protease secara spektrofotometri dan gambaran histopatologi jaringan sendi pada tikus dengan metode pewarnaan HE.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Membuktikan bahwa pemberian terapi ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) artritis ajuvan yang terpapar stresor dingin berpengaruh terhadap penurunan aktivitas enzim protease.
2. Membuktikan bahwa terapi ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*) berpengaruh terhadap perbaikan histopatologi jaringan sendi *Proximal Interphalangeal* pada tikus (*Rattus norvegicus*) artritis ajuvan yang terpapar stresor dingin.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah diharapkan dapat mengetahui peran rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*) terhadap penurunan aktivitas enzim protease pada tikus (*Rattus novergicus*) artritis ajuvan yang terpapar stresor

dingin dan mengetahui pengaruh terhadap perbaikan histopatologi jaringan sendi (*Proximal Interphalangeal*) pada tikus (*Rattus novergicus*) artritis ajuvan tersebut.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Arthritis Reumatoid

Arthritis Reumatoid (AR) adalah suatu penyakit autoimun yang mengakibatkan peradangan dalam waktu lama pada sendi. Penyakit ini mampu menyerang persendian dan anggota gerak yang menimbulkan rasa nyeri dan kaku pada sistem muskuloskeletal yang terdiri dari sendi, tulang, otot, dan jaringan ikat. Arthritis reumatoid (AR) dapat menyerang hampir semua sendi, tetapi yang paling sering adalah sendi di pergelangan tangan, buku-buku jari, lutut, dan engkel kaki. Sendi-sendi lain yang mungkin diserang termasuk sendi di tulang belakang, pinggul, sendi bahu sendi lutut, pergelangan tangan dan jari (Tehlirian *et al*, 2008).

Patogenesis Arthritis Reumatoid yaitu sistem imun yang tidak mampu lagi membedakan keduanya dan menyerang jaringan sinovial serta jaringan penyokong lain. Inflamasi berlebihan merupakan manifestasi utama yang tampak pada kasus arthritis reumatoid. Inflamasi terjadi karena adanya paparan antigen. Antigen dapat berupa antigen eksogen, seperti protein virus atau protein antigen endogen (Schuna, 2008).

Patofisiologi pada arthritis reumatoid, reaksi autoimun terutama terjadi dalam jaringan sinovial. Proses fagositosis menghasilkan enzim-enzim dalam sendi. Enzim-enzim tersebut akan memecah kolagen sehingga terjadi edema, proliferasi membran sinovial dan akhirnya pembentukan pannus. Pannus akan menghancurkan tulang rawan dan menimbulkan erosi tulang. Akibatnya adalah hilangnya permukaan sendi yang akan mengganggu gerak sendi. Otot akan

turut terkena karena serabut otot akan mengalami perubahan degeneratif dan kekuatan kontraksi otot (Smeltzer & Bare, 2002).

Protease merupakan enzim golongan hidrolase yang akan memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana, seperti menjadi oligopeptida pendek atau asam amino dengan reaksi hidrolisis pada ikatan peptida. Enzim ini diperlukan oleh semua makhluk hidup karena bersifat esensial dalam metabolisme protein. Perannya dalam tubuh antara lain membantu pencernaan protein dalam makanan yang menggunakan kembali protein-protein intraseluler, koagulasi sel darah, dan aktivasi berbagai jenis protein, enzim (Poliana J, MacCabe AP, 2007). Enzim protease mengacu pada sekelompok enzim yang berfungsi untuk menghidrolisis protein. Enzim protease juga disebut dengan enzim proteolitik atau proteinase. Protease menguraikan protein menjadi molekul yang lebih kecil, dimana setiap enzim protease memiliki kemampuan berbeda dalam menghidrolisis ikatan peptida (Indriyani, 2010).

2.2 Hewan Coba artritis Reumatoid dibuat dengan injeksi CFA

Menurut Adiyati (2011) hewan coba merupakan hewan yang dikembangbiakkan untuk digunakan sebagai hewan uji coba. Tikus sering digunakan pada berbagai macam penelitian medis selama bertahun-tahun. Hal ini dikarenakan tikus memiliki karakteristik genetik yang unik, mudah berkembang biak, murah serta mudah untuk mendapatkannya. Tikus merupakan hewan yang melakukan aktivitasnya pada malam hari (*nocturnal*).



Gambar 2.1 *Rattus norvegicus strain wistar* (Adiyati, 2011).

Sistem klasifikasi tikus *rattus norvegicus* menurut(Adiyati, 2011).

Kingdom	:	Animalia
Filum	:	Chordata
Kelas	:	Mamalia
Ordo	:	Rodentia
Subordo	:	Sciurognathi
Famili	:	Muridae
Sub-Famili	:	Murinae
Genus	:	Rattus
Spesies	:	<i>Rattus norvegicus</i>

2.3 Mekanisme *Complete freund's Adjuvant (CFA)*

CFA digunakan sebagai induksi artritis ajuvan yang menyebabkan respon 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. CFA merupakan suatu *adjuvant* yang memiliki mengandung *Mycobacterium butyricum* yang digunakan untuk meningkatkan imunogenitas dan merangsang respon imun yang lebih besar dari

pada antigen. CFA mengaktifasi limfosit T yang berpoliferasi sebagai respon *heat shock* protein sehingga menimbulkan respon inflamasi yang dapat merusak sel dan jaringan. Tikus arthritis ajuvan yang di injeksi CFA akan mengalami terganggunya sistem imun dan terjadinya stimulus yang mengakibatkan membran synovial mengalami hyperplasia yang mengakibatkan terjadinya peningkatan vaskularisasi dan infiltrasi sel-sel pada sel T CD4⁺. Sel T CD4⁺ akan teraktivasi dan menstimulasi monosit, makrofag dan synovial fibroblas sehingga dapat mengakibatkan terjadinya sekresi sitokin proinflamatori (Prabowo, 2005; Wiralis dan Endang, 2009).

2.4 Stresor dingin

Stresor adalah kejadian lingkungan yang berpotensi menimbulkan stres sehingga memunculkan reaksi stres seperti ketakutan, kecemasan, dan kemarahan. Ada beberapa bentuk stresor, antara lain stresor psikologis (contohnya: kritis, frustrasi, konflik, tekanan) dan stresor bio ekologis (contohnya: suara bising yang mengganggu, polusi udara, suhu terlalu panas atau dingin, ketidakcukupan gizi (Greenberg, 2004)). Secara fisiologis tubuh akan berusaha meregulasi untuk mempertahankan suhu tubuh agar tetap stabil dengan mentransfer energi dari makanan menjadi panas yang dinamakan thermogenesis ketika dipapar stresor dingin (Guyton dan Hall, 2011)

2.5 Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum bory*)

Sargassum duplciatum bory adalah salah satu jenis alga coklat yang banyak ditemukan di perairan Indonesia. Rumput laut ini mempunyai cabang seperti jari, dan merupakan tanaman yang berwarna coklat, berukuran relative besar. Jenis rumput laut dikelompokkan menjadi 4 kelas besar, yaitu Rhodophyceae (rumput laut merah), Phaeophyceae (rumput laut coklat), Clorophyceae (rumput laut hijau), Cyanophyceae (rumput laut hijau-biru). *Sargassum sp* adalah salah satu genus dari kelompok rumput laut coklat yang merupakan keluarga *sargassaceae* (Anggadiredja, 2006).

Klasifikasi *Sargassum sp.* (Anggadiredja, 2006) adalah sebagai berikut;

Divisio : Thallophyta

Kelaas : Phaeophyceae

Bangsa: Fucales

Suku : Sargassaceae

Marga: *Sargassum*

Jenis : *Sargassum sp*



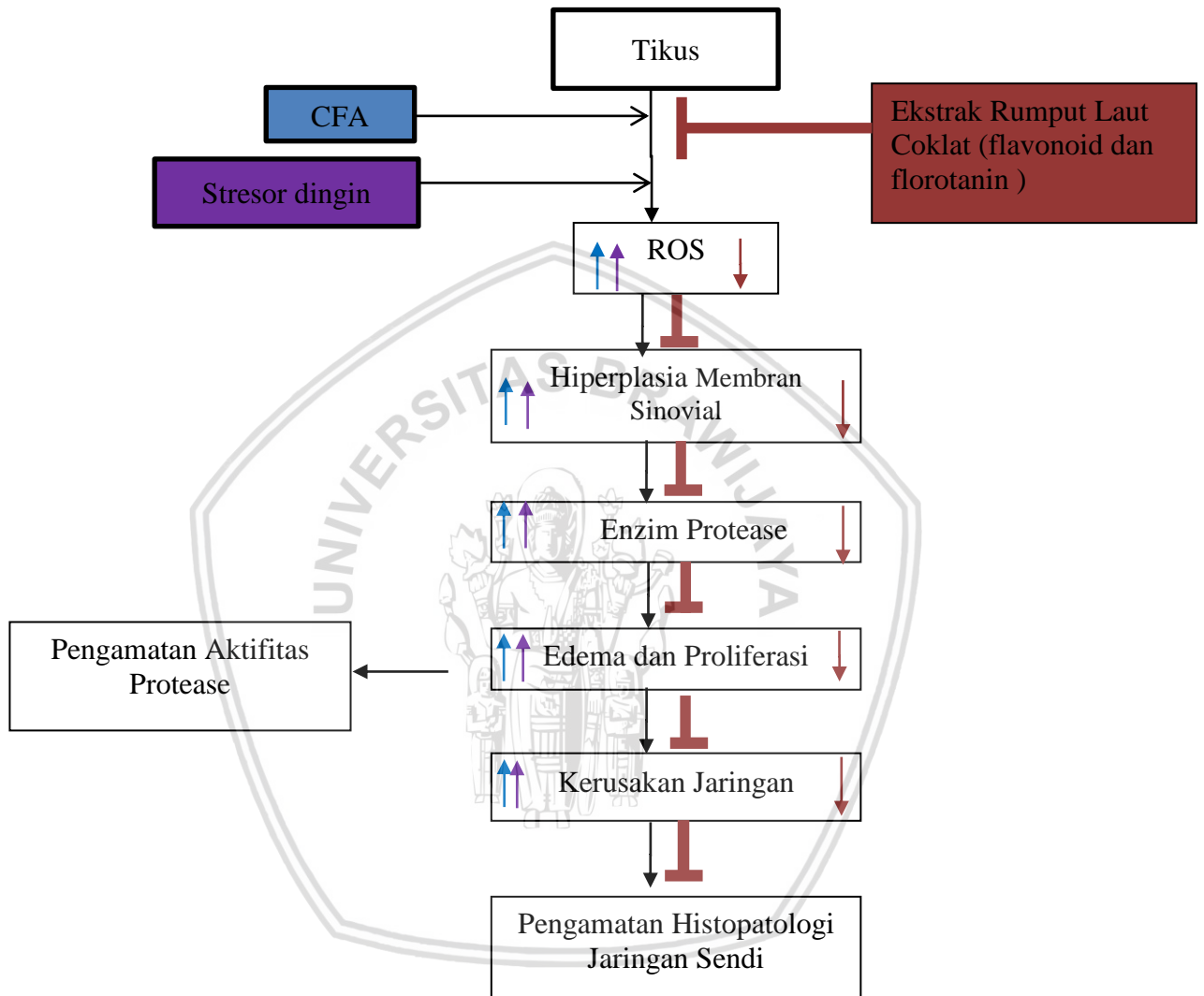
Gambar 2.2 Rumput laut coklat (Anggadiredja, 2006)






Rumput laut coklat (*Sargassum sp.*) termasuk golongan alga yang memiliki kandungan berupa protein, lemak, karbohidrat, alginat, vitamin, mineral, dan iodin. Selain itu, terdapat kandungan antioksidan sebagai scavenger radikal bebas berupa senyawa polifenol (flavonoid dan florotanin) dan fukosantin pada *Sargassum sp.* (William, 2006; Winarsi, 2007).

Berdasarkan sumbernya antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu antioksidan sintetik dan alami. Antioksidan sintetik mempunyai efektivitas tinggi, namun belum tentu aman bagi kesehatan. Antioksidan alami memiliki keuntungan yaitu aman karena tidak terkontaminasi zat kimia dan mudah diperoleh. Antioksidan alami dapat dipilih sebagai sumber antioksidan yang aman untuk dikembangkan. *Sargassum duplicatum* bory merupakan salah satu jenis rumput laut coklat dari Indonesia yang berpotensi sebagai antioksidan. Kandungan antioksidan pada rumput laut coklat berperan dalam proteksi untuk menghambat reaksi oksidasi sehingga dapat mempengaruhi aktivitas enzim protease (Jhamandas et al., 2005)

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



- Keterangan
-  : Peningkatan akibat CFA
 -  : Peningkatan akibat stresor dingin
 -  : Penurunan akibat terapi
 -  : Menstimuli
 -  : Menghambat



Tikus yang diinjeksi oleh *Complete Freund Adjuvan* (CFA) menyebabkan terjadinya respon inflamasi yang ditandai dengan adanya hiperplasia pada membran sinovial. CFA tersebut memicu radikal bebas sehingga mengakibatkan adanya produksi *Reaktif Oxygen Spesies* (ROS). Sedangkan stresor dingin menurut penelitian yang dilakukan oleh (Prabowo, 2004) akan meningkatkan proses peradangan. Membran sinovial tersebut mengalami peningkatan yang mengfagosit enzim-enzim didalamnya sampai terpecah-pecah termasuk enzim protease. Enzim protease yang terpecah mengalami peningkatan sehingga terjadi edema dan proliferasi yang dapat menimbulkan kerusakan jaringan sendi. Ekstrak rumput laut coklat memiliki kandungan antioksidan yang memiliki peran dalam proteksi untuk menghambat reaksi oksidasi sehingga mampu mempengaruhi aktivitas enzim protease dan memperbaiki gambaran histopatologi jaringan sendi *Proximal Interphalangeal* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) artritis ajuvan.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Terapi ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) artritis ajuvan yang terpapar stresor dingin berpengaruh terhadap penurunan aktivitas enzim protease.
2. Terapi ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*) berpengaruh terhadap perbaikan histopatologi jaringan sendi *Proximal Interphalangeal* pada tikus (*Rattus norvegicus*) artritis ajuvan yang terpapar stresor dingin.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Perawatan, perlakuan dan penelitian terhadap hewan model dilaksanakan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Pembedahan serta pengukuran aktivitas enzim protease dan gambaran histopatologi jaringan sendi tikus yang dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilaksanakan bulan Januari 2015 sampai dengan Juni 2015.

4.2 Bahan Penelitian

4.2.1 Hewan coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang berusia 10-12 minggu. Pemeliharaan hewan coba dilakukan didalam kandang berupa bak plastik dengan tutup kawat beralas sekam yang ditempatkan di laboratorium biokimia FMIPA Univeritas Brawijaya Malang. Setiap pagi diberi makan kosentrat standar berupa pellet dan minum secara *ad libitum*.

4.2.2 Alat dan Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan alat-alat meliputi kandang tikus, timbangan untuk menimbang berat badan tikus, alat fiksasi, alat deseksi hewan coba, alat pencekok oral (sonde lambung), pot untuk fiksasi jaringan, gunting bedah, spuit 1cc, pinset anatomis, pinset chirurgis, jarum pentul, kertas label, *microtube*,

micropipete, tabung reaksi, labu ukur (10 mL, 50 mL, 100 mL), vorteks, kertas saring, alat sentrifugasi, entellan, labu *erlenmeyer*, corong gelas, labu evaporator, labu penampung, *rotary evaporator*, *objek glass*, *cover glass*, lem entellan, cetakan dari logam berbentuk L untuk *embedding*, *Water bath*, *Staining* jaringan untuk pengecatan, mikroskop digital kamera untuk melihat hasil sediaan.

Bahan yang dipergunakan pada hewan coba adalah *Sargassum duplicattum bory* dengan dosis 400 mg/kg BB dan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA). Bahan pemeriksaan adalah darah tikus, jaringan sinovial tikus, bahan untuk pembuatan preparat histologis metode paraffin antara lain larutan bouin untuk fiksasi yang dibuat dari asam pikrat jenuh 1, 22 % sebanyak 750 mL, formaldehid 37-40 % sebanyak 250 mL, asam asetat glasial sebanyak 50 mL, juga diperlukan bahan untuk dehidrasi yaitu alkohol 70 %, 80 %, 90 %, 95 % dan absolut. Larutan untuk clearing yaitu xylol atau xylene, sedangkan untuk blok jaringan digunakan paraffin cair. Albumin meyer, dibuat dari putih telur dan gliserin 1:1, canada balsam untuk *mounting*.

Bahan untuk pewarnaan Hematoxyline Eosin (HE) adalah larutan xylol, Alkohol 95 %, air kran, larutan hematoxyline, alkohol asam (acid alcohol) 1%, Larutan ammonia, Larut Eosin.

4.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Penetapan Sampel Penelitian

Kriteria inklusi hewan model adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar*, jenis kelamin jantan, umur 12 minggu, berat badan antara 150-200 gram,

kondisi sehat (berambut cerah, aktivitas baik, tidak ada abnormalitas anatomis, dan nafsu makan baik).

4.3.2 Pembagian Kelompok Penelitian

Kelompok penelitian ditunjukkan dalam tabel 4.1 sebagai berikut :

Tabel 4.1 Kelompok Penelitian

Kelompok	Perlakuan
P1	Kelompok kontrol tikus normal (Kontrol negatif)
P2	Kelompok tikus arthritis hasil induksi CFA (Kontrol positif)
P3	Perlakuan dibuat menjadi arthritis dan diberi stresor dingin yaitu dimasukkan dalam ruangan 5 ⁰ C selama 15 menit setiap hari selama 7 hari berturut-turut
P4	Perlakuan dibuat menjadi arthritis dan diberi stresor dingin dengan cara dimasukkan dalam ruangan 5 ⁰ C selama 15 menit selama 7 hari dan diberikan ekstrak rumput laut coklat dengan dosis 400 mg/kg BB secara per oral selama 14 hari.

Banyaknya hewan model yang diperlukan dalam penelitian dapat dihitung dengan menggunakan rumus $p(n-1) \geq 15$ (Kusriningrum, 2008).

Sehingga :

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 19$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah minimal ulangan yang diperlukan

Berdasarkan hasil perhitungan diatas, untuk lima kelompok perlakuan diperlukan jumlah lima kali ulangan dalam setiap kelompok sehingga jumlah seluruh tikus yang diperlukan sebanyak 20 ekor. Selanjutnya dibagi dalam 4 kelompok yaitu P1, P2, P3, P4.

4.3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental (*experiment design*) dengan menggunakan metode *Post test only control group design*, yaitu kegiatan percobaan (eksperimen) yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh yang timbul sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini menggunakan tikus putih jenis Wistar sebagai hewan coba, yang dibuat menjadi arthritis reumatoid (selanjutnya disebut arthritis ajuvan) dengan cara melakukan injeksi secara intradermal pada pangkal ekor tikus 0,1 mL *Coplete Freund's Adjuvant* (CFA), dan diberikan booster 14 hari kemudian dengan menginjeksi secara intradermal pada kaki kanan kiri. Perubahan klinis yang terjadi pada tikus putih tersebut disebut dengan Ajuvant Induced Arthritis (AIA atau Arthritis ajuvant/AA) berupa kemerahan dan pembengkakan sendi tikus. Jaringan sendi *Proximal Interphalangeal* diperiksa setelah periode waktu yang ditentukan sebagai fase aktif, yaitu 3 minggu.

4.3.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dari penelitian ini yaitu :

1. Variabel bebas:

- Stresor dingin (dimasukkan pada suhu 5⁰C selama 15 menit setiap hari selama 7 hari berturut-turut).
- Ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*).

2. Variabel tergantung:

- Aktivitas enzim protease dan gambaran histopatologi sendi (*Proximal Interphalangeal*).

3. Variabel kendali:

- Umur, berat badan tikus, jenis kelamin, pakan, kondisi lingkungan.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Persiapan Hewan Model

Hewan model dibagi dalam lima kelompok perlakuan secara acak. Hewan model diadaptasikan dalam kandang kelompok selama tujuh hari sebelum perlakuan (Lina, dkk., 2003). Hewan model diberi ransum pakan basal dengan komposisi disusun berdasarkan standar *Association of Analytical Communities* (AOAC) (2005) yang mengandung karbohidrat, protein 10%, lemak 3%, vitamin, dan air 12%. Tikus yang digunakan adalah jenis tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Wistar* jantan dengan berat 150-200 gram dan berumur 10 minggu. Jumlah keseluruhan yang digunakan 20 ekor dan dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan masing-masing 5 ekor tikus. Kebutuhan pakan bagi seekor tikus setiap harinya kurang lebih sebanyak 10% dari bobot tubuhnya jika pakan tersebut berupa pakan kering dan dapat ditingkatkan sampai 15% dari bobot tubuhnya jika pakan yang dikonsumsi berupa pakan basah. Kebutuhan minum seekor tikus setiap hari kira-kira 15-30 mL air. Jumlah ini dapat berkurang jika pakan yang dikonsumsi sudah banyak mengandung air. Tiap hari seekor tikus dewasa makan antara 12 g sampai

20 g makanan. Tikus strain *wistar* memerlukan asupan makanan sebanyak 5 gram/100 gram berat badan dan konsumsi cairan 8-11 mL/gram berat badan dalam 24 jam (Malole dan Pramono, 1989).

Tikus dikandangkan dalam kandang yang berukuran 50 x 40 x 20 cm dengan jumlah sesuai dengan jumlah tikus yang digunakan. Kandang terbuat dari plastik dengan tutup dari rangka kawat. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap serta polutan lainnya. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24⁰C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

4.4.2 Prosedur Induksi Arthritis Adjuvan Menggunakan Complete Freund's Adjuvan (CFA)

Hewan coba yang akan diinduksi disiapkan, kemudian dilakukan injeksi secara *intradermal* pada pangkal ekor tikus 0,1 mL *Complete Freund's Adjuvan* (CFA) dengan konsentrasi *mycobacterium tuberculosis* 1- mg/ mL. Setelah 14 hari diberikan *booster* 0,1 mL CFA secara *intradermal* pada kaki kanan dan kiri. Setelah 7 hari akan timbul gejala arthritis adjuvan berupa pembengkakan, kemerahan dan nyeri pada sendi *Proximal Interphalangeal* kaki tikus (*Rattus norvegicus*) arthritis ini disebut *Adjuvan-Induced Arthritis* (AIA) telah dipakai secara luas sebagai model dari arthritis reumatoid (AR) (Prabowo, 2004).

4.4.3 Prosedur Pemberian Stresor Dingin

Hewan coba dalam kandang dimasukkan ke dalam *cold chamber*, selanjutnya di atur pada suhu 5⁰C selama 15 menit (Prabowo, 2005). Perlakuan ini terus diberikan selama 7 hari.

4.4.4 Pembuatan Ekstrak Etanol Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum bory*)

Ekstrak etanol rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*) dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Menggunakan pelarut etanol diharapkan zat aktif flavonoid sebagai antioksidan yang terkandung dalam rumput laut coklat dapat larut ke dalam ekstrak.

Proses pembuatan ekstrak etanol dari rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*) yaitu sebagai berikut: rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*) dibersihkan dan dipotong kecil – kecil dan dikeringkan sampai kandungan airnya mencapai 20-30%. Rumput laut coklat ditimbang sebanyak 116 gram dan diekstrak secara maserasi dengan 1,5 etanol 96%. Maserasi dilakukan selama 2 hari. Ekstrak kemudian disaring konsentrat filtrat dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40⁰C (± 2 jam). Ekstrak menjadi pekat dan kemudian dicuci dengan 100 mL cloroform sebanyak 3 kali dan *the upper layer (nun-lipid fraction)*. Fraksi etanol diambil dan dikeringkan dengan gas N₂ menjadi ekstrak dengan berat konstan. Setelah dibuat ekstrak etanol selanjutnya diuji fotokimia ini untuk menentukan senyawa marker yang ada dalam rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*).

4.4.5 Pemberian Terapi Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum bory*)

Pemberian ekstrak etanol rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*) dilakukan dengan menggunakan cara per oral di sonde pada bagian organ lambung. Ekstrak diberikan selama 1 minggu setelah induksi CFA terakhir. Sonde pada organ lambung yang digunakan adalah spuit sonde ukuran 3 mL. Ekstrak rumput

laut coklat yang sudah disiapkan dimasukkan ke dalam spuit sonde ukuran 3 mL. Kemudian ekstrak etanol rumput laut coklat diberikan pada hewan coba sebanyak yang sebelumnya dilakukan pengenceran menggunakan aquades dan minyak jagung. Selanjutnya diberikan 1 mL per ekor tikus dengan dosis yang sudah ditentukan. Aquades digunakan untuk melarutkan senyawa - senyawa polar dan sebagai pengencer (Supriyanto ahyudi,2009).

4.4.6 Prosedur Pengambilan Jaringan Sinovial

Langkah awal yang dilakukan untuk pengambilan jaringan sinovial yaitu dislokasi leher tikus, kemudian diletakkan di atas meja bedah dengan posisi terlentang atau rebah dorsal dan keempat kaki anggota gerak difiksasi, kemudian dilakukan pembedahan pada sendi lutut hewan coba dan langsung dimasukkan ke dalam PFA dan diberi label. Sampel diperiksa dengan metode Hematoksin Eosin (HE) (Dabbs, 2014).

4.4.7 Pembuatan Preparat Hitopatologi dengan metode HE

Pembuatan preparat meliputi tahap dehidrasi dan infiltrasi, penjernihan (*Clearing*), infiltrasi parafin, dan penanaman jaringan (*Embedding*) serta *sectioning*. Dehidrasi dimaksudkan untuk mengeluarkan air dari dalam jaringan dengan menggunakan larutan etanol secara bertingkat dari konsentrasi 80% sampai dengan absolut berkisar antara 10 menit hingga 30 menit. Proses dehidrasi berjalan dalam kondisi teragitasi dan pada suhu 4°C.

Proses infiltrasi menggunakan perbandingan larutan etanol absolute dan *propylene oxide* secara bertingkat hingga hanya menggunakan larutan *propylene* murni. Infiltrasi dilakukan dalam kondisi teragitasi dan pada suhu ruang selama 30 menit untuk setiap tahapannya.

Penjernihan (*clearing*) bertujuan menggantikan tempat etanol dalam jaringan. Reagen yang dipergunakan adalah xylol. Jaringan dipindahkan dari alkohol absolut III ke larutan penjernih (xylol). Penjernihan dilakukan dalam xylol I (1 jam), xylol II (1 jam), dan xylol III (30 menit pada suhu kamar dan 30 menit pada inkubator).

Embedding dilakukan dengan cetakan yang di dalamnya diisi parafin cair. Blok parafin yang sudah membeku tersebut dipasang pada mikrotom dan diatur agar posisinya sejajar dengan posisi pisau. Blok parafin dipotong dengan ketebalan 4 μ m. Pada awal pemotongan dilakukan trimming karena jaringan yang terpotong masih belum sempurna.

Sediaan disimpan pada inkubator dengan suhu 37°C selama semalam. Pewarnaan Hematoksilin – Eosin dilakukan dengan menggunakan zat pewarna hematoksilin untuk memberi warna biru ungu pada inti sel (basofilik) serta eosin yang merupakan *counterstaining* hematoksilin, digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung dan memberikan warna merah muda (Dabbs, 2014).

4.4.8 Isolasi Protease dan Uji Aktivitas Enzim Protease

Homogenat dari serum darah di masukan ke dalam tabung propilen steril ditambah dengan larutan PBS-Tween : PSMF (9:1) sebanyak 2 mL kemudian

dipindahkan ke dalam tabung polipropilen yang telah disterilisasi dengan *autoclave*. Kemudian dihomogenkan dengan alat getar vorteks selama 10 menit, disonikasi dengan sonikator selama 10 menit dan disentrifugasi selama 15 menit (6000 rpm). Selanjutnya supernatan diambil dan ditambah etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama semalam hingga terbentuk endapan. Setelah itu disentrifugasi selama 15 menit (10.000 rpm), diambil endapannya dan dikeringkan sampai bau etanol hilang. Kemudian endapan ditambah dengan larutan 0,02 M Tris-HCl pH 6,8 dingin dengan perbandingan volume 1:1 (Aulanni'am, 2004).

4.5 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil pengukuran kadar enzim protease dan hasil gambaran histopatologi jaringan sendi yang dianalisis secara deskriptif pada sampel akan dianalisis dengan uji One Way Analysis of Variant (ANOVA) dan dilakukan analisis lebih lanjut dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) / Tukey Test (alpha 0.05 %) dengan kepercayaan 95 % (Douglas, 2011).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Terapi Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum bory*) terhadap Aktifitas Enzim Protease Tikus (*Rattus Norvegicus*) Arthritis Ajuvan Terpapar Stresor Dingin

Pada penelitian ini dilakukan induksi CFA pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan untuk mendapatkan hewan model arthritis ajuvan dan diberi paparan stresor dingin kemudian diterapi dengan rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*). Pada penelitian ini dilakukan pengukuran aktivitas enzim protease pada serum darah tikus, didapatkan dengan pengukuran nilai absorbansi yang dilakukan menggunakan spektrofotometer sehingga diperoleh aktivitas enzim protease. Protease merupakan proteolitik enzim yang dapat menghidrolisis ikatan peptida pada protein dan berperan pada respon inflamasi. Unit aktivitas protease dari serum darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) didefinisikan sebagai banyaknya unit tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis ikatan peptida pada protein oleh protease pada kondisi optimum yaitu pH 7 suhu 37°C dan waktu inkubasi 60 menit. Hasil pengukuran aktivitas protease pada serum darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) model arthritis ajuvan yang telah diterapi menggunakan rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*) ditampilkan pada **Tabel 5.1**

Tabel 5.1. Aktivitas protease serum darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) model artritis ajuvan terpapar stresor dingin yang diterapi dengan ekstrak rumput laut coklat

Kelompok	Rata-rata Aktivitas Protease ($\mu\text{mol/ml.menit}$)	Peningkatan Aktivitas Protease (%)	Penurunan Aktivitas Protease (%)
P1 Kontrol Negatif	$0,0914 \pm 0,0096^a$	-	-
P2 Kontrol Positif	$0,1958 \pm 0,0097^c$	111,11	-
P3 Artritis + Stresor	$0,3088 \pm 0,0192^d$	244,44	-
P4 Artritis +Stresor dingin + Terapi	$0,1386 \pm 0,0092^b$	-	54,84

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

Hasil analisa secara statistik *One Way Analysis of Variant* (ANOVA) menggunakan *software SPSS.16* menunjukkan bahwa pemberian ekstrak rumput laut coklat secara signifikan mampu menurunkan aktivitas protease pada hewan menggunakan *Tukey/Beda Nyata Jujur* (BNJ) menunjukkan aktivitas protease berbeda signifikan ($p < 0,05$) antar perlakuan. Pada kelompok kontrol negatif ($0,0914 \pm 0,0096 \mu\text{mol/mL.menit}$) digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya peningkatan atau penurunan yang terjadi karena pengaruh perlakuan. Aktivitas protease merupakan indikator terdapatnya radikal bebas yang disebabkan oleh keluarnya enzim protease. Secara normal, radikal bebas yang diproduksi oleh tubuh yakni dalam jumlah kecil sebagai akibat dari proses metabolisme yang ada di dalam tubuh.

Pada kelompok kontrol positif ($0,1958 \pm 0,0097^c$) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap kontrol negatif yang ditandai dengan peningkatan aktivitas protease sebesar 111,11% dikarenakan tikus mengalami AR akibat induksi dari *Complete freund's adjuvant* (CFA) yang merupakan suatu emulsi

minyak yang mengandung *Mycobacterium butyricum*. Induksi CFA tersebut dapat menimbulkan respon inflamasi yang mampu merusak sel maupun jaringan seperti hiperplasia pada membran sinovial, sehingga dapat terjadi AR. Proses terjadinya kondisi AR dikarenakan CFA yang terdapat dalam tubuh menjadi antigen yang menyebabkan sistem imun terganggu (Holm, 2000). Induksi CFA tersebut dapat mengakibatkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) atau radikal bebas yang berlebihan yaitu jumlah radikal bebas yang diproduksi melebihi kapasitas tubuh untuk menangkalnya (Novo and Parola, 2008). Seiringnya peningkatan aktivitas enzim protease maka akan menyebabkan peningkatan produksi ROS.

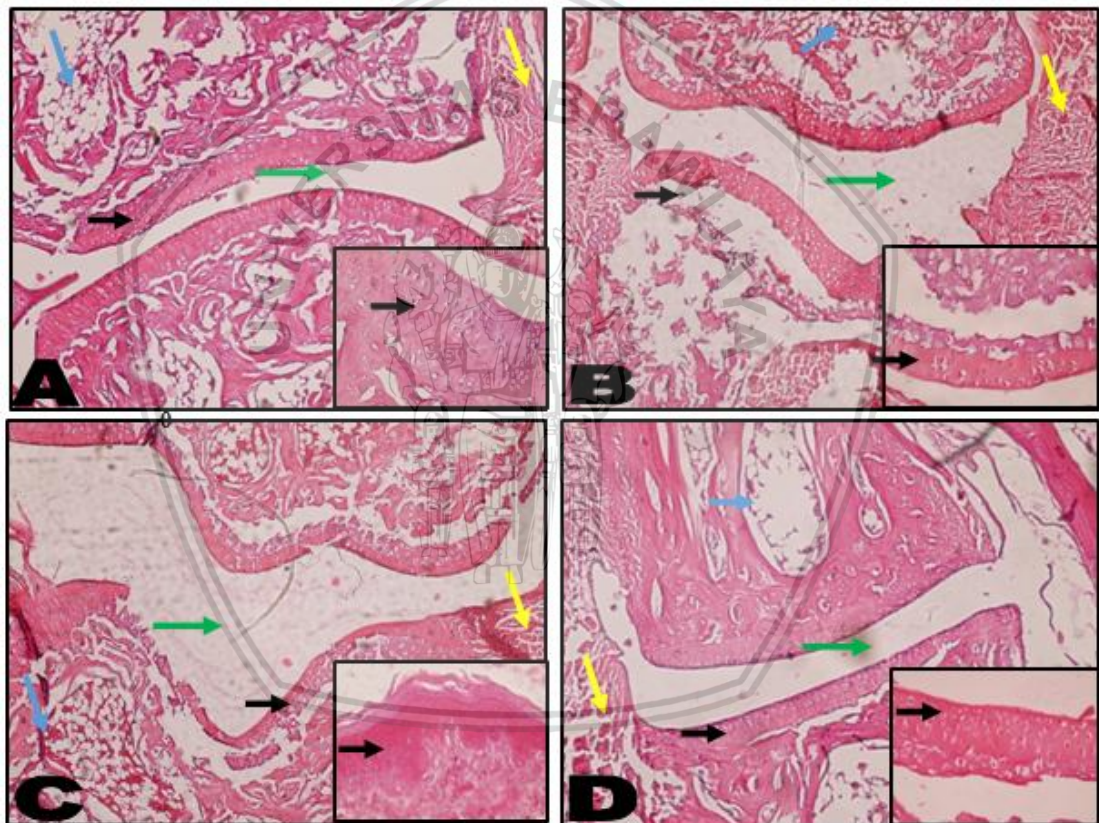
Aktivitas enzim protease tikus kelompok P3 yaitu diberi paparan stresor dingin tikus arthritis ajuvan yang menunjukkan peningkatan sebesar 244,44%. Aktivitas protease yang semakin tinggi pada tikus kelompok P3 menunjukkan tingkat keparahan inflamasi, semakin tinggi aktivitas protease maka semakin parah keadaan inflamasi pada jaringan. Menurut Lowell and Spiegelman (2000), paparan suhu dingin mampu menyebabkan hipotalamus bekerja mengatur panas dalam tubuh dengan mengaktifkan *Uncoupling Protein* (UCP). *Uncoupling Protein* (UCP) adalah protein yang berperan pada suhu dingin yang mengakibatkan termogenesis. Termogenesis akan meningkatkan siklus fosforilasi oksidatif (proses pembentukan energi) pada mitokondria. Mitokondria berperan dalam proses termogenesis. Selain menghasilkan energi, mitokondria juga penghasil utama salah satu bentuk radikal bebas yaitu *Reactive Oxygen Species* (ROS). Adanya interaksi antara elektron yang tidak berpasangan dengan oksigen (O^2), menghasilkan radikal superoksida yang merupakan salah satu ROS yang

sangat reaktif dan bereaksi dengan DNA, protein, dan lipid dengan cepat sehingga menimbulkan kerusakan oksidatif (Robbins and Zhao, 2011).

Terapi ekstrak rumput laut coklat dengan dosis 400 mg/kgBB dapat menurunkan aktivitas protease sebesar 54,84%. Hal ini diyakini bahwa dalam kandungan senyawa bioaktif yang terdapat pada ekstrak rumput laut coklat adalah flavonoid yang bertindak sebagai antioksidan dan anti inflamasi yang berperan dengan meredam radikal bebas. Flavonoid dapat meredam radikal bebas sehingga kondisi stress oksidatif dapat diturunkan. Berkurangnya stress oksidatif dalam tubuh dapat menghambat produksi sitokin proinflamasi sehingga produksi neutrofil ditekan dan menyebabkan produksi neutrofil menurun. Produksi neutrofil yang menurun maka akan diikuti dengan menurunnya pelepasan enzim protease. Pada kondisi inflamasi, aktivasi sel-sel inflamasi akibat induksi CFA dapat memicu terjadinya reaksi fagositosis oleh makrofag dan neutrofil. Mekanisme fagositosis membutuhkan enzim oksidase dan enzim protease untuk menghancurkan antigen (Wang and Ohura, 2002). Sehingga, apabila kondisi stress oksidatif berkurang maka aktivasi sel-sel inflamasi berkurang.

5.2 Pengaruh Terapi Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum Duplicatum Bory*) terhadap Gambaran Histopatologi Jaringan Sendi Tikus (*Rattus Norvegicus*) Arthritis Ajuvan terpapar Stresor Dingin

Pengamatan terhadap gambaran histopatologi merupakan salah satu parameter penentu keberhasilan untuk mengetahui tingkat kerusakan yang terjadi pada tikus yang diinduksi CFA sebagai hewan model arthritis ajuvan, serta untuk melihat hasil pemberian terapi ekstrak rumput laut coklat dengan dosis 400 mg/kgBB yang disajikan pada **Gambar 5.2**.



Gambar 5.1 Gambar Histopatologi Jaringan Sendi Proximal Interphalangeal

Keterangan: Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* dengan perbesaran 100x dan 400x. Gambar A (tikus kontrol negatif), Gambar B (tikus kontrol positif), Gambar C (tikus arthritis+stresor dingin) Gambar D (tikus arthritis ajuvan+stresor dingin+ terapi)

- : Membran sinovial
- : Rongga sendi
- : Kartilago
- : Sumsum tulang

Gambar 5.1 (A) merupakan gambaran histopatologi dengan pewarnaan Hematoxyline eosin pada tikus normal (*rattus norvegicus*). Gambar 5.1 (A) memperlihatkan bentuk normal membran synovial yang teratur dimana membran sinovial normal merupakan lapisan tipis sel-sel sinovial yang mendasari jaringan ikat longgar, bentuk kartilago dan bentuk sumsum tulang yang normal dengan matriks yang teratur dan rongga sendi yang simetris. Tikus artritis adjuvan pada Gambar 5.1 (B) memperlihatkan perubahan gambaran histopatologi bentuk membran sinovial dan berproliferasi ke rongga sendi, kerusakan struktural kartilago yang menyebabkan erosi dan dilatasi rongga sendi yang menunjukkan terjadinya edema.

Menurut Gemeinehardt (2012) jaringan yang mengalami edema terlihat sebagai ruangan yang meluas (dilatasi) dan terisi cairan, adanya infiltrasi sel leukosit dan sel-sel inflamasi berupa sel-sel mononuklear dan neutrofil. Kerusakan jaringan sendi *Proximal interphalangeal* pada Gambar 5.1 (B) tersebut terjadi karena induksi CFA menyebabkan respon inflamasi yang ditandai hiperplasia membran sinovial. Membran synovial tersebut mengalami peningkatan yang mengfagosit enzim-enzim didalamnya sampai terpecah-pecah termasuk enzim protease. Enzim protease yang terpecah mengalami peningkatan sehingga terjadi edema dan proliferasi yang dapat menimbulkan kerusakan jaringan sendi.

Pemberian paparan stresor dingin mengakibatkan terjadinya produksi ROS yang mampu meningkatkan inflamasi atau radang dari suatu penyakit (Lowell and Spiegelman, 2000). Peningkatan produksi ROS menyebabkan peningkatan

interleukin pada jaringan sendi *metatarsophalangeal* diikuti dengan kerusakan oksidatif. ROS menyebabkan proses peradangan atau inflamasi AR semakin parah pada artritis ajuvan yang terpapar stresor dingin pada gambar 5.1 (C). Tikus RA dengan perlakuan paparan *stressor* dingin Gambar 5.1 (C) memperlihatkan perubahan bentuk membran synovial yang tidak teratur (semakin hancur), destruksi kartilago yang semakin parah dan batas antara kartilago dan sumsum tulang tampak terlihat mengalami degradasi pada strukturnya serta adanya dilatasi rongga sendi yang menunjukkan edema berupa peningkatan infiltrasi sel-sel leukosit dibandingkan dengan rongga sendi kelompok tikus pada gambar B. Peningkatan kerusakan sendi akibat ROS dapat menyebabkan stres oksidatif sehingga proses peradangan inflamasi seperti kartilago mengalami peningkatan destruksi struktural (Valko *et al.*, 2006).

Gambar 5.1 (D) menunjukkan perbaikan gambaran histopatologi jaringan sendi yang ditunjukkan dengan bentuk membran sinovial dan terbentuk keteraturan matriks, perbaikan bentuk kartilago yang ditunjukkan dengan susunan sel kondrositnya mengalami keteraturan lapisan kartilago pada bagian superfisial, dimana kondisi bentuk dan ukuran sel kondrosit yang mengalami hipertrofi mendekati kelompok A. Pemberian terapi ekstrak rumput laut coklat yang mengandung antioksidan dari senyawa polifenol mampu memperbaiki dari gambaran histopatologi kartilago jaringan sendi tikus artritis ajuvan. Menurut Janero (2001), senyawa-senyawa antioksidan dapat mencegah teroksidasinya asam lemak tidak jenuh agar tidak membentuk lipid peroksida dan mencegah berlangsungnya reaksi berantai senyawa radikal. Peran antioksidan dalam

mencegah berlangsungnya proses radikal bebas misalnya peran flavonoid yang dapat melindungi terjadinya oksidasi. Menurut De-jian-jian (2004), kandungan flurotanin ekstrak etanol rumput laut coklat sebagai anti inflamasi 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 kartilago dengan baik sehingga mampu memperbaiki struktur jaringan kartilago pada artritis ajuvan.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Terapi ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*) dengan dosis 400 mg/kg BB dapat menurunkan aktivitas enzim protease sebesar 54,84% tikus (*Rattus norvegicus*) artritis ajuvan yang terpapar stresor dingin.
2. Terapi ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*) dengan dosis 400 mg/kg BB dapat memperbaiki gambaran histopatologi sendi *proximal interphalangeal* tikus (*Rattus norvegicus*) artritis ajuvan yang terpapar stresor dingin dengan adanya perbaikan struktural dari jaringan sendi dan kartilago.

6.2 Saran

Diharapkan agar dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efektifitas pemberian dosis terapi ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum bory*).

DAFTAR PUSTAKA

- Atmadja, W.S. 1996. *Rumput Laut Sebagai Obat*. Jurnal Oseana, 17: 1-8
- Aulanni'am., A. Roosdiana, and N.L. Rahmah. 2012. The Potency of Sargassum duplicatum Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy in Rattus norvegicus. Journal of Life Sciences 6: 144-154.
- Boyer, H. W., and B.C., Carlton, 1971, Production of Two Proteolytic Enzymes by A Transformable Strain of Bacillus subtilis, Arch. Biochem. Biophys, 128:442-455
- Brooke MP. *Rheumatology*. Med J Australia. 1994; 160:374-377A
- Dabbs, D. J. 2014. Diagnostic Immunohistochemistry Theranostic and Genomic Application, United State of America, Sounders, An Imprint of Elsevier Inc.
- Darmawan J, KD Muirden, Valkenburg, and RD Wigley. *The epidemiology of rheumatoid arthritis in Indonesia*. Rheumatology. 1993;32(7):537-40.
- De-jian-jian. 2004. Pharmacological Effect of Tanin Drug. Journal Kedokteran Hewan 8(4): 257-263.
- Douglas, J. (2011) Young People's Reading and Writing An indepth study focusing on enjoyment, behaviour, attitudes and attainment National Literacy Trust
- Gemeinhardt. 2012. Near Infrared Fluorescence Imaging of Experimentally Complement Induced Arthritis in Rats Using the Comparison Magnetic Resonance Imaging, Histology, and Clinical Score. Journal Biomed. Opt. 17(10): 106008.
- Greeberg,j.s.,2004. *Comprehensive stress management*.8th id. New york
- Gupta, R., Beg, Q.K., dan Lorenz, P.2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial application. Appl Microbiol Biotechnol. 59:15-32.
- Guyton, A.C., dan Hall, J.E. 2008. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi 11. Jakarta: EGC
- Holm, B, L. Svelander, J.C. Lorentzen, and A. Buchtt. 2000. Pathogenetic Studies Adjuvant Induced Arthritis. Scand Journal Immunology 54:599-605.
- Indriyani, 2010, *Pengaruh pH dan Suhu terhadap Aktivitas Protease dari Bakteri Isolat HMT-3*, Skripsi S 1, UNHAS, Makassar.
- Janero, D.R. 2001. Malondialdehyde and Thiobarbarturic Acid Activity as Diagnosis Indices of Lipid Peroxidation and Peroxidative Tissues Injury. Free Radical Biology & Medicine 9: 515-40.
- Jhamandas, JH, MB Wie, K Harris , Mac Tavish, and S Kar. 2005. *Fucoidan inhibits cellular and neurotoxic effects of beta amyloid (A beta) in rat cholinergic basal forebrain neuron*.Eur J Neurosci. 21 (10) : 2649 – 2659.



- Kusriningrum, 2008. *Perancangan Percobaan*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Lina, H.S., S. Listyawati, dan Sutarno. 2003. *Analisis Kimia-Fisik Urin Tikus Putih (Rattus norvegicus) Setelah Pemberian Ekstrak Daun Seledri (Apium graveolens linn.)*. Biosmart 5 (1): 43-46.
- Lowell, B. B., and Spiegelman, B.M. 2000. Toward a Molecular Understanding of Adaptive Thermogenesis. *Nature* 404 : 652-660.
- Malole, M. B. M., dan C. S. U. Pramono. 1989. *Penggunaan Hewan-hewan Percobaan di Laboratorium Bogor*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas, Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Novo, E., and Parola, M. 2008. Redox Mechanisms in Hepatic Chronic Wound Healing and Fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 1 (1), 5.
- O'Dell J.R. *Anticytokine therapy a new era in the treatment of rheumatoid arthritis*. *New Engl J. Med.* 1999. 340: 310-312
- Poliana J and AP. MacCabe. 2007. *Industrial Enzymes; Structure, Function, and Applications*. Dordrecht: Springer. Halaman:174. ISBN 978-1-4020-5376-4
- Prabowo S. 2005 *Pengaruh Stresor Dingin Terhadap Proses Keradangan Pada Arthritis Ajuvan: Penelitian Eksperimental Pada Arthritis Ajuvan (Model Hewan Untuk Arthritis Rematoid)*. Disertasi. UNAIR
- Rachmat, R. 1999. *Pemanfaatan Produk Alam Algae Laut untuk Obat dan Kosmetik*. Prosiding Pra Kipnas VII Forum Komunikasi I Ikatan Fikologi Indonesia (IFI).
- Robbins, D., and Zhao, Y. 2011. New Aspects of Mitochondrial Uncoupling Protein Ucp3 and Their Roles in Tumorigenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 5285-5293.
- Samee H, ZX Li, H Lin, J Khalid and YC Guo. 2009. *Antiallergic effects of ethanol extracts from brown seaweeds*. *Journal of Zhejiang University Science B*. 10(2):147-153.
- Schuna, A.A., in *Rheumatoid Arthritis*, 2008, *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*, Sixth Edition, 1671-1683, McGraw Hill, Medical Publishing Division, New York.
- Smeltzer and Bare. (2002). *Buku Ajar Keperawatan Medikal Bedah* Brunner & Suddarth (Ed 8). Jakarta: EGC
- Tehlirian. *Rheumatoid Arthritis*. In: Klippel J. *Primer on the Rheumatic Diseases*. 13th Edition. Springer. New York. 2008
- Valko, M. 2006. Free Radical, Metal and Antioxidant in Oxidative Stress Induced Cancer. *Journal Chem-BioI, Rusia*, edisi 160, p. 1-40.

- Wang and Ohura. 2002. Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide Signaling in Gingival Fibroblasts CD14 and Tolllike Receptor. Journal Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 13 : 132
- Wiralis dan E Purwaningsih. 2009. *Pengaruh Pemberian Jus Jambu Biji (Psidium Guajava L) Terhadap Volume Kaki dan Kadar Ion Nitrit Adjuvant Induced Arthritis Tikus Wistar*. Artikel Asl: M Med Indones, Volume 43, Nomor 4, halaman 188-196
- Yunizal. 2003. *Minuman sari rumput laut coklat alginat*. Dalam: Utomo, B.S.B.,J. Basmal, Yunizal, Mulyasari, R. Peranganing, T.D. Suryaningrum, Murdinah, dan S. Koeshendradjana. *Teknologi Pemanfaatan Rumput Laut. Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan*. Jakarta. Lim SN, Cheung PC, Ooi VE, and Ang PO. 2002. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, Sargassum siliquastrum. J Agric Food Chem. 50 (13) : 3862-3866

