

**PENGARUH TERAPI EKSTRAK RUMPUT LAUT COKLAT  
(*Sargassum duplicatum bory*) TERHADAP GAMBARAN  
PROFIL PITA PROTEIN DAN HISTOPATOLOGI  
JARINGAN SENDI TIKUS (*Rattus novergicus*)  
ARTRITIS TERPAPAR STRESOR DINGIN**

**SKRIPSI**

Oleh :

**DEDY GITA PERMADI**

**115130107111027**



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

**PENGARUH TERAPI EKSTRAK RUMPUT LAUT COKLAT  
(*Sargassum duplicatum Bory*) TERHADAP GAMBARAN  
PROFIL PITA PROTEIN DAN HISTOPATOLOGI  
JARINGAN SENDI TIKUS (*Rattus norvegicus*)  
ARTRITIS TERPAPAR STRESOR DINGIN**

**SKRIPSI**

Oleh :

**DEDY GITA PERMADI**

**115130107111027**



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



LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH TERAPI EKSTRAK RUMPUT LAUT COKLAT (*Sargassum duplicatum* Bory) TERHADAP GAMBARAN PROFIL PITA PROTEIN DAN HISTOPATOLOGI JARINGAN SENDI TIKUS (*Rattus novergicus*) ARTRITIS TERPAPAR STRESOR DINGIN**

oleh :

**DEDY GITA PERMADI**

115130107111027

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
Pada tanggal 7 Agustus 2018  
Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

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

drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech  
NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya



Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES  
NIP. 19600903 1898802 2 001



## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Dedy Gita Permadi  
Nim : 115130107111027  
Program Studi : Kedokteran Hewan  
Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Terapi Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) Terhadap Gambaran *Profil pta protein* Dan Histopatologi Jaringan Sendi Tikus (*Rattus novergicus*) Artritis 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 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,

Yang menyatakan,



(Dedy Gita Permadi)  
NIM. 115130107111027

**PENGARUH TERAPI EKSTRAK RUMPUT LAUT COKLAT (*Sargassum duplicatum Bory*) TERHADAP GAMBARAN PROFIL PITA PROTEIN DAN HISTOPATOLOGI JARINGAN SENDI TIKUS (*Rattus novergicus*) ARTRITIS TERPAPAR STRESOR DINGIN**

**Abstrak**

Artritis Reumatoid merupakan salah satu jenis penyakit autoimun yang menyerang bagian sendi yang bersifat inflamasi kronik. Artritis Reumatoid menyebabkan hipertropi dan penebalan membran sinovium, hambatan aliran darah dan nekrosis sel. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui kadar Profil Pita Protein dan gambaran histopatologi sendi pada tikus artritis terpapar stresor dingin yang telah diterapi dengan ekstrak rumput laut coklat. Penelitian ini menggunakan 4 kelompok hewan coba yaitu: kelompok kontrol negatif (P1), kelompok artritis (P2), kelompok artritis yang terpapar stresor dingin (P3), serta kelompok artritis yang terpapar stresor dingin dan diberi terapi ekstrak rumput laut coklat dengan dosis 400 mg/kg (P4). Pembuatan tikus model AR dilakukan dengan cara injeksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) secara intradermal pada pangkal ekor sebanyak 0,1 ml per ekor pada hari ke 8 dan pada kaki kanan dan kiri sebanyak 0,05 ml per ekor pada hari ke 22. Terapi ekstrak rumput laut coklat dengan dosis 400 mg/kg BB dilakukan selama 1 minggu setelah 1 minggu injeksi *booster* dan sudah dipapar stresor dingin. Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah kadar Profil pita protein dan histopatologi jaringan sendi. Pengukuran kadar Profil pita protein dilakukan dengan uji SDS PAGE dan dianalisa secara semi kuantitatif dengan menghitung berat molekul pada pita protein yang muncul. Histopatologi jaringan sendi diamati secara kualitatif menggunakan mikroskop dengan perbesaran obyektif 100x. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak rumput laut coklat mampu memperbaiki profil protein yang ditandai dengan tidak terekspresinya protein dengan berat molekul 72 KDa yang merupakan *High Heat Shock Protein* (HHSP). Hasil pengamatan melalui mikroskop menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak rumput laut coklat mampu memperbaiki gambaran histopatologi jaringan sendi yang terlihat adanya penurunan inflamasi, berkurang infiltrasi sel inflamasi dan terbentuk susunan sel kondrosit. Disimpulkan bahwa ekstrak rumput laut coklat dapat digunakan sebagai terapi artritis reumatoid.

**Kata kunci :** artritis rematoid, *complete freund adjuvant* (CFA), Pofil Pita Protein, rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum Bory*), stresor dingin.

**EFFECT OF BROWN SEAWEED EXTRACT THERAPY (*Sargassum duplicatum Bory*) AGAINST PROTEIN BAND PROFILE CONTENT AND HISTOPATHOLOGY RAT'S JOINTS OF RHEUMATOID ARTHRITIS MODEL WHICH EXPOSED BY COLD STRESSOR**

**Abstract**

Rheumatoid arthritis is one type of autoimmune disease that attacks the chronic inflammatory joints. Rheumatoid arthritis causes hypertrophy and thickening of the synovial membrane, blood flow barrier and cellular necrosis. The purpose of this study is to determine the level of Protein Ribbon Profile and histopathologic features of joints in arthritic rats exposed to cold stressors that have been treated with brown seaweed extract. This study used four groups of experimental animals: negative control group (P1), arthritis group (P2), arthritis group exposed to cold stressor (P3), and arthritis group exposed to cold stressors and treated with chocolate seaweed extract at 400 mg / kg (P4). The manufacture of AR model mice was performed by intradermal Inlet Complete Freund's Adjuvant (CFA) at the base of the tail as much as 0,1ml on day 8, and on the right and left legs of 0,05ml on day 22. Treatment of chocolate seaweed extract at a dose of 400 mg / kg BW was done for 1 week after 1 week of booster injection and had been exposed to cold stressors. The parameters observed in this study were protein profile profile and histopathology of joint tissue. Measurements of protein banding profiles were performed by SDS PAGE test and semi-quantitatively analyzed by calculating the molecular weight of the emerging protein bands. Histopathology of joint tissue was observed qualitatively using a microscope with an objective magnification of 100x. The results showed that the *Sargassum duplicatum Bory* extract were able to fix the protein profile, characterized by expressed protein with 72 KDa molecular weight which was *High Heat Shock Protein* (HHSP). The result showed that brown seaweed extract could decrease infiltration of inflammatory cell and increase compose of chondrocyte cell. The conclusion was *Sargassum duplicatum Bory* extract could be used as Rheumatoid arthritis therapy

**Keywords:** Rheumatoid Arthritis, Complete Freund Adjuvant (CFA), Protein Ribbon Pofil, brown seaweed (*Sargassum duplicatum Bory*), cold stresor.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga skripsi yang berjudul “ Pengaruh Terapi Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) Terhadap Kadar *Profil pita protein* Dan Gambaran Histopatologi Jaringan Sendi Tikus (*Rattus novergicus*) Arthritis Terpapar Stresor Dingin” ini dapat terselesaikan.

Pada penulisan ini penulis tidak lupa mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Dra. Herawati, MP. selaku dosen pembimbing pertama atas bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktunya yang selalu memberikan dukungan, kritik dan saran tiada henti dalam penulisan skripsi ini.
2. Drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech selaku dosen pembimbing kedua atas bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktunya dalam penulisan skripsi ini.
3. Drh. Wawid Purwatiningsih, M.Vet dan selaku dosen penguji ke satu atas bimbingan, kritik, saran, kesabaran, dan waktu yang diberikan.
4. Drh. Ahmad Fauzi, M.sc selaku dosen penguji kedua atas bimbingan, kritik, saran, kesabaran, dan waktu yang diberikan.
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh, DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
6. Seluruh dosen yang telah membimbing dan memberikan ilmu selama menjalankan studi di Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
7. Seluruh Asisten Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA UB atas waktu, perizinan, fasilitas, dan bantuan yang diberikan kepada penulis, sehingga penelitian dapat berjalan dengan lancar.
8. Keluarga saya, Ayah, Ibu dan saudara tercinta yang senantiasa memberikan dorongan, semangat, dan doa yang tiada henti demi kelancaran dan keberhasilan.
9. Seluruh teman di 2011 C, teman-teman kelompok *Sargassumer* dan Mbak Vivi Shofia yang senantiasa atas saran, kritik, motivasi semangat, inspirasi, bantuan, kebersamaan dan semua hal yang sangat luar biasa.

10. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan karya tulis ini yang tidak sempat disebutkan.

Penulis sadar bahwa laporan ini jauh dari sempurna. Penulis berharap Skripsi ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca untuk itu saran yang membangun sangat penulis harapkan.



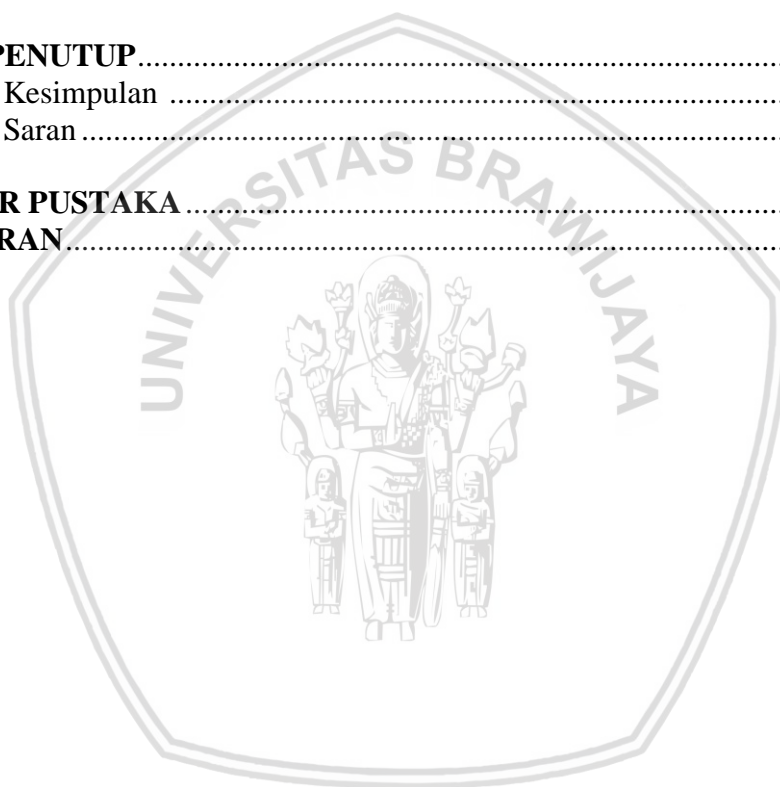


## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
Lembar Pengesahan .....	ii
Lembar Pernyataan.....	iii
Abstract .....	iv
Abstrak .....	v
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN</b> .....	xiii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan .....	4
1.5 Manfaat .....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1 Arthritis Reumatoid.....	6
2.2 Hewan Model Arthritis .....	9
2.3 Stresor Dingin .....	11
2.4 Profil Pita Protein.....	12
2.5 Rumput Laut Coklat ( <i>Sargassum duplicatum Bory</i> ).....	13
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS</b>	
<b>PENELITIAN</b> .....	18
3.1 Kerangka Konseptual .....	18
3.2 Hipotesis Penelitian.....	20
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b> .....	21
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	21
4.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	21
4.3 Tahapan Penelitian .....	23
4.4 Rancangan Penelitian .....	23
4.5 Variabel Penelitian .....	24
4.6 Prosedur Kerja.....	24
4.6.1 Persiapan Hewan Coba Tikus ( <i>Rattus novergicus</i> )	
.....	24
4.6.2 Pembagian Kelompok Penelitian.....	25
4.6.3 Prosedur Induksi Arthritis Ajuvan Menggunakan	
CFA .....	26



4.6.4 Pembuatan Ekstrak Rumput Laut Coklat .....	27
4.6.5 Penentuan Dosis Rumput Laut Coklat .....	27
4.6.6 Prosedur Stresor Dingin .....	28
4.6.7 Pengukuran Kadar Profil Pita Protein .....	28
4.6.8 Pembuatan Preparat Histopatologi .....	35
4.7 Analisis Data .....	38
<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>39</b>
5.1 Analisa Profil Protein .....	39
5.2 Histopatogi Jaringan Sendi <i>Metatarsophalangeal</i> Tikus Arthritis Rematoid Dengan Pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin (HE)</i> .....	44
<b>BAB 6 PENUTUP .....</b>	<b>47</b>
6.1. Kesimpulan .....	47
6.2. Saran .....	47
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>48</b>
<b>RAN</b> .....	<b>51</b>



## Daftar Tabel

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
4.1 Kelompok Penelitian .....	23



## Daftar Gambar

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
2.1 Mekanisme Inflamasi dalam Proses Arthritis Reumatoid.....	7
2.2 <i>Rattus Novergicus</i> .....	9
2.3 Rumput Laut Coklat ( <i>Sargassum duplicatum Bory</i> ) .....	14
3.1 Kerangka Konseptual .....	18



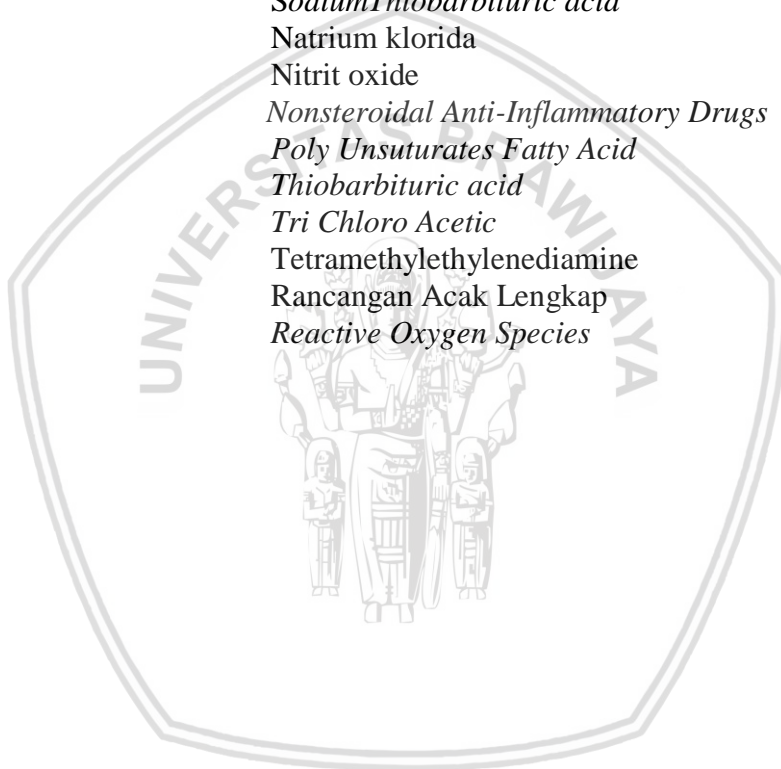
## Daftar Lampiran

<b>Lampiran</b>		<b>Halaman</b>
1	Skema Penelitian .....	35
2	Pembuatan dan Penentuan Dosis Ekstrak Rumput Laut Coklat.....	36
3	Pembuatan Kurva Baku Profil Pita Protein .....	38
4	Metode pembuatan preparat HE .....	40



## DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

AR	Artritis reumatoid
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrogen Peroksida
HCl	Asam klorida
HE	Hematoksin-Eosin
IL	Interleukin
LGB	Lower Gel Buffer
Na-Thio	<i>Sodium Thiobarbituric acid</i>
NaCl	Natrium klorida
NO	Nitrit oxide
NSAID	<i>Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs</i>
PUFA	<i>Poly Unsaturates Fatty Acid</i>
TBA	<i>Thiobarbituric acid</i>
TCA	<i>Tri Chloro Acetic</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamine
RAL	Rancangan Acak Lengkap
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Arthritis Rematoid adalah salah satu penyakit rematik pada sendi dengan inflamasi kronik yang progresif. Penyebabnya diduga akibat disregulasi sistem imun tubuh yang ditandai dengan keterlibatan persendian simetrik poliartikular, manifestasinya sistemik dengan prognosis jangka panjang buruk, karena sistem imun yang seharusnya secara normal melindungi tubuh terhadap infeksi dan berbagai penyakit, menyerang jaringan sendi dengan alasan yang tidak jelas (Schuna, 2005). Arthritis Rheumatoid merupakan penyakit autoimun yang menyebabkan inflamasi kronis pada sendi dan jaringan di sekitar sendi dengan adanya makrofag dan sel T (Greidinger, 2004). Secara patogenesis, penyakit ini dihubungkan dengan pembentukan radikal bebas yang menyebabkan terjadinya inflamasi (Valko *et al.*, 2006).

Gejala klinis sering muncul pada anjing atau kucing yang menderita arthritis rheumatoid seperti adanya kekakuan pada sendi, inflamasi sendi, *lameness*, perubahan cara berjalan, anorexia depresi, demam, proliferasi synovial, perluasan inflamasi pada pannus kedalam rongga sendi dan apabila terjadi secara berkelanjutan akan berakibat pad akerusakan artikular kartilago dan sendi (Bucht 2000). Prevalensi dan insiden penyakit di beberapa negara termasuk di Indonesia cukup tinggi 0,5-1% populasi pada orang dewasa. Di

Indonesia penduduk berusia di atas 40 tahun didapatkan prevalensi RA 0,5% di daerah kotamadya, 0,6% di daerah kabupaten (Sudoyo, 2006).

Sendi merupakan penghubung dua tulang bersamaan dan menjaga tulang tetap di tempat pada saat otot rileks atau berkontraksi pada saat bergerak bersamaan. Permukaan tulang dilapisi oleh tulang rawan untuk mencegah tulang saling bergesekan dan cairan synovial berfungsi sebagai pemelihara sendi serta tulang rawan yang diproduksi oleh sinovium atau membrane synovial (Sudoyo, 2006). Kerusakan sendi pada arthritis rheumatoid disebabkan oleh masuknya pannus kedalam tulang rawan artikular yang menyebabkan osteoporosis dan erosi tulang serta terjadinya pembengkakan dan kerusakan struktur penartikular. Perubahan morfologi yang terjadi seperti inflamasi, proliferasi dan apoptosis. hal ini akan menyebabkan perubahan profil protein akibat adanya protein seperti protein proinflamasi, protein terkait apoptosis.

Peningkatan suhu global mengakibatkan terjadinya perubahan iklim yang sangat ekstrim sehingga saat cuaca dingin suhu menjadi sangat dingin, begitu juga dengan penggunaan *air conditioner* diberbagai lokasi menjadi stresor dingin pada penderita Arthritis Rematoid. Menurut Prabowo (2004) stresor dingin pada arthritis ajuvan akan meningkatkan proses peradangan dengan terjadinya perubahan sintesis protein dan kerusakan jaringan sendi.



Sampai saat ini belum di temukan terapi yang efektif untuk arthritis rematoid (Mirshafiey et al.,2008). Pengobatan atau terapi arthritis remathoid pada umumnya menggunakan *Nonsteroidal Anti Inflammatory Drugs* (NSAID) yang memiliki efek samping menyebabkan pendarahan pada gastrointestinal, maka dari itu perlu alternative pengobatan melalui pemberian terapi herbal dannutrisi yang seimbang untuk menstimulasi system imun sebagai upaya meningkatkan kualitas hidup hewan (Messonniers, 2011).

Salah satu opsi terapi herbal yakni dengan memanfaatkan rumput laut atau alga karena karena Indonesia sebagai negara yang memiliki perairan luas yang ditumbuhi rumput laut atau alga yang meluas dan banyak. Menurut berbagai penelitian tentang rumput laut mengindikasikan bahwa bermacam kandungan bioaktif anti inflamasi dan anti oksidan ada pada tanaman ini. Penelitian yang dilakukan Aulanni'amet *al* (2012) menunjukkan bahwa rumput laut coklat (*Sargasum duplicatum Bory*) mampu meredam radikal bebas pada hewan yang menderita *inflammatory bowel disease*. Pada penelitian Ristyana (2013) *Sargassum duplicatum Bory* yang diekstrak dengan etanol memiliki kandungan senyawa total fenolik dan flafonoid tertinggi. Aktivitas anti oksidan yang terkandung dalam rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum*) adalah komponen polifenol (flafonoid dan phlorotanin) serta fukosantin (Jaswiret *al.*,2011).

## 1.2 Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang maka rumusan masalah dari penelitian ini yaitu:

1. Apakah pemberian *Sargassum duplicatum* Bory pada tikus penderita arthritis yang terpapar stresor dingin dapat memperbaiki gambaran profil pita protein?
2. Apakah pemberian *Sargassum duplicatum* Bory pada tikus penderita arthritis yang terpapar stresor dingin menurunkan skala kerusakan histopatologi sendi?

## 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 dan sudah mendapatkan sertifikasi layak etik penelitian oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya no: 326-KEP-UB.
2. Pembuatan keadaan arthritis reumatoid pada hewan model tikus arthritis dilakukan dengan cara induksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) sebanyak 0,1 ml per ekor dengan konsentrasi *mycobacterium tuberculosis* 1- mg/ mL dibagian pangkal ekor secara intradermal pada hari ke-1 dan diberikan booster 0,05 mL per ekor CFA kembali Setelah 14 hari secara intradermal pada kaki kanan dan kiri.(Prabowo, 2004).

3. Pemberian stresor dingin dilakukan dengan memasukkan tikus (*Rattus novergicus*) arthritis ajuvan ke dalam *cold chamber* yang diatur pada suhu 5<sup>0</sup> C selama 15 menit.
4. Varietas rumput laut yang digunakan untuk terapi yaitu rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum Bory*) yang diperoleh dari perairan laut Madura, Jawa Timur.
5. Dosis terapi *Sargassum duplicatum Bory* yang digunakan adalah 400 mg/kg BB.
6. Variabel yang diamati yaitu profil pita protein dilakukan dengan metode SDS PAGE dan dianalisis secara semi kuantitatif dengan menghitung berat molekul pita protein yang muncul perbaikan gambaran histopatologi jaringan sendi secara kualitatif menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX 51 dengan perbesaran lensa obyektif 4x, 10x, 40x dan 100x .

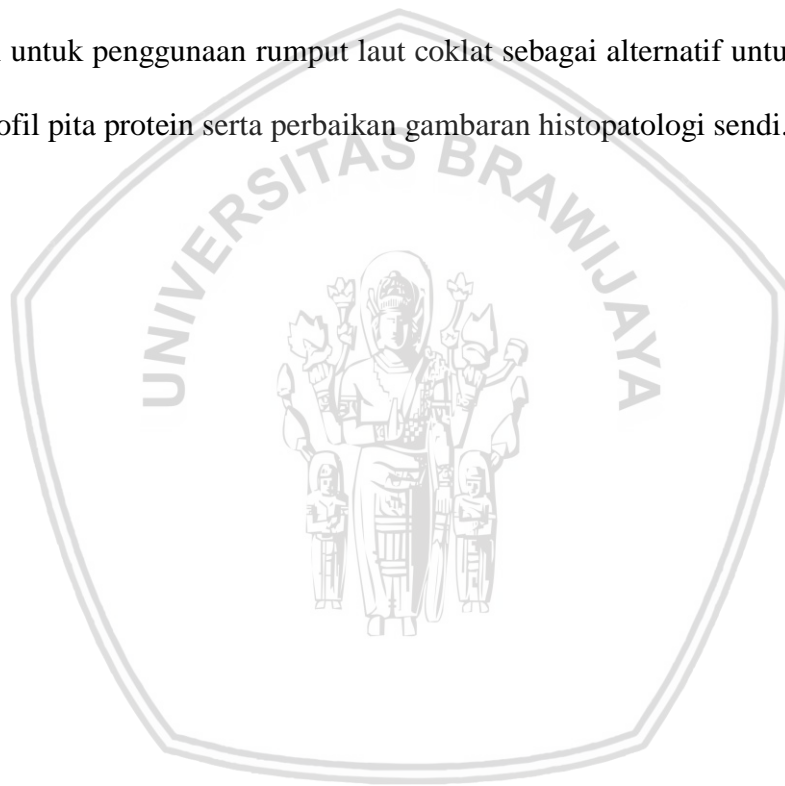
#### 1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui bahwa pengaruh terapi ekstrak *Sargassum duplicatum Bory* dapat memperbaiki gambaran profil pita protein pada tikus (*Rattus novergicus*) arthritis ajuvan yang terpapar stresor dingin.
2. Mengetahui bahwa pengaruh terapi ekstrak *Sargassum duplicatum Bory* dapat memperbaiki gambaran histopatologi jaringan sendi kaki tikus (*Rattus novergicus*) arthritis ajuvan yang terpapar stresor dingin.

## 1.5 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah diharapkan dapat mengetahui peran rumput laut coklat ( *Sargassum duplicatum* Bory ) terhadap kadar profil pita protein pada tikus ( *Rattus novergicus* ) artritis ajuvan yang terpapar stresor dingindan mengetahui gambaran histopatologi jaringan sendi kaki tikus ( *Rattus novergicus* ) artritis ajuvan tersebut. Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai bahan referensi untuk penggunaan rumput laut coklat sebagai alternatif untuk penurunan kadar profil pita protein serta perbaikan gambaran histopatologi sendi.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Rumput Laut Coklat

Rumput laut atau *seaweed* merupakan salah satu kelompok tumbuhan laut yang mempunyai sifat tidak dapat dibedakan antara bagian akar, batang, dan daun. Seluruh bagian tumbuhan disebut *thallus*, sehingga rumput laut tergolong tumbuhan tingkat rendah. Di Indonesia, rumput laut tumbuh di daerah perairan karang atau perairan pantai yang mempunyai paparan terumbu karang seperti Kepulauan Riau, Pulau Seribu, Karimun Jawa, Selat Sunda, dan pantai Jawa bagian Selatan. Berdasarkan kandungan pigmennya, 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) (Anggadiredja, 2006).

Menurut (Kadi, 2005) Klasifikasi Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum*), sebagai berikut :

Domain	: Eukaryota
Kingdom	: Chromista
Phylum	: Ochrophyta
Class	: Phaeophyceae
Order	: Fucales
Family	: Sargaceae
Genus	: <i>Sargassum</i>
Scientific name	: <i>Sargassum duplicatum</i>



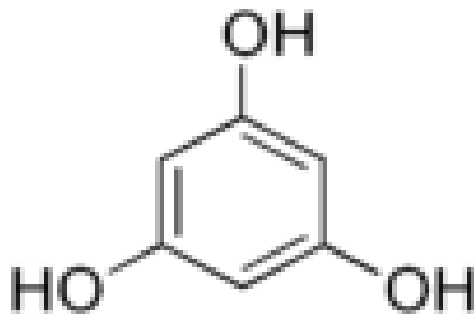
**Gambar 2.1** Rumput Laut Coklat (Anggadiredja, 2006)

### **2.1.1 Kandungan Kimia Rumput Laut Coklat**

Selain karbohidrat, protein, lemak dan serat, rumput laut juga mengandung enzim, asam nukleat, asam amino, vitamin (A, B, C, D, E dan K) dan juga kandungan kimia yang terdapat dalam rumput laut coklat ini yaitu sumber alginat, protein, vitamin C, tannin, iodium, fenol sebagai obat gondok, anti bakteri dan tumor. Rumput laut coklat ini mempunyai kandungan antioksidan dari golongan polifenol (flavonoid dan flurotanin) yang berfungsi sebagai penangkal radikal bebas. Sargassum ini juga mengandung senyawa aktif yaitu steroida, alkaloida dan fenol (Winarsi, 2007).

### **2.1.2 Flavonoid**

Polifenol rumput laut dikenal sebagai flurotanin, memiliki sifat yang khas dibandingkan dengan polifenol yang ada pada tumbuhan darat. Polifenol dari tumbuhan darat berasal dari asam galat, sedangkan polifenol rumput laut berasal dari fluroglusinol (1,3,5-trihydroxybenzine). Kandungan tertinggi flurotanin ditemukan dalam rumput laut coklat, yaitu mencapai 5-15% dari berat keringnya (Fitton, 2005).



**Gambar 2.2** Struktur Kimia Floroglucinol (Fitton, 2005)

### 2.1.3 Potensi Flavonoid Sargassum Sebagai Terapi Rheumatoid Arthritis

Rumput laut coklat memiliki kandungan zat aktif karagenan yang mampu menurunkan kadar guladi dalam darah. Rumput laut coklat memiliki kandungan antioksidan dari golongan polifenol (florotanin dan flavonoid), fucoidan, fukosantin,  $\alpha$ -tokoferol, alginate, dan iodin. Senyawa dari golongan polifenol, fukosantin,  $\alpha$ -tokoferol dan karotenoid memiliki aktivitas antioksidan yang berguna menangkal radikal bebas (Shofia, 2013).

Antioksidan adalah zat yang memperlambat atau menghambat stres oksidatif pada molekul. Antioksidan terbagi menjadi antioksidan enzimatik (enzim) dan antioksidan non enzimatik (ekstraseluler). Antioksidan enzim antara lain superoksida dismutase, glutathion peroksidase (GSH-Px), dan katalase. Sedangkan antioksidan nonenzimatik (ekstraseluler) diantaranya adalah vitamin E, vitamin C, beta-karoten, glutathion, ceruloplasmin, albumin, asam urat dan selenium (Hariyatmi, 2004).

Radikal bebas dapat dihasilkan dari metabolisme tubuh dan faktor external seperti sinar ultraviolet, zat kimia dalam makanan dan polutan lain. Contoh *Reactive oxygen species* (ROS) adalah variasi bentuk oksigen teraktivasi seperti ion superoksida ( $O_2^*$ ) dan *hydroxyl radicals* (OHO), juga

spesies *non free radical* seperti *hydrogen peroxide* ( $H_2O_2$ ). Superoksida merupakan radikal bebas yang sangat reaktif dan paling berbahaya bagi sel dan bersifat reduktan dan oksidan serta dapat bereaksi dengan berbagai substrat biologis (Jones, 2008)

Secara fisiologis, radikal bebas berperan dalam proses transport elektron, metabolisme tubuh dalam keadaan fagositosis serta sintesis DNA dan protein. Namun, jika jumlah radikal bebas terlalu banyak dalam waktu yang berkepanjangan akan mengakibatkan kerusakan pada sel tubuh terutama perubahan makromolekul seperti DNA, lipid, dan protein. Stres oksidatif adalah ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan di dalam tubuh, dimana produksi radikal bebas melebihi kemampuan mekanisme *scavenging* (pembersih) yang dapat merusak membran sel, protein dan DNA dan berakibat fatal bagi kelangsungan hidup sel dan jaringan (Evans *et al.*, 2004; Jones, 2008).

Hasil penelitian Aulanni'am (2001) menunjukkan bahwa hasil uji fitokimia senyawa ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) mengandung senyawa polifenol (flavonoid dan florotanin) dan alkaloid. Senyawa dari golongan polifenol ini memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang berguna menangkal radikal bebas. Hasil KLT preparatif dan spektrum IR noda ekstrak yang terpisah menunjukkan adanya gugus O-H, ikatan C=C aromatik, C-H aromatik, C=C alkena, C-O dan C-H alifatik. Aktivitas antioksidan yang terkandung pada rumput laut coklat (*sargassum* sp) adalah komponen polifenol (flavonoid dan florotanin) dan fukosantin.



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

Hewan laboratorium atau hewan percobaan dapat digunakan sebagai media dalam penelitian atau pengamatan laboratorik untuk mempelajari dan mengembangkan ilmu pengetahuan. Tikus *Rattus norvegicus* merupakan hewan yang umum digunakan dalam penelitian, karena mudah dipelihara, secara garis besar fungsi dan bentuk organ serta proses biokimianya antara tikus dan manusia memiliki banyak kesamaan (Suckow, 2006). Penggunaan hewan coba dengan tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar karena memiliki jumlah anak yang banyak pada setiap jumlah kelahirannya, memiliki masa kebuntingan singkat, dan reproduksinya menyerupai mamalia besar serta pemeliharaan dan penanganan mudah (Bogdanske *et al.*, 2010).

Klasifikasi tikus yang digunakan dalam penelitian menurut Myers dan Armitage (2004), adalah sebagai berikut :

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



**Gambar 2.3** Tikus (*Rattus norvegicus*) (Maley, 2003)

Tikus galur *wistar* merupakan hewan yang sering dipergunakan dalam berbagai penelitian, termasuk penelitian hormon dan pengamatan tingkah laku kopulasi yang berkaitan dengan libido. Ciri-ciri tikus ini adalah mempunyai kepala lebar, telinga panjang, dan memiliki berat antara 200-400 gram dengan lama waktu hidup 2,5 tahun sampai dengan 3 tahun (Maley, 2003).

Model hewan reumatoid arthritis digunakan secara luas dalam penelitian tentang patogenesis arthritis inflamasi dan dalam industri farmasi dalam pengujian potensi anti-rematik. Kriteria penting dalam pemilihan model yaitu kemampuan untuk memprediksi keberhasilan aplikasi pada agen, kemudahan melakukan model, reproduktifitas data, durasi wajar periode pengujian dan patologi yang sama dengan patogenesis penyakit yang sama pada target. (Bendele, 2001; Ronaghy, *et al.*, 2002; Snehalatha, *et al.*, 2012; Delves, *et al.*, 2011).

Preparasi *arthritis adjuvant* pada *Rattus norvegicus* melalui *complete freund's adjuvant* (CFA) secara intradermal. CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) merupakan suatu emulsi minyak yang mengandung *Mycobacterium butyricum* yang digunakan untuk meningkatkan imunitas. Induksi *Complete Freud's Adjuvant* (CFA) menyebabkan respons inflamasi.

Manifestasi klinik dan karakteristik gambaran histopatologik analog dengan RA pada manusia. Untuk itu imunisasi CFA diterima secara luas sebagai model eksperimen pada hewan coba. CFA dalam emulsi minyak yang mengandung *Heat killed-Mycobacterium butiricum* akan meningkatkan imunogenitas dan merangsang respon imun yang lebih besar daripada antigen. Penggunaan CFA lebih dari satu kali injeksi menyebabkan respon inflamasi dan nekrosis pada hewan coba. Adjuvant dapat disuntikkan pada pangkal ekor atau di salah satu telapak kaki. Kaki akan mengalami kebengkakan dipantau dari hari ke-9 (onset penyakit) sampai 15 hari atau lebih tergantung pada durasi yang diinginkan. Inflamasi kronik terjadi setelah hari ke 10-15 pasca imunisasi, dalam penelitian didapatkan hasil tikus yang mengalami peradangan sendi pada semua sampel akibat dari perlakuan injeksi CFA tersebut dengan terlihat adanya kebengkakan pada sendi dan secara histopatologi terlihat adanya infiltrasi sel-sel inflamasi pada jaringan sendi (Holm, 2000 ; Fletcher, 2007 ; Prabowo, 2005 ; dalam Wiralis & Endang, 2009).

## **2.3 Rheumatoid Arthritis**

### **2.3.1 Definisi**

Arthritis rheumatoid merupakan suatu penyakit yang tersebar luas. Penyakit ini merupakan suatu penyakit autoimun yang menyebabkan kerusakan struktur yang besar, dengan tingkat agresifitas penyakit yang berbeda-beda serta memiliki dampak terhadap kualitas hidup pasien yang terkena (Waldburger *et al.*, 2008). Rheumatoid Arthritis dalam waktu yang lama

mempunyai prognosis yang buruk, dimana akan menimbulkan kecacatan (80 %) setelah 5 tahun dan dapat mengurangi angka harapan hidup 3- 18 tahun (Choy, 2001).

*Rheumatoid arthritis* adalah penyakit autoimun. Definisi lain adalah sel-sel tertentu dari sistem kekebalan tubuh tidak bekerja dengan baik dan mulai menyerang jaringan sendi pada kasus RA. Penyebab RA tidak diketahui, penelitian baru memberi gagasan yang lebih baik dari apa yang membuat sistem kekebalan tubuh menyerang tubuh dan membuat peradangan. Pada kasus RA, fokus peradangan di sinovium, jaringan yang melapisi sendi. Sel kekebalan melepaskan bahan kimia penyebab peradangan. Bahan kimia dapat merusak tulang rawan (jaringan antara bantalan sendi) dan tulang. Hal lain juga berperan dalam RA misalnya, genyang mempengaruhi sistem kekebalan tubuh mungkin membuat beberapa orang lebih rentan untuk terjangkit RA (Cynthia *et al.*, 2012).

Kerusakan jaringan pada arthritis melibatkan interaksi antar sel, yaitu antara limfosit, monosit atau makrofag dan sinoviosit. Interaksi sel tersebut menyebabkan produksi *matriks metalloproteinase*, *kathepsins* dan *proteinase* sel mast yang menyebabkan destruksi tulang rawan serta tulang. Pembentukan osteoklas dari jalur sel makrofag atau monosit pada tempat melekatnya panus dengan tulang rawan, berhubungan dengan destruksi matriks tulang pada penderita RA (Mc Innes & schett, 2011; Astry *et al.*, 2011).

Rheumatoid arthritis disebabkan oleh suatu ekspresi patologik respon imun yang dikendalikan secara genetik terhadap suatu rangsangan antigen. Rangsangan antigen akan memulai respon imun patologik yang menyebabkan peradangan pada RA, namun hal ini belum diketahui dengan pasti. Penderita arthritis menghasilkan sekelompok *auto-antibody* yang disebut dengan faktor rheumatoid bersifat reaktif dengan determinan di wilayah Fc dari IgG. Faktor rheumatoid klasik adalah antibodi IgM dengan reaktivitasnya. Auto-antibodi tersebut mengikat IgG normal yang beredar, IgM dan IgG membentuk kompleks imun yang disimpan dalam sendi. Kompleks imun ini mengaktifkan kaskade komplemen, sehingga dapat menimbulkan reaksi hipersensitifitas tipe III yang menyebabkan peradangan kronis pada sendi (Golsby *et al.*, 2000; McInnes & Sche 2011; Rich *et al.*, 2002).

Aktivasi sistem komplemen akan menyebabkan sejumlah fenomena radang yang meliputi pelepasan histamin, produksi faktor kemotaktik untuk sel-sel polimorfonuklear serta mononuklear dan kerusakan dinding sel yang akan menyebabkan lisis sel tersebut sehingga banyak sel darah putih akan masuk ke dalam rongga sinovial. Prostaglandin dan leukosit yang dihasilkan oleh sel-sel radang diduga merupakan penyebab utama terjadinya proses peradangan. Selanjutnya, lisosom aktif dan enzim-enzim yang dilepaskan ke dalam rongga sinovial oleh leukosit akan meningkatkan peradangan dan respon proliferasif sinovium. Infiltrat mononuklear yang secara karakteristik terlihat di dalam sinovium meliputi penggumpalan perivaskular sel-sel T

*halper* dan penggumpalan interstitial sel T *supresor*, limfosit B, limfoblas, sel plasma dan makrofag. Interaksi imunologik sel-sel tersebut dapat menyebabkan terlepasnya limfokin yang bertanggungjawab untuk penggumpalan makrofag dalam peradangan sinovium, untuk melanjutkan sintesis imunoglobulin dan faktor rheumatoid. Kompleks imun pada yulang rawan sendi akan menarik sel-sel mononuklear yang selanjutnya akan menyebabkan terjadinya kerusakan tulang rawan dengan mengeluarkan enzim *protease* dan *kolagenase* (Golsby *et al.*, 2000; Mc.Innes & Schet 2011; schet, 2008; scott *et al.*, 2010)

Gejala klinis yang sering muncul pada anjing atau kucing yang menderita reumatoidarthritis yaitu kekakuan pada sendi, inflamasi pada sendi, lameness, perubahan ketika berjalan, anorexia, depresi, demam, proliferasi synovial, perluasan inflamasi pada pannus ke dalam rongga sendi menyebabkan terjadi perubahan yang erosif, apabila terjadi secara terus-menerus akan berakibat pada kerusakan artikular kartilago dan tulang (Bucht, 2000).

Gejala arthritis yang terjadi pada penderita rheumatoid arthritis kronis maka akan terjadi kerusakan tulang. Pada tulang yang terdiri dari kolagen tipe I terjadi proses kerusakan di tulang promotori oleh aktivasi osteoklas. Osteoklas berada dalam pengaruh sitokinterutama interaksi dengan *receptor aktivator of NF- $\kappa$ B ligand* (RANKL) ekspresi ini didorong oleh sitokin termasuk TNF. Pada tulang rawan yang terdiri dari kolagen tipe II dan proteoglikan, bagian ini merupakan jaringan yang terkena dampak cukup

besar pada kasus rheumatoid arthritis akibat stres oksidatif. Pada kasus stadium lanjut ini terjadi proses inflamasi dan fibrosis yang banyak sehingga membentuk massa pada sinovium yang terdiri dari fibroblas, sel T, makrofag dan pembuluh darah yang disebut panus. Terbentuknya panus merupakan gambaran yang khas pada rheumatoid arthritis stadium lanjut (Kanaugh & Lipsky, 1998).

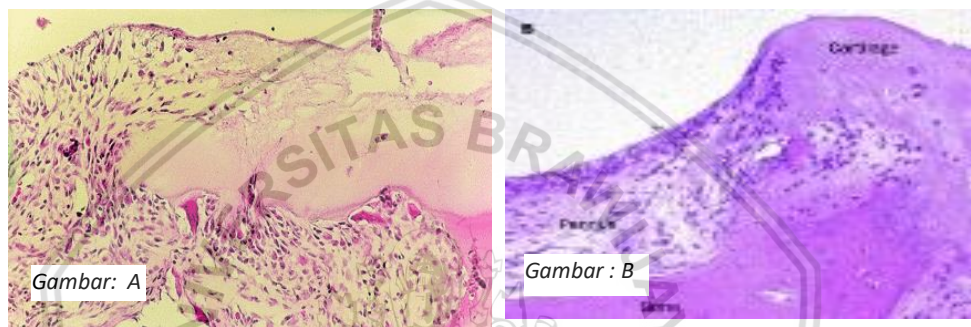
### 2.3.2 Sinovium

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

Lapisan sinovial atau lapisan intimal: Biasanya, lapisan ini tebalnya hanya 1-3 sel. Lapisan ini mengalami hipertrofi, pada kasus RA. Sel primer di lapisan ini adalah fibroblas dan makrofag. Daerah Subintimal dari sinovium: Ini merupakan daerah dimana pembuluh darah sinovial berada, daerah ini biasanya memiliki sel-sel sangat sedikit. Pada RA, daerah subintimal ini merupakan target dari sel-sel inflamasi, termasuk limfosit T dan B, makrofag, sel *mast*, dan sel-sel mononuklear yang berdiferensiasi menjadi osteoklas berinti banyak. Sel-sel secara *aintens* menginfiltrasi dan disertai dengan pertumbuhan pembuluh darah baru (angiogenesis). Pada RA,

hipertrofi dari sinovium (*pannus*) menyerang dan mengikis tulang rawan dan tulang yang berdekatan (Kanaugh & Lipsky, 1998).

Rongga sinovial biasanya hanya terdiri dari 1-2ml cairan sangat kental (karena asam hialuronik) dan beberapa sel. Pada RA, koleksi besar cairan (efusi) yang terjadi pada dasarnya merupakan filtrat plasma (eksudatif, yaitu kandungan protein tinggi). Cairan sinovial sangat bersifat inflamasi.



**Gambar 2.4.** Gambaran histopatologi pada kasus *rheumatoid arthritis* (Gary, 2003).

Gambar 2.4 (A), merupakan gambar histopatologi dari pembentukan pannus tulang rawan articular pada *rheumatoid arthritis*. Sel sinovial berinfiltrasi ke dalam matriks tulang rawan, dimana aktivasi komplemen terjadi (Gary, 2003). Gambar 2.4 (B), merupakan gambar jaringan sendi pada penderita penyakit arthritis menggunakan teknik pewarnaan hematoxilin dan eosin. Sel pannus menginfiltrasi tulang dan tulang rawan (perbesaran asli  $\times 100$ ). Dimana pada gambar terlihat adanya erosi dan degradasi dari sel pannus terhadap tulang dan tulang rawan (Gary, 2003).



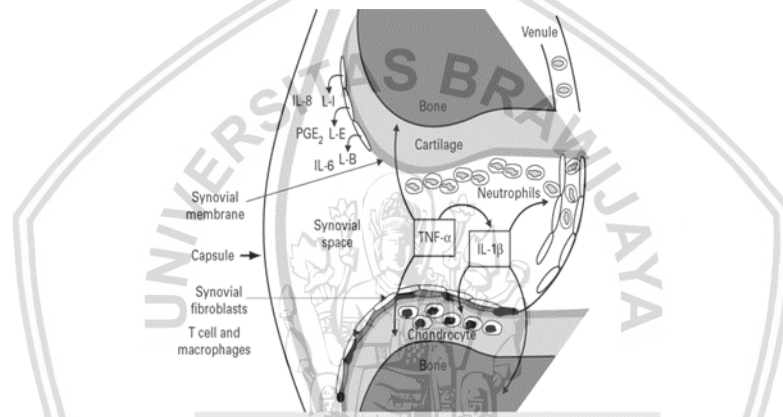
### 2.3.2 Patomekanisme *Rheumatoid arthritis*

Patogenesis Reumatoid Arthritis berawal dari suatu antigen yang berada pada membran sinovial. Pada membran sinovial tersebut antigen akan diproses oleh *antigen presenting cells* (APC). Antigen yang telah diproses oleh APC selanjutnya akan dilekatkan pada CD4 (+) dan selanjutnya akan mengaktivasi sel limfosit T. Selain sebagai penyaji antigen sel APC juga mengeluarkan sitokin-sitokin proinflamasi seperti interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8), dan *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) yang akan menyebabkan inflamasi dan kerusakan dari sendi (Goldring, 2003). *Rheumatoid arthritis* menyerang jaringan fibroblast seperti *membrane synoviocytes* dan akan menghasilkan IL-6 dan IL-8 yang berkontribusi terhadap peradangan serta kerusakan sendi, dimana kedua sitokin ini berhubungan dengan regulasi gen oleh NF-kB dalam proses imunitas dan peradangan (Georganas *et al.*, 2000).

Regulasi dari sitokin proinflamasi IL-8, dan IL-6, IL-1 dan TNF- $\alpha$  sebagai reseptor dalam peradangan sendi dapat dilihat pada Gambar 2.5, dimana RA ditandai oleh peradangan terus-menerus dari lapisan sinovial pada sendi yang dapat menyebabkan deformitas sendi. Inflamasi sinovial dapat terjadi pada pembuluh darah, yang menyebabkan hiperplasia sel endotel pembuluh darah kecil, fibrin, platelet dan inflamasi sel yang dapat menurunkan aktivitas vaskuler pada jaringan sinovial. Hal ini menyebabkan gangguan sirkulasi darah dan berakibat pada peningkatan metabolisme yang memacu terjadinya hipertropi (bengkak) dan hiperplasia (membesar) dan sel

dalam keadaan hipoksia. Sel yang hipoksia dalam sinovium berkembang menjadi edema dan menyebabkan multiplikasi sel sinovial. Sel pada sinovium tumbuh dan membelah secara abnormal, membuat lapisan sinovium menebal, sehingga sendi membesar dan bengkak (Ackerman *and* Rosai, 2004).

Stres oksidatif pada kasus rheumatoid arthritis telah digambarkan



**Gambar 2.5. Patogenesis Reumatoid Arthritis (Arend,2001)**

sebagai mekanisme penting yang mendasari terjadinya kerusakan sinovitis proliferaif.  $TNF-\alpha$  berlebihan sebagai poros penting dalam patogenesis RA diperkirakan menjadi penyebab utama dalam pelepasan ROS pada kasus RA. Kerusakan endotel ROS meningkatkan permeabilitas mikrovaskular dan perubahan neutrofil menjadi peradangan. Oleh karena itu, antioksidan bisa menjadi pilihan tepat untuk penelitian di bidang pengobatan untuk kasus rheumatoid arthritis (Mirshafiey & Mohsenzadegan, 2008).

## 2.5 Inflamasi

Inflamasi merupakan suatu respon protektif setempat ditimbulkan oleh cedera atau kerusakan jaringan. Inflamasi memiliki fungsi mengurangi dan

menghancurkan suatu agen penyebab cedera atau kerusakan jaringan. Pada bentuk akut ditandai dengan nyeri, panas, kemerahan, bengkak dan hilangnya fungsi. Inflamasi berperan sebagai proses sentral dalam patogenesis dan juga sebagai suatu fungsi pertahanan tubuh. Pada kondisi normal, inflamasi merupakan proses *self limiting*, dimana ketika penyebab inflamasi dapat dienyapkan maka inflamasi dapat hilang. Inflamasi kronis terjadi ketika penyebab inflamasi tidak dapat dihilangkan. Kegagalan proses inflamasi ini akan berubah bentuk dari proses protektif menjadi proses yang menyebabkan kerusakan jaringan (Soenarto, 2006).

Mediator inflamasi merupakan suatu senyawa yang dapat menginduksi atau mempercepat proses inflamasi tapi tidak menyebabkan kerusakan jaringan. Mediator inflamasi utama pada artritis rematoid adalah sitokin TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) dan IL-1 (Interleukin-1) (Koopman, 1997). Sitokin merupakan *messenger* kimia atau perantara dalam komunikasi intraseluler yang sangat penting dan aktif pada konsentrasi yang sangat rendah. Sitokin TNF- $\alpha$  dan IL-1 dihasilkan oleh makrofag setelah diaktivasi oleh interferon- $\gamma$ , bakteri, atau oleh kompleks imun. Sitokin ini dapat menginduksi ekspresi sejumlah protease dan menghambat pembentukan matriks ekstraseluler (Koopman, 1997).

Fagositosis merupakan pertahanan alami tubuh untuk membatasi pertumbuhan alami utama tubuh untuk membatasi pertumbuhan dan penyebaran dari bahan-bahan yang bersifat patogen dengan mengeluarkan senyawa radikal bebas. Peningkatan senyawa oksigen reaktif dapat

menyebabkan aktivasi faktor transkripsi *Nuclear Factor* - $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Pada sel yang tidak dirangsang, NF- $\kappa$ B terdapat dalam bentuk inaktif di dalam sitoplasma, membentuk kompleks dengan inhibitor I $\kappa$ B. Protein inhibitor I $\kappa$ B yang paling penting di antaranya adalah I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$ , dan I $\kappa$ B- $\epsilon$ . Sitokin yang ekspresi gennya diaktifkan oleh NF- $\kappa$ B, adalah TNF- $\alpha$  dan IL-1, yang juga merupakan aktivator NF- $\kappa$ B, sehingga memberikan suatu potensi untuk siklus *positive feedback* dalam respons inflamasi. NF- $\kappa$ B aktif terdapat pada sinoviosit tipe A, sel subsinovial yang menyerupai makrofag, dan endotel vaskuler pada sendi rematoid. Aktivasi NF- $\kappa$ B dicapai melalui sinyal yang menginduksi degradasi proteolitik dari I $\kappa$ B dalam sitoplasma (Soenarto, 2006).

#### 2.4 Stresor Dingin

Kondisi yang menimbulkan keadaan stres disebut dengan stressor, setiap individu yang terpapar dengan stressor akan berusaha melakukan adaptasi hingga menuju keadaan homeostasis. Bila proses adaptasi ini tidak berhasil maka akan terjadi defiasi atau gangguan akibat stressor yang terjadi. Pada saat individu menjalani proses adaptasi maka akan terjadi perubahan neurofisiologi dan neurokimia yang kompleks. Stressor yang dipaparkan pada setiap individu akan mempengaruhi imunologi pada tubuhnya, respon ini dapat meningkatkan atau menurunkan status imunologi. Respon dari tubuh ini dipengaruhi oleh waktu, yaitu lamanya stressor dan onset dari stressor yang dipaparkan, intensitas, umur dan status imun penderita (Sigal & Ron, 1994; Zautra *et al.*, 2007).

Paparan dengan stressor dingin, secara fisiologis tubuh akan berusaha meregulasi untuk mempertahankan suhu tubuh agar tetap konstan dengan cara mentransfer energi dari makanan menjadi panas yang disebut termogenesis. Kecepatan termogenesis diatur secara sentral melalui hipotalamus. Mekanisme utama pada termoregulasi atau pengaturan suhu tubuh adalah vasokonstriksi pada seluruh kulit tubuh untuk menghambat pelepasan energi melalui kulit. Mekanisme yang kedua adalah piloerksi, tujuannya mencegah dingin dari lingkungan masuk ketubuh. Mekanisme ketiga adalah termogenesis, pada jaringan aktif sebagian besar lemak dan glukosa akan dioksidasi pada jaringan untuk menghasilkan panas. Suhu tubuh yang terus menurun akan menstimulasi organ termoregulator untuk mempertahankan suhu tubuh agar tetap konstan, norepineprin menginduksi stimulasi termogenesis pada lemak coklat. Penurunan suhu tubuh merangsang *ventromedial hipotalamic nucleus* (VMN) untuk melepaskan norepineprin melalui simpatik nerves sistem untuk meningkatkan pembakaran makanan. Pelepasan norepineprin menginisiasi pemecahan trigliserid pada lemak coklat melalui receptor  $\beta_3$  adrenergic. Signal intraseluller ditransmisikan melalui cAMP dan protein kinase untuk mengatur pelepasan trigliserida dari asam lemak, keduanya merupakan substrat akut untuk termogenesis dan regulator untuk aktivitas *Uncoupling protein-1* (UPC-1, termogenin). Pembakaran asam lemak pada rantai respirasi menyebabkan pelepasan  $H^+$  dan UPC-1 memungkinkan membakar substrat pada mitokondri. Bentuk *uncoupled* produksi ATP ekuivalen dengan transport  $H^+$ . Hasilnya akan

terjadi peningkatan glukosa dan oksigen dalam darah untuk memproduksi panas (Guyton & Hall, 2011)

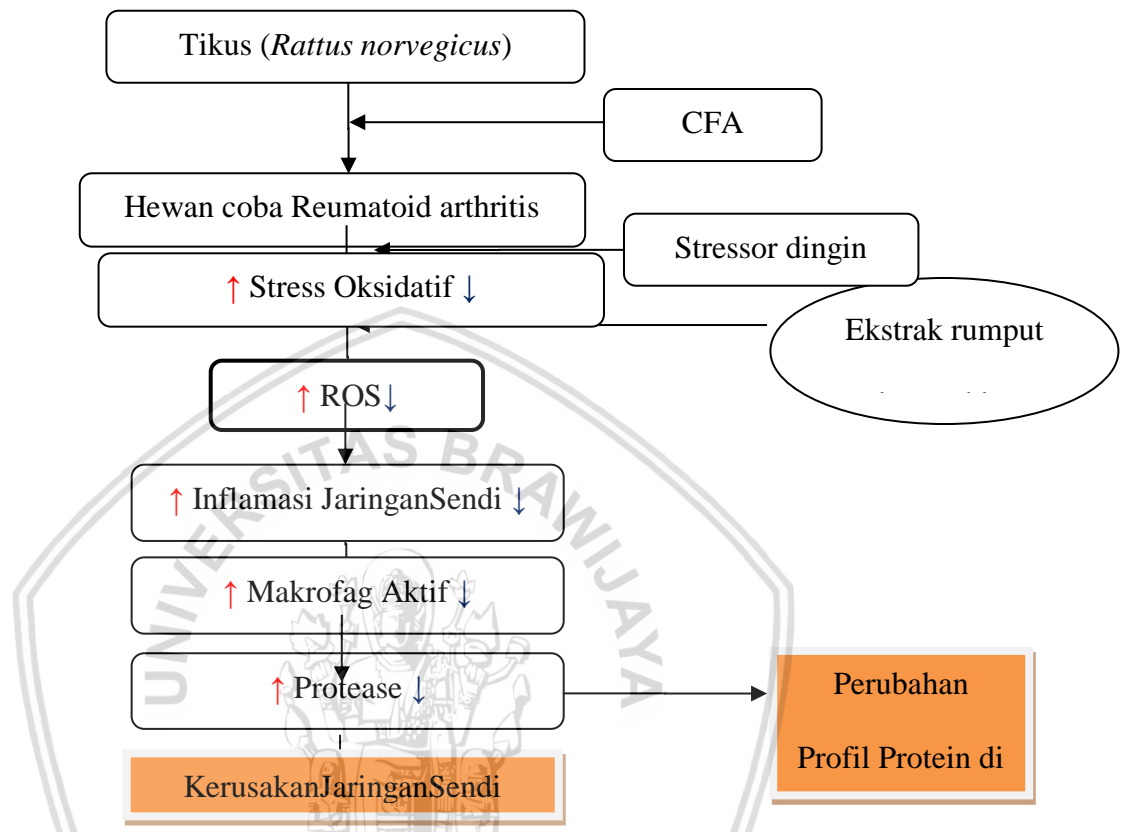
## **2.5 SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly-acrylamide Gel*)**

### ***Electroforesis***

SDS-PAGE adalah metode yang umumnya digunakan untuk analisa campuran protein secara kualitatif. SDS-PAGE merupakan standar metode pengujian terhadap berat molekul suatu protein yang mempunyai fungsi untuk memberikan muatan negatif pada protein yang akan dianalisa. Metode ini sering digunakan untuk menentukan berat molekul dan memonitor pemurnian suatu protein. SDS memiliki sifat polar dan non polar yang dapat mengikat protein (Rantam, 2003). Muatan asli protein akan digantikan oleh muatan negative dari anion yang terikat sehingga kompleks protein SDS memiliki rasio pemuatan berat molekul yang konstan (Rantam, 2003). Prinsip penggunaan metode ini adalah migrasi komponen protein. Metode ini sering digunakan untuk menentukan berat molekul suatu protein dan juga untuk memonitor pemurnian protein. Sampel enzim yang diinjeksikan ke dalam sumur gel diberi warna dengan bromphenol biru agar dapat membantu memonitor jalannya elektroforesis (Wilson dan walker, 2000).

**BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

**3.1 Kerangka Konseptual**



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :  
 ↓ : Menurunkan  
 ↑ : Meningkatkan  
 ← : Menginduksi

(CFA) menyebabkan hewan coba menderita Rheumatoid arthritis sehingga terjadi stress oksidatif. Stres oksidatif menyebabkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) mengalami peningkatan. ROS yang tinggi mengakibatkan terjadinya inflamasi jaringan sendi sehingga

mengaktifkan makrofag, Makrofag yang aktif akan banyak menghasilkan protease. Protease dapat menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan sendi dan perubahan profil pita protein pada sendi.

Ekstrak rumput laut coklat yang mengandung flavanoid ketika di berikan pada hewan coba rheumatoid arthritis akan menetralkan radikal bebas / ROS. Kemudian ROS akan turun sehingga inflamasi pada jaringan sendi bisa di turunkan / di hambat. Ketika inflamasi telah dihambat maka aktifitas makrofag akan menurun sehingga produksi protease mengalami penurunan juga protease yang turun akan menyebabkan perbaikan pada jaringan sendi dan profil pita protein.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

1. Pemberian *Sargassum duplicatum Bory* pada tikus model Rheumatoid arthritis yang terpapar stresor dingin mengembalikan profil pita protein sendi kembali normal.
2. Pemberian *Sargassum duplicatum Bory* pada tikus model rheumatoid arthritis yang terpapar stresor dingin dapat memperbaiki histopatologi kerusakan sendi.



## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama bulan Januari 2015 sampai dengan Maret 2015. Perawatan dan perlakuan terhadap hewan model, pembedahan, pembuatan preparat untuk hitopatologi sendi tikus, serta pengukuran kadar Profil Pita Protein dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

### 4.2 Alat dan 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 Universitas Brawijaya Malang. Setiap pagi diberi makan pelet dan minum secara *ad libitum*.

#### 4.2.2 Alat 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 entelan, cetakan dari logam berbentuk L untuk *embedding*, *Water bath*, *Staining* jaringan untuk pengecatan, mikroskop digital kamera untuk melihat hasil sediaan.

#### 4.2.3 Bahan Penelitian

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, ketamin untuk pembiusan, 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), lulus proses sertifikasi layak etik penelitian oleh KEP FKUB dengan No: 326-KEP-UB dan belum pernah digunakan penelitian.

#### 4.3.2 Pembagian Kelompok Penelitian

Kelompok penelitian ditunjukkan dalam tabel 4.1 sebagai berikut :

**Tabel 4.1** Kelompok Penelitian

Kelompok	Keterangan	Variabel yang diamati profil pita protein dan HE Sendi
P1 (Kontrol negatif)	Kelompok kontrol tikus normal	
P2 (Kontrol positif)	Kelompok tikus arthritis induksi CFA	
P3 (perlakuan 1)	Perlakuan dibuat menjadi arthritis dan diberi stresor dingin yaitu dimasukkan dalam ruangan 5 <sup>0</sup> C selama 15 menit setiap hari selama 7 hari berturut-turut	
P4 (perlakuan 2)	Perlakuan dibuat menjadi arthritis dan diberi stresor dingin dengan cara dimasukkan dalam ruangan 5 <sup>0</sup> C selama 15 menit selama 7 hari dan diberikan ekstrak <i>Sargassum duplicatum</i> Bory dengan dosis 400 mg/kgBB secara per oral selama 14 hari. ss	

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

$$\text{Sehingga : } p(n-1) \geq 15$$

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 5$$

**Keterangan :**

p = jumlah perlakuan

n = jumlah minimal ulangan yang diperlukan

Berdasarkan hasil perhitungan diatas, untuk empat kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal lima kali ulangan dalam setiap kelompok. Penelitian ini menggunakan lima kali ulangan dalam setiap kelompok sehingga jumlah seluruh tikus yang diperlukan sebanyak 20 ekor. Selanjutnya dibagi dalam 4 kelompok yaitu kontrol negatif (P1), kontrol positif (2), positif, kontrol negatif, perlakuan 1, perlakuan 2.

#### 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. Dalam penelitian ini digunakan tikus putih jenis Wistar sebagai hewan coba, yang dibuat menjadi arthritis (selanjutnya disebut arthritis ajuvan) dengan cara melakukan injeksi

secara intradermal per satu ekor pada pangkal ekor tikus 0,1 ml *Coplete Freund's Adjuvant* (CFA), dan diberikan booster 14 hari kemudian secara intradermal pada kaki kanan kiri. Perubahan klinis yang terjadi pada tikus putih tersebut disebut dengan Adjuvant Induced Arthritis (AIA atau Arthritis adjuvant/AA) berupa kemerahan dan pembengkakan sendi. Jaringan sendi 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:

1. Stresor dingin (dimasukkan dalam ruangan 5<sup>0</sup>C selama 15 menit setiap hari selama 7 hari berturut-turut), ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum Bory*)

2. Variabel tergantung:

1. Profil pita protein pada sendi, kerusakan sendi

3. Variabel kendali:

2. Umur, berat badan tikus, jenis kelamin, makanan, kondisi lingkungan.

#### 4.4 Prosedur Kerja

##### 4.4.1 Persiapan Hewan Model

Hewan model dibagi dalam empat kelompok perlakuan secara acak. Hewan model diadaptasikan dalam kandang kelompok selama tujuh hari sebelum perlakuan (Lina, dkk., 2003). Hewan model diberi ransumpakan 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 (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

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 22-24<sup>0</sup>C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

#### **4.4.2 Prosedur Induksi Arthritis Ajuvan menggunakan CFA**

Hewan coba disiapkan, selanjutnya dilakukan injeksi secara intradermal pada pangkal ekor tikus 0,1 ml CFA (*Complete Freund's Adjuvan*). Setelah 14 hari. Setelah 14 hari diberikan booster 0,05 ml CFA secara intradermal pada kaki

kanan dan kiri. Setelah 7 hari akan timbul gejala arthritis ajuvan, berupa pembengkakan, kemerahan dan nyeri pada sendi kaki. Model arthritis ini disebut dengan Adjuvant-Induced Arthritis (AIA), dan telah pakai secara luas sebagai model dari rematoid arthritis (RA) (Prabowo, 2004).

#### 4.4.3 Pembuatan Ekstrak Rumput Laut Cokelat (*Sargassum duplicatum Bory*)

Ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum Bory*) dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Menggunakan pelarut etanol diharapkan kandungan anti oksidan yaitu Polifenol (flavonoid dan fluorotanin) 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 85%. Maserasi dilakukan selama 2 hari. Ekstrak kemudian disaring konsentrat filtrat dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40<sup>0</sup>C (± 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 N<sub>2</sub> menjadi ekstrak dengan berat konstan.

Setelah dibuat ekstrak etanol selanjutnya diuji fitokimia ini untuk menentukan senyawa marker yang ada dalam rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum* Bory).

#### 4.4.4 Dosis Ekstrak Rumput Laut Cokelat (*Sargassum duplicatum* Bory)

Dalam penelitian Fauziah (2013) pemberian ekstrak *Sargassum duplicatum* Bory dengan dosis 100 mg/kgBB pada hewan coba arthritis dapat menurunkan kadar MDA sebesar 21,24%. Berdasarkan penelitian tersebut kami menggunakan dosis ekstrak sargassum 400 mg/kgBB. Diharapkan dengan dosis empat kali lebih banyak akan menurunkan kadar IL-1 $\beta$  lebih besar.

#### 4.4.5 Penentuan Profil Protein dengan Teknik SDS-PAGE (Aulanni'am, 2005)

Profil protein dilakukan dengan teknik SDS PAGE. Teknik SDS PAGE meliputi persiapan gel dengan menyiapkan dua plat kaca yang dirangkai dengan jarak  $\pm$  1 mm. Pembuatan gel sebanyak dua lapis digunakan untuk mengumpulkan sampel (*stacking gel*) dan untuk memisahkan protein (*separating gel*). Campuran larutan *separating gel* dimasukkan ke dalam *plate* dengan menggunakan mikropipet. Gel dibiarkan selama 10-30 menit hingga memadat. Kemudian *stacking gel* dituangkan di atas *separating gel* sambil dipasang sisir sampai terbentuk gel dan sumurannya. Setelah didiamkan 30 menit dan terbentuklah gel, sisir diangkat dan *plate* dipasang pada alat elektroforesis. Larutan buffer dituang ke dalam bejana elektroforesis. Injeksi sampel disiapkan ekstrak kasar protein sebanyak 15  $\mu$ L ditambahkan larutan *Reducing Sample Buffer* (RSB) dengan perbandingan volume 1:1 lalu dimasukkan ke dalam eppendorf dan dimasukkan ke dalam penangas selama 3



menit dengan suhu 100° C. Preparasi sampel, sampel didinginkan dan dimasukkan ke dalam sumuran gel. Protein standar juga dimasukkan dengan perlakuan yang sama seperti sampel. Kemudian anoda dihubungkan dengan reservoir bawah sedangkan katoda dengan reservoir atas. Arus listrik yang digunakan untuk menghidupkan *power supply* adalah sebesar 200 V. Proses *running* dihentikan setelah warna biru dari penanda mencapai ketinggian ± 0,5 cm dari batas bawah *plate* gel. Penentuan berat molekul dilakukan dengan cara menghitung *Retardation factor* (Rf) atau *Mobilitas rate* (Mr) menggunakan rumus sebagai berikut :

$$Rf = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal (a)}}{\text{jarak pergerakan warna dari tempat awal (b)}}$$

Nilai Rf yang diperoleh digunakan sebagai sumbu X dan massa molekul relatif ditempatkan sebagai sumbu Y sehingga diperoleh persamaan regresi linier  $Y = ax + b$ . Persamaan ini digunakan untuk menghitung massa molekul relatif dari protein sampel. Berat molekul protein sampel didapatkan dengan menggunakan rumus  $BM = \text{Antilog } Mr \text{ protein sampel}$ .

#### 4.4.6 Pembuatan Preparat Hitopatologi dengan metode HE

1. Pengambilan Sampel (*Sampling*), Fiksasi, dan Pemotongan Organ

Tikus dimatikan setelah 30 menit setelah perlakuan terakhir dengan cara dislokasi leher, kemudian tikus dibedah dan diambil organ kakinya. Sampel kaki yang telah diambil dilakukan pengelupasan kulit kemudian dicuci dengan menggunakan NaCl fisiologis 0.9% untuk menghilangkan darah.

Setelah itu, direndam dalam larutan PBS dengan pH 7,4. Setelah fiksasi dilakukan, jaringan direndam dalam larutan etanol 70% selama 24 jam.

## 2. Dekalsifikasi

Dekalsifikasi dilakukan dengan merendam tulang dalam asam nitrat 10% selama 5 hari.

## 3. Dehidrasi dan Infiltrasi

Dehidrasi dilakukan dengan merendam jaringan dalam larutan etanol secara bertingkat dari konsentrasi 80% sampai dengan absolut. Lama jaringan dalam larutan etanol 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.

## 4. Penjernihan (*Clearing*)

Penjernihan 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).

## 5. Infiltrasi Parafin

Infiltrasi parafin bertujuan untuk menggantikan kedudukan dehidran dalam jaringan dan bahan penjernih dengan parafin cair. Jaringan dimasukkan

dalam parafin cair I, parafin cair II, dan parafin cair III (masing-masing 1 jam di dalam oven).

#### 6. Penanaman Jaringan (*Embedding*)

*Embedding* dilakukan dengan cetakan yang di dalamnya diisi paraffin cair. Blok paraffin yang sudah membeku tersebut dipasang pada mikrotom dan diatur agar posisinya sejajar dengan posisi pisau. Blok paraffin dipotong dengan ketebalan 4  $\mu\text{m}$ . Pada awal pemotongan dilakukan *trimming* karena jaringan yang terpotong masih belum sempurna. Sediaan disimpan pada inkubator dengan suhu 37°C selama semalam lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE.

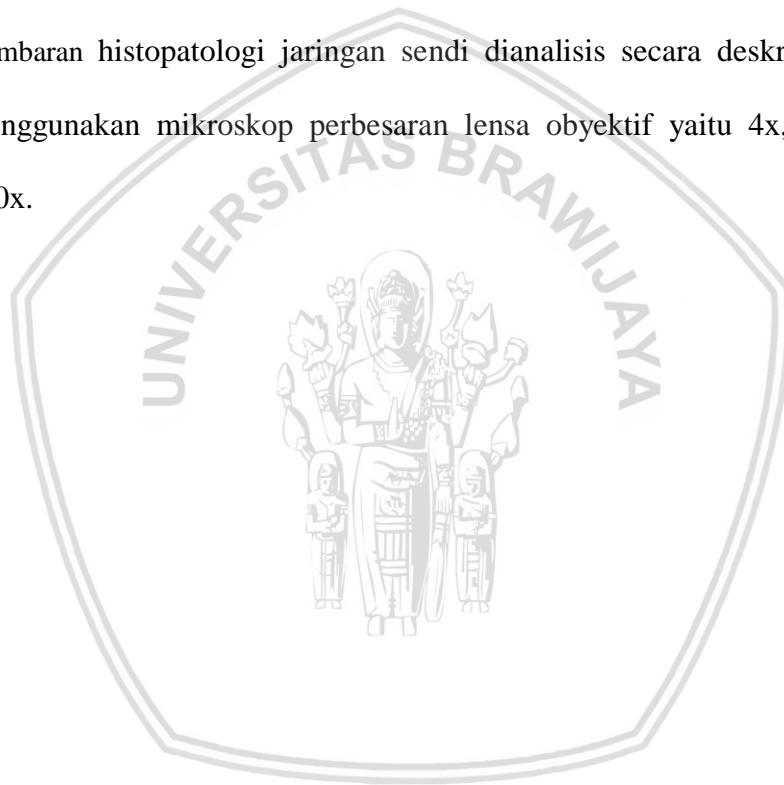
#### 7. Pewarnaan Hematoksilin – Eosin

Pewarnaan Hematoksilin – Eosin diawali dengan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol lalu dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol absolut I, II dan III masing-masing 5 menit, alkohol 95%, 90%, 80% dan 70% secara berurutan masing-masing selama 5 menit. Sediaan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit dan dilanjutkan dengan aquades selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna Hematoksilin selama 10 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan air aquades selama 5 menit. Setelah itu sediaan diwarnai dengan pewarna Eosin selama 5 menit dan air aquades selama 5 menit. Setelah sediaan diwarnai, dilakukan dehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama beberapa detik, dan dilanjutkan dengan alkohol 100% I, II dan III masing-masing 2

menit. Setelah itu dilakukan proses *Clearing* dengan xylol I, II dan III selama 3 menit dan ditutup dengan gelas penutup (Dewi, 2011).

#### 4.5 Analisis Data

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah profil pita protein dan Histopatologi jaringan sendi. Profil pita protein dianalisa secara semi kuantitatif dengan menghitung berat molekul pita protein yang muncul dan Gambaran histopatologi jaringan sendi dianalisis secara deskriptif dengan menggunakan mikroskop perbesaran lensa obyektif yaitu 4x,10x,40x,dan 100x.



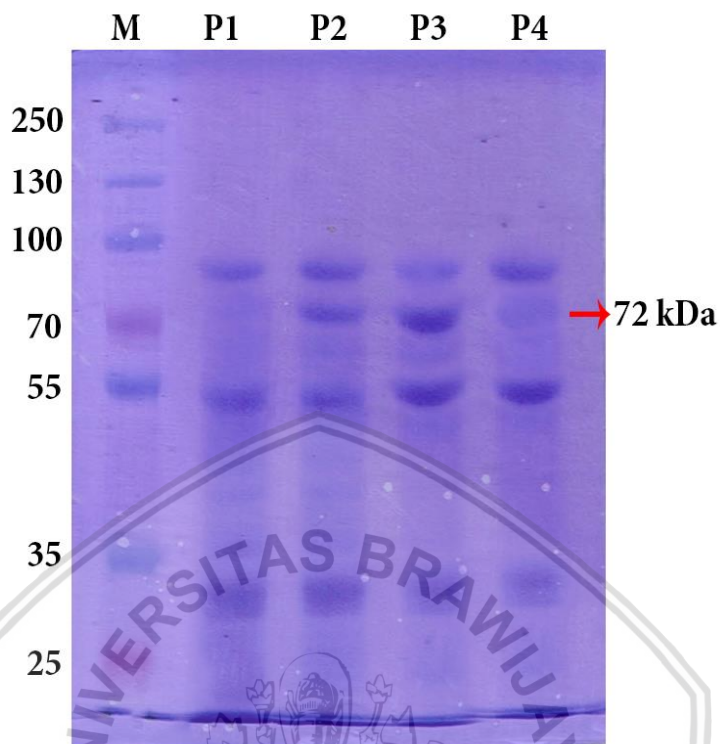
## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Analisa Profil Protein

Pengaruh terapi ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum Bory*) terhadap kadar profil pita protein pada jaringan sendi tikus (*Rattus norvegicus*) model artritis yang terpapar stresor dingin dianalisa menggunakan metode *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel electrophoresis* (SDS-PAGE).

SDS-PAGE adalah teknik untuk memisahkan rantai polipeptida pada protein berdasarkan berat molekul dan kemampuannya untuk bergerak dalam arus listrik, dimana molekul yang lebih besar akan tertahan dan akibatnya bergerak lebih lambat (Wilson and Walker, 2000). Pada hasil penelitian ini profil protein hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara profil protein tikus kontrol (P1), tikus Arthritis induksi CFA (P2), tikus Arthritis yang diberikan stressor dingin selama 7 hari (P3), dan tikus Arthritis yang diberikan stressor dingin selama 7 hari kemudian diberikan terapi ekstrak *Sargassum duplicatum Bory* dengan dosis 400 mg/kgBB (P4) secara per oral selama 14 hari pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) seperti yang terlihat pada

**Gambar 5.1.**



**Gambar 5.1** : Profil Protein (12% SDS-PAGE) tikus putih (*Rattus norvegicus*)

**Keterangan:** M (marker); P1 (kontrol negatif); P2 (kontrol positif); P3 (perlakuan 1); P4 (perlakuan 2)

**Tabel 5.1** Profil Protein Organ Sendi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Berdasarkan Berat Molekul Protein Hasil SDS-PAGE

BM Pita Protein	Kelompok Perlakuan			
	P1	P2	P3	P4
98 kDa	✓	✓	✓	✓
72 kDa	-	✓	✓	-
52 kDa	✓	✓	✓	✓
28 kDa	✓	✓	✓	✓

**Keterangan:** Tanda ( - ) menunjukkan pita protein dengan berat molekul tersebut tidak terekspresi

Menurut Snoeck *et al.*, (2001) , Protein 72 kDa merupakan suatu protein yang termasuk *high heat shock protein*. Ekspresi HSP 72 mempunyai fungsi utama sebagai *thermotolerance*, sitoproteksi dan sebagai dukungan dari kelangsungan hidup sel itu sendiri di bawah kondisi stress. HSP adalah suatu respon genetic untuk menginduksi gen-gen yang mengkode *molecular chaperon*, protease dan protein-protein lain yang penting dalam mekanisme pertahanan dan pemulihan terhadap jejas selular yang berhubungan dengan terjadinya kesalahan melipat dari protein target. Protein HSP juga berfungsi untuk mencegah agregasi dan kesalahan pelipatan protein target, dan menjaga protein dalam komponen lipatan yang benar, serta proteksi protein terhadap beberapa jenis stress. *Heat shock protein* (HSP) yang diekspresikan dalam keadaan normal dapat juga meningkat jika ada *stressor*. Respon yang cepat ini merupakan mekanisme proteksi. Protein ini juga mempunyai fungsi penting pada sel yang tidak dalam keadaan *stress*, misalnya mengatur lipatan protein, penyusunan, dan peletakan protein intrasellular, dengan kata lain *heat shock protein* bertugas memastikan setiap protein dalam tubuh dalam bentuk yang seharusnya, di tempat yang seharusnya dan di waktu yang seharusnya, di samping itu juga *heat shock protein* menentukan sel yang sudah rusak atau yang sudah tua untuk dihancurkan dalam proses apoptosis (Walsh, 2003).

Tikus kontrol positif yang diberi paparan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) menunjukkan adanya *heat shock protein*. Hal ini diyakini karena induksi

CFA dapat mengakibatkan arthritis rheumatoid sehingga terjadi stress oksidatif. Stres oksidatif menyebabkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) mengalami peningkatan. ROS yang tinggi mengakibatkan terjadinya inflamasi jaringan sendi sehingga mengaktifkan makrofag. Makrofag yang aktif akan banyak menghasilkan protease. Sitokin pro-inflamasi spesifik yang dikeluarkan oleh makrofag akan menginisiasi produksi protein penanda inflamasi sehingga menyebabkan sintesis *heat shock protein*. *Heat shock protein* bertugas memastikan setiap protein dalam tubuh kita berada dalam kondisi fungsional dan ditempat yang seharusnya. *Molecular chaperon* berpengaruh terhadap sintesis dan pelipatan protein yang penting untuk kelangsungan hidup sel itu sendiri dibawah kondisi stres. HSP akan menentukan sel yang sudah rusak untuk dihancurkan dalam proses kematian sel yang disebut dengan apoptosis (Ampie *et al.*, 2015).

Tikus model Arthritis yang diinduksi CFA (P2) dan tikus model Arthritis yang diberikan stressor dingin selama 7 hari (P3) menunjukkan bahwa protein dengan berat molekul 72 kDa masih terekspresi, sedangkan tikus Arthritis yang diberikan stressor dingin selama 7 hari kemudian diberikan terapi ekstrak *Sargassum duplicatum Bory* dengan dosis 400 mg/kgBB secara per oral selama 14 hari (P4) protein dengan berat molekul 72 kDa terlihat samar dan hampir tidak terekspresi. Tidak terekspresinya protein dengan berat molekul 72 kDa pada P4 diduga karena pengaruh *Sargassum duplicatum Bory* yang di dalamnya memiliki kandungan polifenol berupa flurotanin yang mana memiliki peranan penting dalam proses penyembuhan *rheumathoid arthritis*.



Antioksidan dari flavonoid dan florotanin sebanyak 400mg dari senyawa polifenol yang terkandung dalam rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) tersebut berperan sebagai *scavenger* radikal bebas sehingga menyebabkan proses peroksidasi lipid akibat ROS terhambat dan terjadi penurunan ekspresi pada sitokin *inflammatory* sehingga mengurangi pembentukan protease (Aulanni'am *et al.*, 2012). Peran senyawa polifenol (flavonoid dan florotanin) kandungan antioksidan dari ekstrak rumput laut coklat juga dapat berfungsi sebagai pelindung senyawa-senyawa yang mudah teroksidasi seperti lipid, DNA, dan protein sehingga dapat memperbaiki gambaran profil pita protein (Janero, 2001).

## **5.2 Histopatologi Jaringan Sendi *Metatarsophalangeal* Tikus Arthritis Rematoid Dengan Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)**

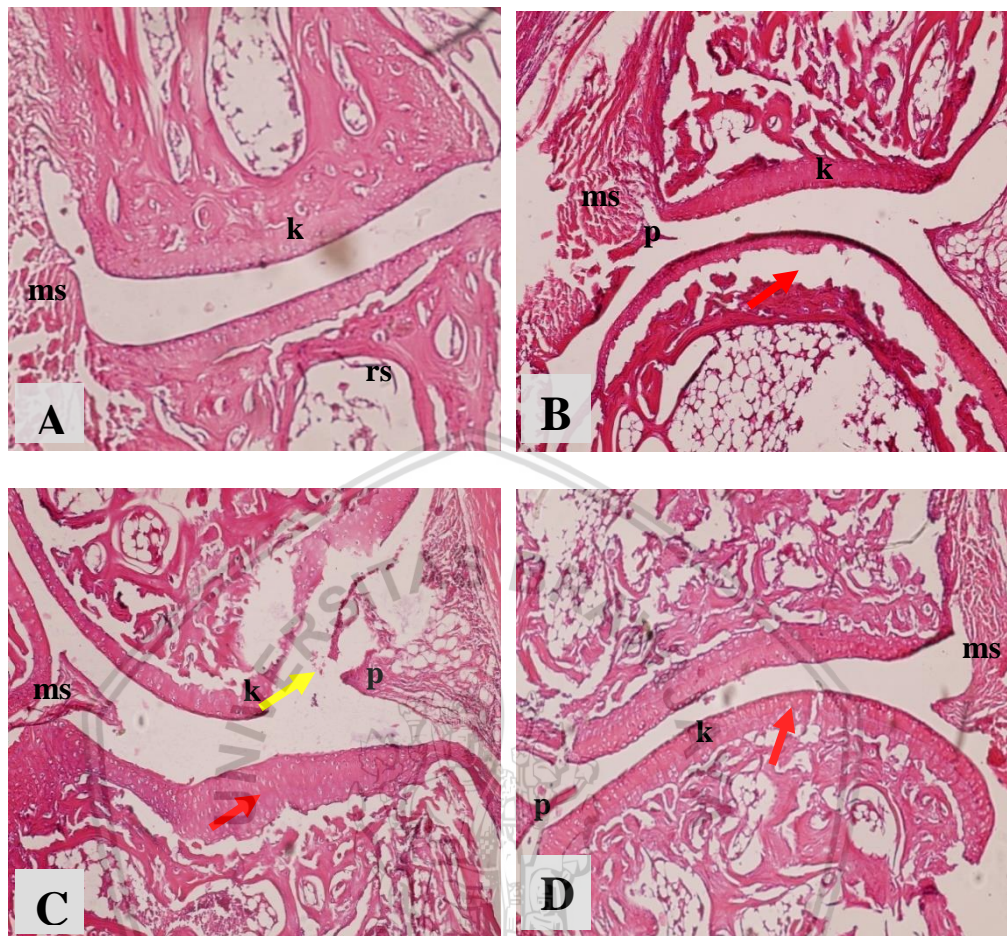
Pengamatan histopatologi jaringan merupakan salah satu parameter untuk mengetahui keberhasilan suatu terapi. Dengan metode pewarnaan hematosilin-eosin (HE), gambaran histologi jaringan sendi model arthritis rematoid dapat di amati di bawah mikroskop dengan melihat adanya perubahan yang terjadi pada jaringan sendi. Tiap perlakuan di lakukan pengamatan pada perubahan histologi yang terjadi meliputi membran sinovial, adanya kerusakan susunan sel kondrosit, dan adanya dilatasi rongga sendi.

Hasil dari pengaruh terapi rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) terhadap gambaran histopatologi jaringan sendi model arthritis rheumathoid dengan pewarnaan Hematoksilin-eosin (HE) menunjukkan

adanya perbaikan pada struktur jaringan. Gambaran histologi jaringan sendi pada masing – masing kelompok perlakuan di tampilkan pada gambar 5.2

Berdasarkan hasil pengamatan histopatologi pada jaringan sendi dengan pewarnaan hematoxyline-eosin pada kelompok tikus kontrol (-) **Gambar 5.2 (A)** memperlihatkan bentuk normal membran synovial tersusun atas lapisan sel sinovial, bentuk kartilago yang normal dengan matriks yang teratur dan rongga sendi yang simetris.

Kelompok kontrol (+) **Gambar 5.2 (B)** menunjukkan hipertropi membran synovial, kerusakan susunan sel chondrocyte, terbentuk pannus dan dilatasi rongga sendi yang menunjukkan terjadinya edema. Gemeinehardt (2012) menyatakan bahwa 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. Sementara efek dari induksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) memperlihatkan perubahan struktur pada jaringan sendi tikus yang dapat dilihat pada gambaran histopatologi meliputi dilatasi rongga sendi, inflamasi membran sinovial, perubahan kartilago, dan perubahan matriks pannus. Sama seperti menurut Nealson (2002) yang menyatakan bahwa pemberian CFA pada tikus menyebabkan inflamasi sendi, infiltrasi sel inflamasi mononuklear, kerusakan kartilago dan destruksi tulang.



**Gambar 5.2** Histopatologi Jaringan Sendi Tarsometatarsal *Rattus norvegicus* dengan Pewarnaan HE (100X).

**Keterangan :** Kartilago (k), rongga sendi (rs), membran synovial (ms), dan pannus (p).  
 A (tikus kontrol): kondisi normal; B (RA); C (RA + *stressor* dingin); dan D (RA+ *stressor* + *Sargassum* dosis 400 mg/kg BB).

- ➔ : Degradasi kartilago
- ➔ : Susunan kondrosit

Kelompok tikus RA dengan perlakuan paparan *stressor* dingin

**Gambar 5.2 (C)** menunjukkan susunan sel sinovial mengalami hipertopi sehingga membran sinovial mengalami penebalan, pannus invasi masuk ke rongga sendi, dan terjadi dilatasi rongga sendi yang menunjukkan edema dan peningkatan infiltrasi sel-sel leukosit dibandingkan dengan rongga sendi kelompok tikus B karena menurut Adnyana *et al.*, (2008) kondisi histologi pada

inflamasi kronik pada kondisi RA sebabkan hipertropi dan penebalan pada membran sinovium karena hambatan aliran darah, inflamasi hingga nekrosis. Menurut Mirshafiey dan Mohsenzadegan (2008) stress oksidatif pada kasus RA merupakan mekanisme penting yang mendasari terjadinya kerusakan sinovitis disebabkan pelepasan sitokin berlebihan dalam patogenesis RA memicu ROS. Pada kasus RA, kerusakan endotel akan meningkatkan ROS, permeabilitas mikrovaskular, dan perubahan neutrofil menjadi peradangan.

Kelompok tikus RA + *stressor* + terapi *sargassum* dengan dosis 400 mg/Kg BB **Gambar 5.2 (D)** memperlihatkan perbaikan gambaran histopatologi jaringan sendi yang ditunjukkan dengan bentuk membran synovial, perbaikan susunan sel condrocyte pada bagian superfisial dan keteraturan matriks pannus. Sama seperti literatur menurut Baeten *et al.*, (2000) Perbaikan artiris terlihat adanya penurunan inflamasi, berkurang infiltrasi sel inflamasi dan terbentuk susunan sel condrosit. Demikian akan terjadi proses penyembuhan tulang rawan (kartilago) dengan baik secara perlahan sehingga mampu memperbaiki struktur jaringan kartilago pada tikus putih RA.

Oleh karena itu, antioksidan pada rumput laut coklat (*Sargassum dulicatum Bory*) yang mengandung flavonoid tinggi bisa menjadi pilihan tepat untuk penelitian di bidang pengobatan kasus RA dengan mengikat ikatan gugus karbon ROS. Efek pemberian ekstrak ethanol rumput laut coklat mampu menekan kembali sel mesenkim, sehingga sel mesenkim teratur dan menekan produksi sitokin proinflamasi.

## BAB 6 PENUTUP

### 6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Terapi ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum Bory*) pada tikus (*Rattus novergicus*) model Arthritis yang terpapar stresor dingin dapat memperbaiki profil pita protein pada jaringan sendi kembali normal dengan ditandai hilangnya protein 72 kDa.
2. Terapi ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum Bory*) pada tikus (*Rattus novergicus*) model Arthritis yang terpapar stresor dingin dapat memperbaiki gambaran histopatologi jaringan sendi yang terlihat adanya penurunan inflamasi, berkurang infiltrasi sel inflamasi dan terbentuk susunan sel condrosit.

### 6.2. Saran

Diperlukan pengembangan mengenai pemanfaatan kandungan zat aktif flavonoid dan flurotanin pada ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum Bory*) sebagai terapi Rheumatoid Arthritis pada *pet animal*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adnyana, I. K., Andrajati, R., Setiadi, A. P., Sigit, J. I., Sukandar, E. Y. 2008. *Farmakoterapi*. PT. ISFI. Jakarta
- Ampie, L., Choy W., Lamano JB., Fakurnejad S., Bloch O., Parsa AT. 2015. *Heat Shock Protein Vaccines Against Glioblastoma: From Bench to Bedside*. Journal of Neurologi.
- Anggadiredja, J.T., A. Zatnika, H. Purwanto, dan S. Istini. 2006. *Rumput Laut*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Astry B, Harberts E and Kamal DM, 2011. "A Cytokine-Centric View of The Pathogenesis and Treatment of Autoimmune Arthritis". Journal of interferon and cytokine Research, vol 1, no 12, 927-940
- Arend, W.P. 2001. The *Innate Immune System in Rheumatoid Arthritis*. Division of Rheumatology, University of Colorado Health Sciences Center. In press. 44 2224-223
- Armitage, D. 2004. *Rattus norvegicus*. Animal Diversity Web. University of Michigan of Zoology.
- Aulanni'am, A. Roosdiana, dan N.L. Rahmah, 2012, *The Potency of Sargassum duplicatum Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy in Rattus norvegicus*, *Journal of Life Sciences*, Vol. 6, pp. 144-154.
- Bendele, 2001. "Animal models of Rheumatoid Arthritis". Journal Musculoskel Neuro Interaction; 1 (4): 377-385.
- Bucht A, Larsson, Weisbrot, et al. 2000. *Expression of interferon-gamma (INF-gamma), IL-10, IL-12 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) mRNA in synovial fluids cells from patients in the early and late phases of rheumatoid arthritis (RA)*. Clin Exp Immunol. 103(3) : 357-367.
- Choy EH and Panayi GS. 2001. *Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis*. N England J med;344:907-16.
- Cyintia S. Crowson, Eric L Matteson, Jhon M. Davis and Sherine E. Gabriel. 2012. "Obesity fuels the upsurge in Rheumatoid Arthritis". Arthritis Care & Research, DOI : 10.1002/acr.21660.
- Clifton O. Bingham. 2007. *Rheumatoid arthritis histopathology*. <http://www.hopkinsarthritis.org/arthritis-info/rheumatoid-arthritis/ra->

[pathophysiology-2/#histopathology](#). Di akses pada tanggal 5 Februari 2015, Malang.

Delves TJ, Martin SJ, Burton DR, and Roitt I M. 2011. *Roitts essential immunology*, 12<sup>th</sup> edition, Blackwell Publishing : pp 479-500.

Fitton, H., 2005. *Marine Algae and Health: A Rivew of The Scientific and Historical Literature*.

Fletcher D.S, W.R. Widmer, S. Luells, A Christen, C Orevillo and S Shah. 2007. *Theraupeutic Administration Of A Selective Inhibitor Of Nitric Oxide Synthase Does Not Ameliorate The Cronic Inflammation And Tissue Damage Associated With Adjuvant Induced Arthritis In Rat. N Jersey: J Pharm Med Chem*.

Georganas C, H. Liu, H. Perlman, A. Hoffmann, B. Thimmapaya and R.M. Pope. 2000. *Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. Northwestern University VA Chicago.

Goldring S.R. 2003. *Patogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. Rheumatolog* : 42(suppl.2):ii11-ii16.

Golsby RA, Kindt TJ, and Osborne BA. 2000. *Kuby Immunology*, 4<sup>th</sup> edition, New York : W.H. Freeman and Company, pp 462-279.

Greidinger, Eric., L.MD. 2004. *Inflammatory rheumatic Disease*. The Mc Graw – Hill Companies, Inc :USA

Guyton AC, and Hall JE. 2011. *Textbook of medical physiology*. Twelfth Edition, Philadelphia : WB Saunders Company, pp 867-875.

Hariyatmi. 2004. *Kemampuan Vitamin E Sebagai Antioksidan Terhadap Radikal Bebas Pada Lanjut Usia. MIPA*, (14) 1 : 52-60.

Holm B, L. Svelander, J.C. Lorentzen and A. Buchtt. 2000. *Pathogenetic Studies Adjuvant Induced Arthritis. Scand J Immunol.*; 54:599-605.

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.

Jaswir, Irwandi and Hammed, A Monsur. 2011. *Anti-inflamator y compounds of algae origin* : A review. *Jurnal of medical plants research*, vol.5(33),pp 7146-7154

- Kadi, A. 2005. *Beberapa Catatan Kehadiran Marga Sargassum di Perairan Indonesia*. Oseana, 30 (4) : 19-29.
- Maley, K., and Komasara, L. 2003. VET 120 *introduction to lab animal Science*, Val Macer, diakses dari <http://www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html> [05/02/2015].
- McInnes Iain B.F.R.C.P, and Schett Georg, M.D. 2011. “*Mechanisms of disease the pathogenesis of rheumatoid arthritis*”. The New England Journal of Medicine, 365:2205-19.
- Messonniers, Shawn. 2011. *The Natural Vet’s Guide To Preventing And Treating Arthritis In Dogs And Cats*. Canada. New World Library.
- Mirshafiey A and Mohsenzadegan M. 2008. *The role of reactive oxygen species in immunopathogenesis of rematoid arthritis*. Iran hournal Allergy Asthama immunology, December ;7 (4): 195-202
- Prabowo, S. 2004. *Pengaruh Stresor Dingin Terhadap Proses Keradangan Pada Arthritis Ajuvan: Penelitian Eksperimental Pada Arthritis Ajuvan (Model Hewan Untuk Arthritis Rematoid)*. Tesis. Iptunair J. Pharm.
- Rantam, F.A. 2003. *Metodologi Imunologi*. Airlangga University Press : Surabaya
- Rich R Robet., Thomas A. Fleisher, Benjamin D. Schwartz, William T. Shearer, and Warren Stober. 2008. *Text book of clinnical immunology priciples and practice*. Thirth Ediition. Elsevier, pp: 767-786.
- Ristyana IP. 2013 *Skrining fitokimia dan aktifitas antioksidan ekstrak rumput laut sargassum Duplicatum dan turbinaria ornate dari jepara*. Tesis Fakultas perikanan dan ilmu kelautan Universitas Diponegoro Semarang
- Schett George. 2008. Review : “*Immune cells and mediators of inflammatory arthritis*”. Autoimmunity; 41 (3): 224-229.
- Schuna, A.A., in *Rheumatoid Arthritis*, Dipiro, J.T., Talbert, R.L., Yee, G.C. Matzke, G.R., Wells, B.G. & Posey, L.M., (Eds), 2005, *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*, Sixth Edition, 1671-1683, McGraw Hill, Medical Publishing Division, New York.
- Scott L David, Frederick Wolfe, Tom WJ Haizinga. 2010. “Rheumatoid arthritis”. *Lancet* vol. 376: 1094-1108.
- Shofia, V. 2013. *Studi Pemberian Ekstrak Rumput Laut Coklat (Sargassum prismticum) Terhadap Kadar MDA, Ekspresi iNOS (inducible Nitric Oxigen*



*Synthase) dan Histologi Jaringan Ginjal Terhadap Tikus (Rattus norvegicus) Diabetes Melitus tipe 1.* Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya Malang.

- Snoeck, L. H. E. H., R. N. Cornelussen., Van Nieuwenhoven, R. S. Reneman ., and Van der Vusse. 2001. *Heat shock Protein and Cardiovascular Pathophysiology*. *Physiological Rev* ; 81(4): 1461-85.
- Soenarto. 2006. *Inflamasi*. Dalam Sudoyo, Aru W. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Jilid 2. Edisi 4. Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta
- Suckow, M. A., S.H. Weisbroth and C.I., Franklin. 2006. *The Laboratory Rat*. Elsevier Academic Press. USA.
- Sudoyo, Aru, dkk. 2006. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid III*. Jakarta: Pusat penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Valko, M. C. J. Rhodes, J. Mancol, M. Izakovic, and M. Mazur. 2006. *Free Radicals, Metals and antioksidants in Oxidative Stress-Induced Cencer*. *Chemical Biology Interactive*.
- Walsh, N.P., B.M. Alba, B. Bose, C.A. Gross, and R.T. Sauer. 2003. *OM Peptide Signals Initiate The Envelope Stress Response by Activating DegS Protease Via Relief of Inhibition Mediated by Its PDZ Domain*. *Cell* 113 (1).
- Wilson K. 2000. *Protein and Enzyme Techniques In Practicak Biochemistry*, (ed. Wilson K and Walker JM). Cambridge University Press. P.161-226.
- Winarsi H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius, Yogyakarta; 50-55.
- 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*.
- Zautra, Parrish, Puymbroeck V, Tennen, Davis, Reich and Irwin. 2007. *“Depression history, stress, and pain in rheumatoid arthritis patients”*. *Journal Behaviour Medicine*, 30: 187-197.

