

PENGARUH TERAPI EKSTRAK DAUN TEH HIJAU (*GREEN TEA*) TERHADAP AKTIVITAS SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) DAN GAMBARAN HISTOLOGI TULANG PADA TIKUS ARTRITIS AJUVAN

TUGAS AKHIR

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

oleh:

ABDUL BAR
0310923001-92

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2008

LEMBAR PENGESAHAN TUGAS AKHIR

PENGARUH TERAPI EKSTRAK DAUN TEH HIJAU (*GREEN TEA*) TERHADAP AKTIVITAS SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) DAN GAMBARAN HISTOLOGI TULANG PADA TIKUS ARTRITIS AJUVAN

oleh :
ABDUL BAR
0310923001-92

Setelah dipertahankan didepan Majelis Penguji
pada tanggal
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Dr. drh. Aulanni'am, DES
NIP. 131 759 594

Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes
NIP. 132 300 238

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

M.Farid Rahman, S.Si., M.Si
NIP. 132 158 726



LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Abdul Bar
Nim : 0310923001
Jurusan : Kimia
Penulisan Tugas Akhir berjudul :

**PENGARUH TERAPI EKSTRAK DAUN TEH HIJAU
(GREEN TEA) TERHADAP AKTIVITAS SUPEROKSIDA
DISMUTASE (SOD) DAN GAMBARAN HISTOLOGI
TULANG PADA TIKUS ARTRITIS AJUVAN**

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari Tugas Akhir yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam Tugas Akhir ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata Tugas Akhir 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, Januari 2008
Yang menyatakan,

(Abdul Bar)
NIM. 0310923001-92

PENGARUH TERAPI EKSTRAK DAUN TEH HIJAU (*GREEN TEA*) TERHADAP AKTIVITAS SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) DAN GAMBARAN HISTOLOGI TULANG PADA TIKUS ARTRITIS AJUVAN

ABSTRAK

Arthritis ajuvan merupakan penyakit yang dapat digunakan untuk menjelaskan patomekanisme arthritis rematoid pada manusia, karena arthritis ajuvan memiliki kemiripan histopatologi dengan arthritis rematoid pada manusia. Arthritis ajuvan dapat terjadi melalui injeksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) secara intradermal pada ekor tikus sebanyak 0,1 mL dan pada kedua kaki belakang masing-masing sebanyak 0,05 mL. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh pemberian ekstrak daun teh hijau sebagai antioksidan (AO) nonenzimatik terhadap peningkatan aktivitas superoksida dismutase (SOD) dan perbaikan histologi tulang pada arthritis ajuvan. Aktivitas SOD diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 580 nm. Hewan coba standar untuk arthritis ajuvan adalah tikus putih *Rattus norvegicus* strain wistar. Hewan coba ini dibagi dalam tiga kelompok yaitu (1) kontrol, (2) arthritis ajuvan yang diterapi dengan ekstrak daun teh hijau 2 g/mL dan (3) arthritis ajuvan non terapi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi ekstrak daun teh hijau pada tikus arthritis ajuvan meningkatkan aktivitas SOD dari $(25,8947 \pm 1,9889)$ unit menjadi $(38,3421 \pm 1,1782)$ unit, atau mengalami peningkatan aktivitas SOD sekitar 48,07 %. Terapi ekstrak daun teh hijau juga memperbaiki gambaran histologi tulang pada arthritis ajuvan, hal ini tampak pada keteraturan jaringan histologi tulang sesudah diterapi.



THE INFLUENCE OF GREEN TEA LEAF EXTRACT TO SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) ACTIVITIES AND RAT WITH ADJUVANT ARTHRITIS'S BONE HISTOLOGICAL FEATURE

ABSTRACT

Adjuvant arthritis is a disease which explain patomechanism rheumatoid arthritis in human, because it had histopatologic resemblance with rheumatoid arthritis in human. Adjuvant arthritis occurred by *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) injection intradermally in mice tail 0.1 mL and 0.05 mL in hind paw. The research was carried out to find the effect of green tea extract as non-enzymatic antioxidants (AO) to increase superoxide dismutase (SOD) activities and to improve the bone histological feature of adjuvant arthritis. SOD activities was measured spectrophotometrically at maximum wavelength 580 nm. The animal standard for adjuvant arthritis was *Rattus novergicus* strain wistar, which was devided into three groups were (1) control, (2) adjuvant arthritis treatment with green tea leaf extract 2 g/mL, (3) adjuvant arthritis untreatment. The result showed, that treatment of green tea leaf extract to adjuvant arthritis increased SOD activities from (25.8947 ± 1.9889) unit to (38.3421 ± 1.1782) unit, or it improved of SOD activities about 48,07 %. Treatment with green tea leaf extract improved the bone histological feature of adjuvant arthritis, there is showed at the regulary of bone histological feature after treatment.

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat serta hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tugas akhir yang berjudul **“Pengaruh Terapi Ekstrak Daun Teh Hijau (*Green Tea*) Terhadap Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) dan Gambaran Histologi Tulang Pada Tikus Arthritis Ajuvan”** sebagai salah satu persyaratan dalam memperoleh gelar Sarjana Sains di Bidang Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Tulisan ini menyajikan pokok bahasan yang meliputi manfaat teh hijau sebagai antioksidan yang dapat meningkatkan aktivitas SOD dalam meminimalkan radikal bebas pada arthritis ajuvan. Selain itu dalam tulisan ini juga ditampilkan gambaran histologi tulang tikus kontrol, arthritis ajuvan yang diterapi dengan ekstrak teh hijau dan arthritis ajuvan yang tidak diterapi, yang digunakan sebagai perbandingan dari masing-masing perlakuan.

Penghargaan dan terimakasih yang sebesar-besarnya juga penulis haturkan pada:

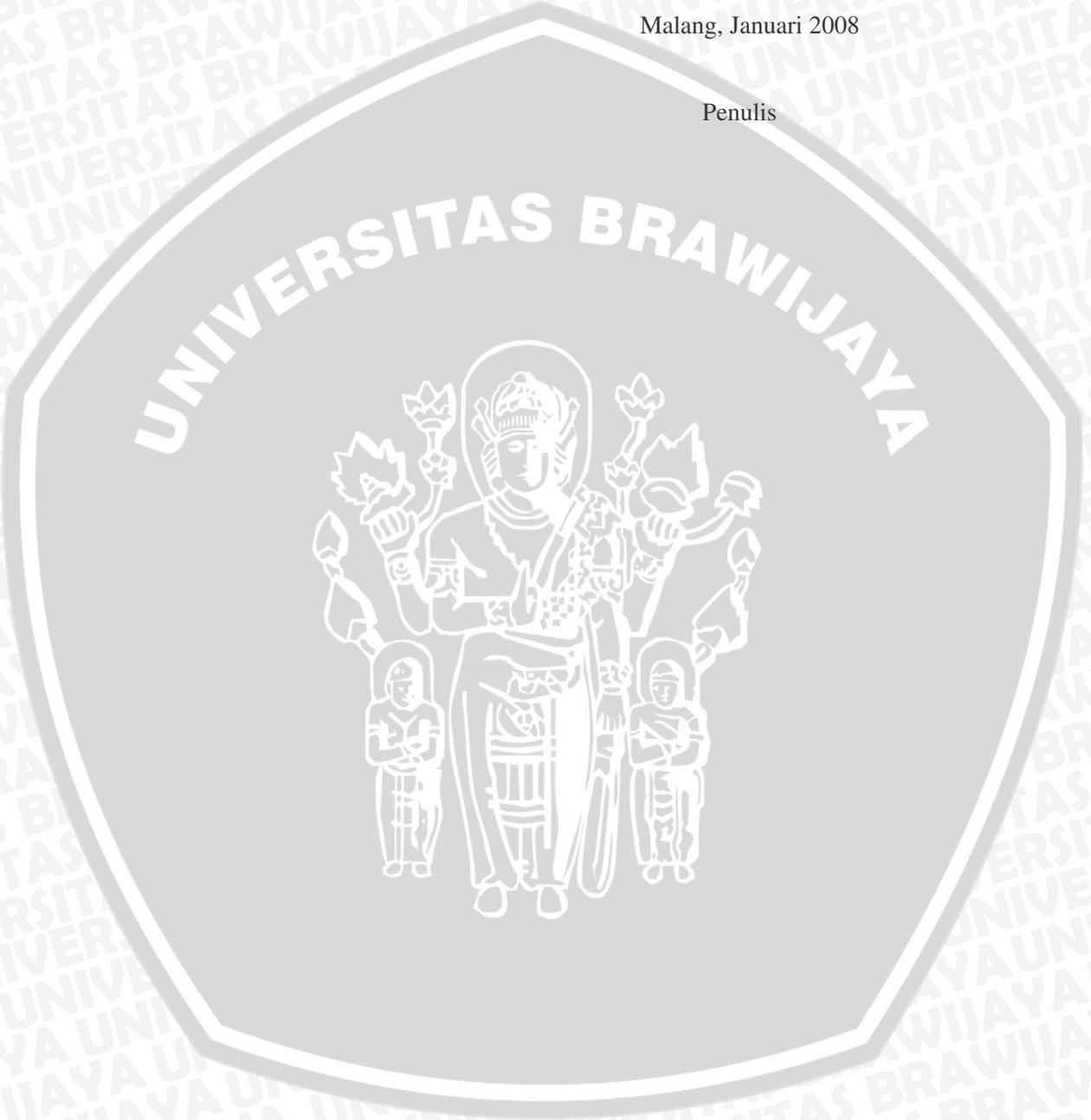
1. Dr. drh. Aulanni'am, DES dan Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes selaku dosen pembimbing I dan II yang telah bersabar untuk meluangkan waktu, tenaga dan pikiran serta memberikan kritik dan masukan dalam penyelesaian tugas akhir ini.
2. Ir. Chanif Mahdi, MS dan Darjito, S.Si, M.Si sebagai dosen penasehat akademik yang telah memberikan semangat serta saran kepada penulis selama masa studi.
3. Dr. Rurini Retnowati, MSi.; Siti Mutrofin, S.Si, M.Sc.; Qonitah Fardiyah, SSi., MSi. dan Ir. Bambang Ismuyanto, MS. selaku dosen penguji atas segala kritik dan saran yang diberikan untuk perbaikan naskah tugas akhir.
4. M. Farid Rahman S.Si, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia beserta seluruh jajaran staf dan karyawan untuk semua motivasi dan bantuannya selama penulis menjalani studi.
5. Dr. dr. Sulis Prabowo, MS yang telah memberikan kesempatan pada penulis dalam melakukan penelitian ini.
6. Bapak dan Ibu serta keluarga yang selalu mencurahkan doa, perhatian serta kasih sayang.

7. Qkn”aY, semua teman dan pihak yang telah memberikan motivasi, doa dan bantuannya dalam penyusunan tugas akhir ini.

Penulis juga menyadari tugas akhir ini tidak lepas dari adanya keterbatasan, kekurangan dan jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu dengan kerendahan hati, penulis mengharap kritik dan saran yang membangun guna perbaikan dan penyempurnaannya sehingga tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Malang, Januari 2008

Penulis



DAFTAR ISI

Teks	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH	xiii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Arthritis Ajuvan.....	5
2.2 Senyawa Oksigen Reaktif (SOR)	6
2.2.1 Radikal Bebas (RB).....	6
2.2.2 Radikal Ion Superoksida ($O_2^{\cdot -}$).....	8
2.3 Antioksidan (AO).....	8
2.4 Superoksida Dismutase (SOD).....	8
2.5 Teh Hijau (<i>Green Tea</i>)	9
2.6 Penentuan Aktivitas SOD secara Spektrofotometri... 11	11
2.7 Metode Pewarnaan Jaringan.....	12
2.7.1 <i>Hematoxylin Eosin (HE)</i>	13
2.7.2 Pewarnaan <i>Lee's</i> (Metalin Biru dan Farsin Basa) .. 13	13
2.7.3 Pewarnaan <i>Malorry Conective tissue</i> (Trikrom mallory).....	13

2.7.4 Metode <i>Periodic acid-Schiff</i> (PAS).....	13
2.8 Hipotesis.....	13

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	15
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	15
3.2.1 Bahan Penelitian.....	15
3.2.2 Bahan Kimia.....	15
3.2.3 Alat Penelitian	15
3.3 Metode Penelitian.....	16
3.4 Cara Kerja.....	16
3.4.1 Preparasi Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i> strain Wistar)	16
3.4.2 Injeksi CFA pada Tikus.....	17
3.4.3 Preparasi Ekstrak Daun Teh Hijau	17
3.4.4 Terapi Ekstrak Daun Teh Hijau	17
3.4.5 Pengambilan Organ	17
3.4.6. Pengukuran Aktivitas SOD	18
3.4.6.1 Pembuatan Kurva Standar SOD	18
3.4.6.2 Pengukuran Aktivitas SOD Sampel	18
3.4.7 Pewarnaan Preparat dengan Metode HE	19
3.5 Analisis Data	19

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Aktivitas SOD Jaringan Periartrikuler pada Tikus Arthritis Ajuvan.....	21
4.2 Pengaruh Ekstrak Daun Teh Hijau Terhadap Aktivitas SOD pada Jaringan Periartrikuler Arthritis Ajuvan.	23
4.3 Pengaruh Ekstrak Daun Teh Hijau Terhadap Gambaran Histologi Tulang pada Periartrikuler Arthritis Ajuvan.	26

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

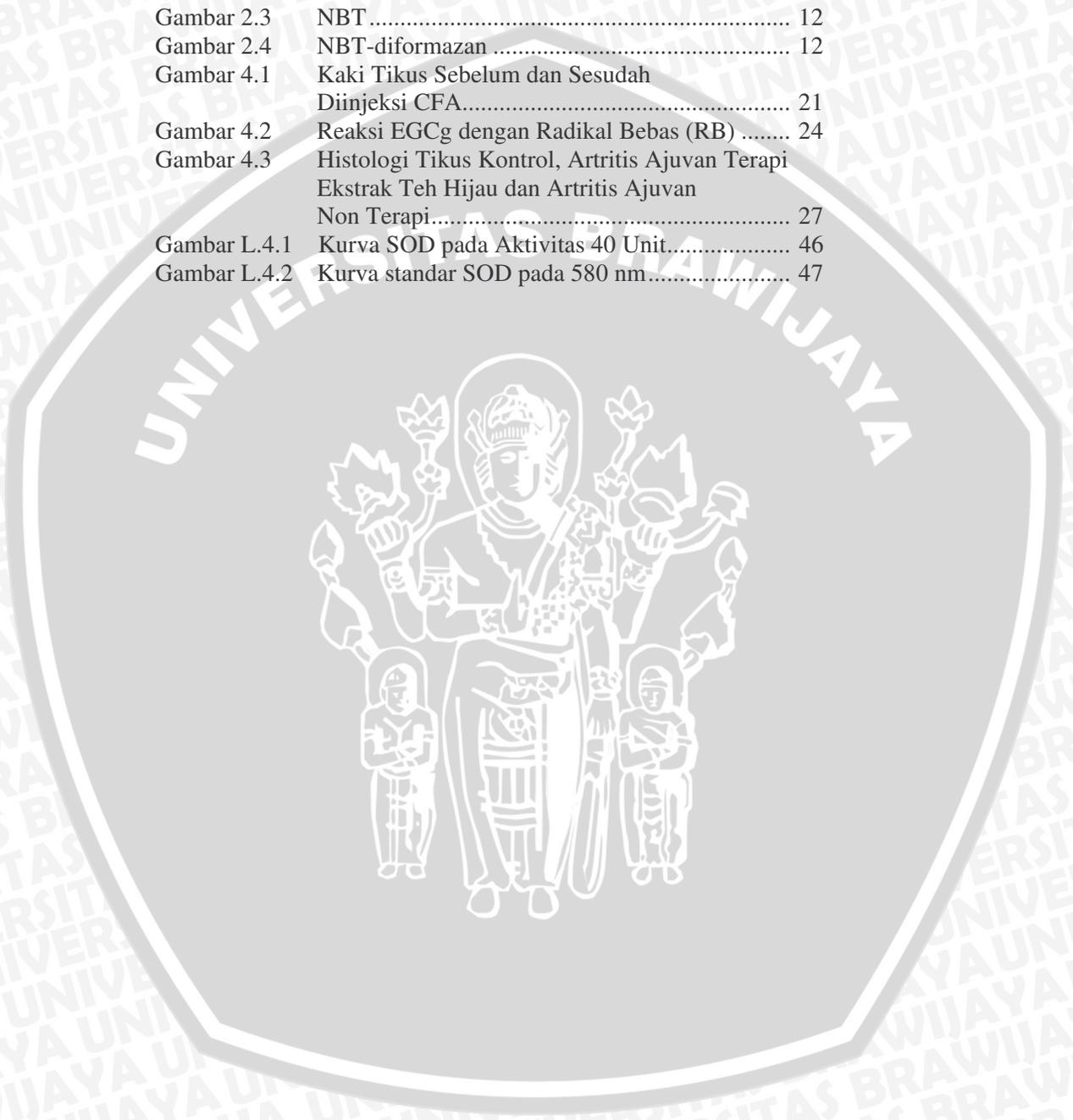
5.1 Kesimpulan.....	29
5.2 Saran.....	29

DAFTAR PUSTAKA	31
----------------------	----

LAMPIRAN	37
----------------	----

DAFTAR GAMBAR

	Teks	Halaman
Gambar 2.1	Struktur Katekin	11
Gambar 2.2	Hubungan antara Xantin Oksidase (XO), O ₂ ^{•-} , SOD dan NBT dalam Pengukuran Aktivitas SOD	11
Gambar 2.3	NBT	12
Gambar 2.4	NBT-diformazan	12
Gambar 4.1	Kaki Tikus Sebelum dan Sesudah Diinjeksi CFA.....	21
Gambar 4.2	Reaksi EGCg dengan Radikal Bebas (RB)	24
Gambar 4.3	Histologi Tikus Kontrol, Arthritis Ajuvan Terapi Ekstrak Teh Hijau dan Arthritis Ajuvan Non Terapi.....	27
Gambar L.4.1	Kurva SOD pada Aktivitas 40 Unit.....	46
Gambar L.4.2	Kurva standar SOD pada 580 nm.....	47



DAFTAR TABEL

	Teks	Halaman
Tabel 2.1	Kandungan Ekstrak Teh Hijau dan Teh Hitam ..	10
Tabel 4.1	Aktivitas SOD antara Tikus Kontrol dan Tikus Artritis Ajuvan.....	22
Tabel 4.2	Aktivitas SOD jaringan periartikuler tikus kontrol, artritis ajuvan terapi ekstrak daun teh hijau dan artritis ajuvan non terapi.....	23
Tabel 4.3	Aktivitas SOD dan Notasi BNT 1%.....	25
Tabel L.4.1	Pengukuran Panjang Gelombang Larutan Standar SOD Untuk Menentukan λ Maksimum.....	46
Tabel L.4.2	Hasil Pengukuran Absorbansi Larutan SOD Standar Pada Panjang Gelombang 540 nm	47
Tabel L.4.3.1	Absorbansi dan Aktivitas SOD Tikus Kontrol...	48
Tabel L.4.3.2	Absorbansi dan Aktivitas SOD Tikus Artritis Ajuvan Terapi	49
Tabel L.4.3.3	Absorbansi dan Aktivitas SOD Tikus Artritis Ajuvan Non Terapi (Tikus Sakit)	49
Tabel L.5.1	Aktivitas SOD Sampel	50
Tabel L.5.2	Analisis Ragam Satu Arah Aktivitas SOD.....	52
Tabel L.5.3	Hasil Uji BNT 1% Aktivitas SOD.....	53



DAFTAR LAMPIRAN

	Teks	Halaman
Lampiran 1	Skema Kerja Penelitian	37
Lampiran 2	Preparasi Larutan	38
Lampiran 3	Diagram Alir	40
Lampiran 4	Data Hasil Penelitian	46
Lampiran 5	Pengolahan Data Hasil Penelitian	48
Lampiran 6	Perhitungan prosentase penurunan dan kenaikan aktivitas SOD pada artritis ajuvan	53



DAFTAR ISTILAH

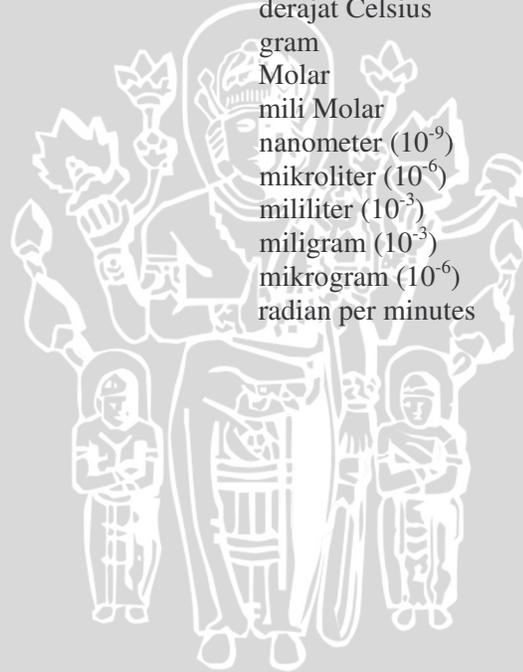
Singkatan/Istilah

SOD
CFA
ECg
EGCg
HE
ROS
ROC
SOR
NBT
UV-Vis
PBS
PFA
pH
BM
XO
RB
AO
°C
g
M
mM
nm
µL
mL
mg
µg
rpm

Keterangan

Superoksida Dismutase
Complete Freund's Adjuvant
Epicatechin gallate
Epigallocatechin gallate
Hematoxylen-Eosin
Reactive Oxygen Species
Reactive Oxygen Compound
Senyawa Oksigen Reaktif
Nitroblue Tetrazoleum
Ultra Violet-Visible
Phospat Buffer Saline
Paraformaldehida
power of Hidrogen
Berat Molekul
Xantin Oksidase
Radikal Bebas
Antioksidan
derajat Celsius
gram
Molar
mili Molar
nanometer (10^{-9})
mikroliter (10^{-6})
mililiter (10^{-3})
miligram (10^{-3})
mikrogram (10^{-6})
radian per minutes

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Artritis rematoid adalah suatu penyakit *autoimun* yang ditandai dengan adanya peradangan tulang sendi yang disertai dengan terjadinya destruksi tulang rawan pada manusia (Maini & Taylor, 2000; Feldmann & Maini, 2001). Sebagian besar penderita artritis rematoid menunjukkan gejala yang kronik, sehingga jika penyakit ini tidak segera diobati maka besar kemungkinan akan menyebabkan kerusakan sendi yang berpotensi pada kecacatan atau kematian prematur (Anonymous, 1996).

Penyakit pada hewan coba standar yang digunakan untuk menjelaskan artritis rematoid pada manusia dinamakan dengan artritis ajuvan (Sakuma *et al.*, 2001). Artritis ajuvan dapat terjadi melalui imunisasi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* yang telah dimatikan dengan pemanasan, pada tikus. Selanjutnya imunisasi tersebut akan menimbulkan peradangan tulang sendi yang mirip pada artritis rematoid. Proses peradangan yang terjadi pada artritis ajuvan diduga akibat adanya peningkatan pembentukan senyawa oksigen reaktif (SOR) yang selanjutnya akan meningkatkan kerusakan jaringan. Dalam tubuh dampak negatif SOR ini dapat diredam dengan adanya senyawa antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), katalase dan GSH (*glutathion peroksidase*). Tetapi bila jumlah antioksidan yang dihasilkan tidak mencukupi, maka akan terjadi stres oksidatif yang mengakibatkan kerusakan DNA, lemak dan protein. Di dalam laboratorium, kerusakan jaringan artritis ajuvan ini (terutama jaringan sekitar sendi/ jaringan periartikuler) dapat dilihat di bawah mikroskop dengan menggunakan metode pewarnaan *hematoxylin eosin* (HE). Kerusakan jaringan ini akan ditunjukkan oleh gambaran histologi tulang artritis ajuvan yang tidak teratur.

SOD merupakan antioksidan enzimatik yang diproduksi oleh tubuh. Di dalam tubuh, SOD bertugas untuk mereduksi radikal anion superoksida ($O_2^{\cdot -}$) menjadi oksidan yang kurang reaktif yaitu hidrogen peroksida (H_2O_2) (Beckman *et al.*, 1988). Namun untuk mengantisipasi terjadinya penumpukan SOR yang berlebih, maka

perlu diberikan antioksidan tambahan yang bersifat nonenzimatik (tidak diproduksi dalam tubuh), salah satunya adalah teh. Menurut Herawati (2004) di dalam teh terdapat senyawa katekin yang merupakan salah satu jenis senyawa polifenol. Ada 6 jenis katekin utama yang terdapat didalam teh, diantaranya adalah katekin, epikatekin, galokatekin, epikatekin galat, epigalokatekin, dan epigalokatekin galat. Epigalokatekin galat memiliki komponen sebagai antioksidan 25 kali lebih efektif dibandingkan vitamin E dan 100 kali lebih efektif daripada vitamin C dalam melindungi sel DNA dari kerusakan akibat kanker, penyakit jantung dan penyakit lainnya.

Levites *et al.*, (2002) menyebutkan bahwa teh hijau memiliki kandungan antioksidan yang sangat tinggi yaitu berupa senyawa polifenol. Pada dasarnya semua jenis teh mengandung polifenol, namun akibat proses pengolahan teh yang terjadi di dalam pabrik menyebabkan kandungan polifenolnya berkurang. Teh hijau merupakan jenis teh yang pengolahannya tanpa melewati proses yang panjang seperti proses fermentasi, penggulungan dan lain sebagainya, sehingga besarnya kandungan senyawa bioaktif (terutama senyawa polifenol) tetap terjaga. Berdasarkan proses pengolahannya, urutan jenis teh yang memiliki kandungan senyawa polifenol terbesar adalah teh hijau, teh oolong dan teh hitam (Higdon, 2002).

Berdasarkan informasi di atas maka perlu dilakukan penelitian sebagai bentuk upaya penanganan dini terhadap penderita artritis rematoid, yaitu dengan pemberian ekstrak teh hijau pada artitis ajuvan yang diharapkan dapat meredam dampak negatif SOR pada peradangan dan selanjutnya dapat meningkatkan aktivitas SOD.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka, permasalahan yang akan dibahas dalam penelitian ini adalah:

1. Sejauh mana terapi ekstrak daun teh hijau dapat meningkatkan aktivitas SOD pada artritis ajuvan ?
2. Sejauh mana terapi ekstrak daun teh hijau dapat memperbaiki gambaran histologi tulang pada artritis ajuvan melalui metode *Hematoxylin Eosin* (HE)?

1.3 Batasan Masalah

1. Hewan coba yang digunakan sebagai model artritis rematoid adalah tikus wistar (*Rattus norvegicus* strain wistar) usia 10-12 minggu yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler, Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.
2. Artritis ajuvan dibuat dengan injeksi CFA secara intradermal, dengan dosis 0,1 mL pada ekor dan 0,05 mL pada tiap kaki belakang.
3. Daun teh yang digunakan merupakan daun teh *Camellia sinensis* yang diperoleh dari perkebunan teh Wonosari Lawang Malang, yang diekstraksi menggunakan metode maserasi (perendaman dan pemanasan) dengan menggunakan pelarut air.
4. Dosis ekstrak daun teh hijau yang diberikan adalah 2 g/mL, selama 14 hari.
5. Aktivitas SOD jaringan periartikuler diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 580 nm.
6. Gambaran histologi tulang tikus artritis ajuvan diamati menggunakan metode pewarnaan *hematoxylin eosin* (HE).

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun teh hijau terhadap aktivitas SOD jaringan periartikuler dan gambaran histologi tulang pada artritis ajuvan.

1.5 Manfaat Penelitian

Melalui penelitian ini diharapkan dapat diperoleh informasi tentang sejauh mana pemberian ekstrak daun teh hijau (*green tea*) dapat mempengaruhi aktivitas SOD jaringan periartikuler pada artritis ajuvan dalam menghambat aktivitas radikal $O_2^{\cdot -}$ yang menyebabkan peradangan, sehingga dapat digunakan untuk kepentingan di bidang kesehatan dalam penanganan penderita artritis rematoid.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Arthritis Ajuvan

Arthritis ajuvan merupakan suatu penyakit yang dapat digunakan untuk menjelaskan arthritis rematoid pada manusia, karena arthritis ajuvan memiliki kemiripan histopatologik dengan arthritis rematoid (Sakuma *et al.*, 2001). Arthritis rematoid dikenal sebagai penyakit autoimun yang identik dengan peradangan pada tulang sendi. Penyakit autoimun ini terjadi disebabkan karena sistem imun yang tidak normal, sehingga secara tidak langsung sistem imun tersebut dapat meyerang jaringan tubuh yang dianggap sebagai benda asing. Akibatnya, tulang sendi dapat mengalami peradangan yang berakibat pada terjadinya destruksi tulang dan tulang rawan dengan akibat deformitas sendi (Anonymous, 1996).

Arthritis ajuvan dapat terjadi melalui imunisasi dengan *Complete Freund's adjuvant* (CFA) yang merupakan *Mycobacterium tuberculosis* yang telah dimatikan dan disuspensikan dalam minyak mineral. Pada arthritis ajuvan terjadi peradangan sendi yang mirip dengan peradangan pada arthritis rematoid, yaitu terjadi radang pada membran sinovial, pembentukan panus, dan bahkan terjadi destruksi tulang dan tulang rawan (Banik *et al.*, 2002; Golsby *et al.*, 2000).

Prabowo (2002) menunjukkan bahwa bila tikus wistar jantan yang berumur 10-12 minggu, diinjeksi intradermal pada sepertiga distal ekor dengan menggunakan *Complete Freund's Ajuvant* (CFA), maka sebagian besar tikus akan menunjukkan gejala arthritis ajuvan setelah 14 hari.

Kerusakan sendi pada arthritis ajuvan sama halnya dengan kerusakan sendi pada arthritis rematoid, yaitu diawali melalui pembentukan ikatan antara jaringan sinovial dan tulang rawan. Akibatnya terjadi pertumbuhan jaringan sinovial yang berlebihan dan mengalami peradangan. Jaringan yang tumbuh secara berlebihan ini disebut dengan panus. Panus banyak mengandung sel-sel sistem imun yang berperan pada peradangan, seperti neutrofil dan makrofag. Makrofag dikenal sebagai sel radang yang dapat menghasilkan radikal bebas seperti O_2^{\bullet} , H_2O_2 dan juga NO^{\bullet} .

(Anonymous^(a), 2002; Kavanaugh dan Lipsky, 1999; Halliwell dan Gutteridge, 1999).

Adanya radikal-radikal inilah kemudian pembengkakan sendi pada artritis ajuvan semakin kronik, meskipun pada dasarnya di dalam cairan sinovial terdapat antioksidan enzimatis seperti enzim katalase, GSH (*glutathione peroxidase*) dan SOD, namun jumlahnya sangat sedikit sehingga tidak dapat menetralkan radikal-radikal tersebut. Akibatnya peradangan tetap terus berlangsung dan akan semakin kronik jika tidak segera ditangani (Halliwell and Gutteridge, 1999).

2.2 Senyawa Oksigen Reaktif (SOR)

2.2.1 Radikal Bebas (RB)

RB merupakan suatu senyawa yang mengandung elektron tidak berpasangan (*unpaired electron*) pada orbital terluarnya. Adanya elektron tak berpasangan inilah yang menyebabkan sebagian besar RB tidak stabil (memiliki energi yang relatif tinggi) (Halliwell, 1991 ; Widodo, 1997). Selain itu, adanya elektron menyendiri ini mengakibatkan senyawa RB memiliki kecenderungan untuk menarik elektron dari molekul yang lain dan sangat reaktif. Sehingga jika RB ini diproduksi dalam tubuh maka akan menyebabkan kerusakan Sel (Subandi, 1999).

Secara fisik, RB dan oksidan merupakan senyawa yang memiliki kemiripan sifat. Aktivitas dari kedua senyawa ini memberikan dampak yang sama, meskipun prosesnya berbeda. Dari persamaan sifat serta dampak aktivitas itulah kemudian pengertian keduanya sering dibaurkan. Namun jika dipandang dari Ilmu Kimia, keduanya haruslah dibedakan (Tjokroprawiro1993).

Menurut Tjokroprawiro (1993), oksidan berarti senyawa penerima elektron (*acceptor electron*) atau senyawa yang dapat menarik elektron. Sedangkan RB merupakan senyawa yang memiliki elektron tak berpasangan (*unpaired electron*) (Halliwell, 1991). Senyawa oksidan non radikal tidak memiliki elektron yang tak berpasangan (Tjokroprawiro, 1993).

Oksidan-oksidan tersebut sering disebut sebagai senyawa oksigen reaktif (SOR atau *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) atau *Reactive Oxygen Compound* (ROC)). Senyawa oksigen reaktif

(SOR) ini terbagi menjadi 2 spesies yaitu SOR radikal dan SOR non radikal. SOR radikal yang sering dijumpai biasanya berbentuk radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$), radikal peroksil ($\bullet\text{OOH}$), dan radikal ion superoksida ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Sedangkan SOR yang berbentuk non radikal adalah hidrogen peroksida (H_2O_2) dan anion hipoklorit (OCl^-) (Anonymous^(b), 2006).

RB lebih berbahaya dibandingkan dengan oksidan non radikal. Hal ini disebabkan karena RB memiliki kecenderungan menarik elektron sehingga reaktivitasnya sangat tinggi, dan RB juga dapat mengubah senyawa non radikal menjadi radikal. Akibatnya, RB dapat memicu terjadinya reaksi berantai (*chain reaction*) (Suryohudoyo, 1997).

Menurut Halliwel (1991) dan Widodo (1995), reaksi yang terjadi pada RB merupakan reaksi bertahap yang terbagi menjadi 3 tahap yaitu inisiasi, propagasi dan terminasi. Tahap pertama (inisiasi) adalah reaksi pembentukan RB melalui reaksi oksidasi reduksi dan homolitik *ficssion*. Pada tahapan propagasi terjadi reaksi rantai melalui penarikan elektron atom hidrogen oleh senyawa radikal. Sedangkan pada tahap terminasi, terjadi reaksi yang menghasilkan RB yang sifatnya kurang reaktif (lebih stabil) sehingga reaksi terhenti (terminasi).

Jika RB bereaksi dengan senyawa lain yang bukan merupakan radikal maka akan terjadi dua kemungkinan. Pertama, senyawa radikal akan memberikan elektron tak berpasangannya atau kemungkinan yang kedua adalah justru senyawa radikal bebas mengambil/ menarik elektron molekul non radikal. Hal ini dapat mengakibatkan reaksi berantai yang panjang dan menyebabkan efek biologi yang jauh dari tempat asal pembentukan RB tersebut (Halliwel, 1991 ; Widodo, 1995), misalnya seperti reaksi rantai yang dipicu oleh radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$) (Suryohudoyo, 1997):

1. Tahap Inisiasi



2. Tahap Propagasi



3. Tahap Terminasi



$R2\bullet + R2\bullet$

$R2 - R2$, dan seterusnya

Pada artritis ajuvan, adanya senyawa RB ini dapat memicu pembentukan antibodi, dengan cara memodifikasi agregat protein yang mengaktifkan sel fagositosis dan menyebabkan peradangan (Simonini *et al.*, 2001).

2.2.2 Radikal Ion Superoksida ($O_2^{\bullet -}$)

Radikal superoksida ($O_2^{\bullet -}$) merupakan ROS yang dihasilkan akibat adanya penambahan satu elektron pada molekul oksigen (O_2). Secara normal RB ini diproduksi di dalam tubuh melalui proses enzimatik maupun non enzimatik seperti elektron transport di mitokondria, reaksi hidrolasi pada retikulum endoplasma, reaksi xantin oksidase pada pembentukan urate, auto oksidasi retikulum endoplasma dan auto oksidasi katekolamine, yang semuanya merupakan proses biokimia yang penting untuk kelangsungan proses fisiologis tubuh (Widodo, 1995).

2.3 Antioksidan (AO)

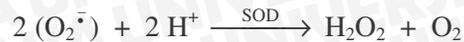
Sifat reaktif dari RB sering kali menyebabkan kerusakan fungsi fisiologis pada tubuh makhluk hidup (khususnya manusia). Namun aktivitas RB yang menyebabkan kerusakan tersebut dapat dikurangi dengan adanya sistem proteksi. Sistem proteksi radikal ini dapat berupa sistem proteksi enzimatik (*free radical scavenger / FRS*) dan sistem proteksi non enzimatik, yang keduanya sering disebut sebagai antioksidan (AO). Suatu AO dapat dikatakan meminimalisir aktivitas spesies radikal jika AO tersebut mampu menghambat terjadinya propagasi RB dan mendetoksifikasi RB yang terbentuk (Maestro, 1991).

2.4 Superoksida Dismutase (SOD)

Superoksida dismutase (SOD) merupakan salah satu AO enzimatik yang diproduksi di dalam tubuh, yang berfungsi untuk menangkal SOR, khususnya menangkal adanya senyawa superoksida ($O_2^{\bullet -}$). SOD ditemukan pada tahun 1969, yang mendorong adanya

penelitian mengenai keseimbangan oksidan dan antioksidan yang berakibat pada terjadinya stress oksidatif (Anggarini, 2006).

Enzim SOD memiliki efek dapat mereduksi radikal ion superoksida ($O_2^{\bullet -}$), seperti yang ditunjukkan pada reaksi dibawah ini (Maestro, 1991):



Hydrogen peroksida yang terbentuk memungkinkan terjadinya inaktivasi SOD. Namun, inaktivasi SOD tidak akan terjadi selama jumlah RB yang ada bisa ditanggulangi oleh AO enzimatik yang lain (seperti katalase dan GSH (*glutathion peroksidase*)) atau AO nonenzimatik yang diperoleh dari luar tubuh. Kerjasama antar AO tersebut menyebabkan oksidan yang berada di dalam tubuh dapat dipertahankan konsentrasinya dalam tingkat yang dapat diterima, sehingga tidak sampai menimbulkan kerusakan terhadap jaringan tubuh (Subandi, 1999).

2.5 Teh Hijau (*Green Tea*)

Tanaman teh berasal dari negeri Cina, tanaman ini dapat tumbuh dengan baik di daerah tropis dan sub tropis, seperti India, Jepang, Kenya, Turki, dan Indonesia. Berdasarkan klasifikasi tumbuhan, tanaman teh tergolong kedalam (Anonim^(a), 2006):

Kingdom	: Plantea
Divisio	: Spermatophyta	
Sub divisio	: Angiospermae	
Klas	: Dicotyledone	
Ordo	: Guttiferales	
Familia	: Theaceae	
Genus	: Camellia	
Spesies	: Camellia sinensis	

Teh secara tradisional terbagi menjadi empat kelompok menurut teknik pembuatannya, antara lain teh hijau, hitam, putih dan oolong. Pada hakekatnya tanaman dari keempat jenis teh tersebut adalah sama, hanya saja yang membedakan adalah proses produksinya (Anonim^(c), 2007):

1. Teh hijau: daun teh yang dijadikan teh hijau biasanya langsung dikeringkan setelah dipetik, sehingga kandungan

bioaktif yang terkandung di dalamnya lebih banyak dan alami.

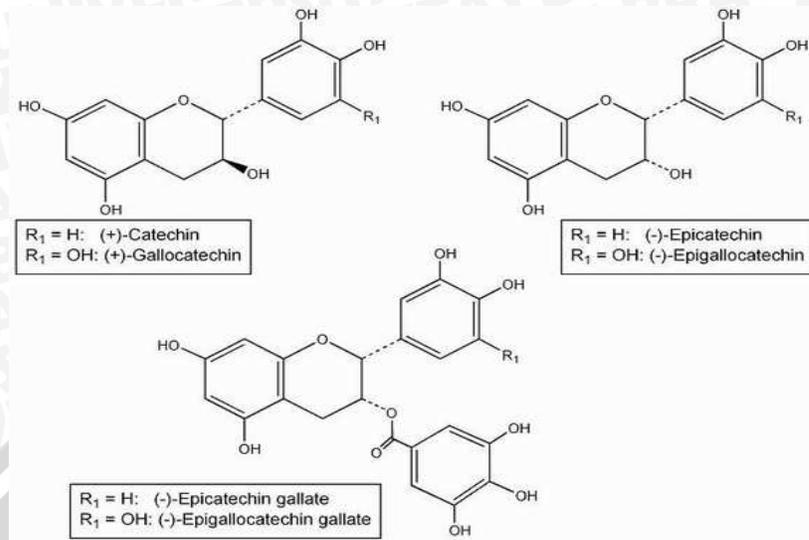
2. Teh hitam: jenis teh yang mengalami proses fermentasi terlebih dahulu pada daun teh selama 2 minggu sampai 1 bulan.
3. Teh putih: teh yang dibuat dari daun teh yang tidak mengalami oksidasi dan sebelum dipetik dilindungi dari sinar matahari untuk menghalangi pembentukan klorofil. Namun jenis teh ini jarang dijumpai karena proses produksinya yang relatif sulit.
4. Oolong: proses oksidasi dihentikan di tengah-tengah antara teh hijau dan teh hitam yang bisa memakan waktu 2-3 hari.

Kandungan senyawa aktif biologi yang terkandung di dalam masing-masing jenis teh juga berbeda. Melalui pengukuran HPLC dapat diketahui bahwa kandungan katekin ekstrak teh hijau dan ekstrak teh hitam memiliki perbedaan yang signifikan seperti yang ditunjukkan Tabel 2.1 (Princen, H.M.G., *et al*, 1998):

Tabel 2.1 Kandungan katekin ekstrak teh hijau dan teh hitam

mg/g	Teh Hijau (mg/g)	Teh Hitam (mg/g)
Total katekin	289,9	80,0
Katekin	3,6	2,6
Gallokatekin	19,5	2,4
Gallokatekin gallat	26,0	0,0
Epikatekin	28,4	21,2
Epikatekin gallat	24,4	20,8
Epigallokatekin	79,0	8,3
Epigallokatekin gallat	103,0	24,7
Flavonol	20,8	17,4
Theaflavin	0,0	11,4

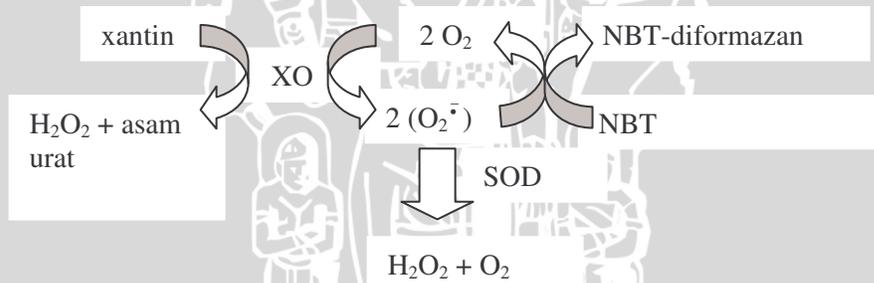
Adapun struktur kimia dari katekin dan turunannya adalah (Derrida, 1997):



Gambar 2.1 Struktur Katekin

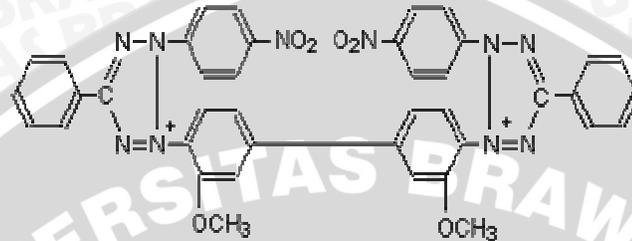
2.6 Penentuan Aktivitas SOD secara Spektrofotometri

Aktivitas SOD dapat diukur melalui reaksi dismutasi ion superoksida menjadi O_2 dan H_2O_2 , dengan melibatkan suatu indikator *nitroblue tetrazolium*. Seperti yang diilustrasikan pada mekanisme dibawah ini (Anonymous^(b), 2002):

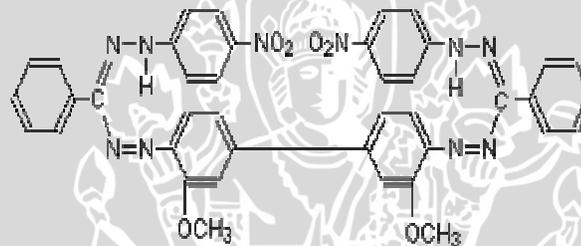


Gambar 2.2 Hubungan antara xantin oksidase (XO), $O_2^{\cdot-}$, SOD dan NBT dalam pengukuran aktivitas SOD

Xantin dan oksigen jika dikatalisis oleh XO maka akan menghasilkan radikal ion superoksida ($O_2^{\cdot -}$), asam urat dan H_2O_2 . Radikal ion superoksida yang dihasilkan kemudian didismutasi oleh SOD menjadi O_2 dan H_2O_2 . Tetapi tidak semua $O_2^{\cdot -}$ berhasil didismutasi oleh SOD, sehingga memungkinkan terjadinya reduksi terhadap NBT menjadi NBT-diformazan (berwarna biru) yang dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 560 nm. Perbedaan antara NBT dan NBT-diformazan akan ditunjukkan Gambar 2.3 dan Gambar 2.4 (Anonymous, 2005):



Gambar 2.3 Nitroblue Tetrazolium (NBT)



Gambar 2.4 Nitronblue Tetrazolium-diformazan (NBT-diformazan)

2.7 Metode Pewarnaan Jaringan

Pewarnaan jaringan biasanya dilakukan untuk memberikan warna yang kontras agar mempermudah pengamatan jaringan dibawah mikroskop. Pada saat ini ada beberapa jenis metode

pewarnaan yang sering digunakan dalam melakukan pengamatan jaringan suatu organisme, yaitu (Anonymous^(d), 2007)

2.7.1 Hematoxylin-Eosin (HE)

Hematoxylin eosin (HE) merupakan salah satu metode pewarnaan yang sering digunakan untuk mengetahui histologi atau anatomi suatu jaringan. Metode HE juga sering digunakan untuk mengetahui kerusakan jaringan akibat inflamasi dan juga dapat digunakan untuk menentukan integritas suatu jaringan (Anonymous^(b), 2007).

Hematoxylin merupakan pewarna yang bersifat basa, dimana berupa garam dari basa-basa pembawa warna dengan radikal asam yang tidak berwarna, yang akan mewarnai bagian inti sel yang bersifat basa dengan warna ungu. Sedangkan *eosin* adalah zat warna yang bersifat asam yang dapat memberikan warna merah pada sitoplasma sel yang bersifat asam (Suntoro, 1983).

2.7.2 Pewarnaan Lee's (metalun biru dan farsin basa)

Metode pewarnaan ini juga sering digunakan untuk mengamati jaringan dalam berbagai tujuan. Warna yang ditimbulkan dari metode ini hampir sama dengan pewarnaan pada metode HE, yaitu memberikan warna biru pada inti sel dan warna merah/ merah muda pada sitoplasma, hanya saja metode ini lebih cenderung digunakan untuk mewarnai jaringan otot.

2.7.3 Pewarnaan Mallory Connective Tissue (trikrom mallory)

Metode pewarnaan yang digunakan untuk membedakan serat-serat yang menyukai asam (*acidophilic*) di luar sel dengan *acidophilic* yang berada pada sitoplasma.

2.7.4 Metode Periodic Acid-Schiff (PAS)

Metode pewarnaan ini digunakan untuk melihat struktur yang kaya pada makromolekul karbohidrat, seperti glikogen, glikoprotein dan proteoglikan. Metode ini bergantung pada oksidasi selektif oleh *periodic acid* dari gugus hidroksil bebas yang mengubah alkohol menjadi aldehida. Selanjutnya, aldehida yang

terbentuk akan terdeteksi oleh reagen *schiff* yang menghasilkan warna ungu kemerah-merahan.

2.8 Hipotesis

1. Terapi ekstrak daun teh hijau dapat meningkatkan aktivitas SOD jaringan periartikuler artritis ajuvan dalam mereduksi radikal ion superoksida ($O_2^{\cdot -}$).
2. Terapi ekstrak daun teh hijau dapat memperbaiki gambaran histologi tulang artritis ajuvan.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2006 hingga bulan Maret 2007 di Laboratorium Biokomia Jurusan Kimia, Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler Jurusan Biologi FMIPA, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran, Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan sebagai hewan coba adalah tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus strain wistar*) dengan rentang usia 10–12 minggu dan berat 130–150 g yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang, dan daun teh spesies *Camellia sinensis* yang diperoleh dari perkebunan teh Wonosari Lawang Malang.

3.2.2 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah: akuades, CFA (*Complete Freund's Adjuvant*), NaCl, KCl, KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, EDTA, xantin, xantin oksidase, *Nitroblue tetrazolium* (NBT), formaldehid 37 % (% v/v) dan SOD assay kit.

3.2.3 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: bak pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat bedah, mortar, botol semprot, seperangkat alat gelas, kertas saring, penangas air, tabung polipropilen, *vacutainer*, mikropipet, *blue* dan *yellow tip*, *gavage*, tabung mikrotube *ependorf* 1,5 mL dan rak tabung, alumunium foil, botol sampel, sentrifuge *EBA III*, pHmeter Schott Gerate CG 820,

neraca analitik, *autoclav* model No.25X , inkubator, spektrofotometer UV-Vis *Shimadzu*.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil. Menurut Narbuko (1997), metode eksperimen bertujuan untuk mengetahui kemungkinan adanya hubungan sebab akibat dengan cara mengenakan pada suatu kelompok percobaan, satu atau lebih kondisi perlakuan dan membandingkan hasilnya dengan suatu kelompok yang tidak dikenai kondisi perlakuan (kontrol).

Rancangan penelitian yang digunakan merupakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dimana parameter perlakuannya adalah penentuan aktivitas SOD jaringan periartikuler.

3.4 Cara Kerja

Tahapan-tahapan kerja yang dilakukan dalam penelitian ini adalah:

1. Preparasi hewan coba
2. Injeksi CFA pada hewan coba
3. Preparasi ekstrak teh hijau
4. Terapi ekstrak teh hijau
5. Pengambilan organ
6. Pengukuran aktivitas SOD
7. Pewarnaan preparat dengan metode HE

3.4.1 Preparasi Tikus Putih (*Rattus novergicus strain Wistar*)

Preparasi hewan coba tikus putih (*Rattus novergicus strain Wistar*) dilakukan selama seminggu sebelum dikenakan perlakuan, agar hewan coba dapat beradaptasi di dalam laboratorium. Selanjutnya, tikus dibagi dalam tiga kelompok yang masing-masing terdiri dari 10 ekor, yaitu: (1) kelompok kontrol yaitu tikus yang tidak mendapat perlakuan apapun, (2) kelompok tikus arthritis ajuvan yang diterapi dengan ekstrak daun teh hijau dengan dosis 2 g/mL, (3) kelompok tikus arthritis ajuvan yang tidak mendapat terapi ekstrak daun teh hijau (sakit).

3.4.2 Injeksi CFA pada Tikus

Injeksi CFA dilakukan pada kelompok tikus (2) dan (3). Kedua kelompok tikus tersebut diinjeksi CFA 0,1 mL secara intradermal pada bagian ekor. Setelah 14 hari, kedua kelompok tikus tersebut kembali diinjeksi dengan CFA 0,05 mL pada tiap-tiap kaki bagian belakang. Selanjutnya, tujuh hari kemudian akan muncul gejala arthritis ajuvan yang ditandai dengan adanya peradangan pada kedua kaki bagian belakang tersebut.

3.4.3 Preparasi Ekstrak Daun Teh Hijau

Daun teh segar ditimbang 20 g dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* yang telah berisi 100 mL akuades. Selanjutnya daun teh direbus pada temperatur 80 °C hingga air rebusan menjadi ± 3 mL. Ekstrak daun teh kemudian disaring menggunakan kertas saring dan daun tehnya diperas menggunakan kertas saring untuk mengeluarkan ekstrak yang tertinggal pada daun teh. Ekstrak yang diperoleh lalu direbus kembali hingga volume ekstrak menjadi ± 10 mL.

3.4.4 Terapi Ekstrak Daun Teh Hijau

Terapi ekstrak teh hijau dilakukan pada kelompok tikus (2). Setiap tikus diterapi dengan ekstrak daun teh hijau sebanyak 2 g/mL dengan menggunakan *gavage* selama 14 hari.

3.4.5 Pengambilan Organ

Pengambilan organ hewan coba dilakukan dengan cara melakukan pembedahan pada tikus. Tikus dibuat tidak sadar dengan cara didislokasi bagian leher, selanjutnya dilakukan pengambilan organ-organ yang dibutuhkan. Organ tubuh yang digunakan sebagai bahan analisis adalah kaki kiri bagian belakang. Setelah dipotong, organ dicuci dengan larutan PBS kemudian dimasukkan dalam botol sampel yang telah berisi larutan PBS dan disimpan dalam *refrigerator*. Sedangkan organ yang digunakan untuk preparat HE adalah kaki tikus bagian kanan belakang dan kaki tikus bagian kanan depan (hanya pada satu tikus untuk setiap kelompok tikus). Organ yang

diambil kemudian dicuci dengan larutan PBS dan disimpan pada larutan PFA 4 %.

3.4.6 Pengukuran Aktivitas SOD

3.4.6.1 Pembuatan Kurva Standar SOD

Kit SOD dengan konsentrasi 2,5,10,20,30,40,50,60,70 dan 80 unit diambil masing-masing 500 μL , dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda. Masing-masing tabung reaksi ditambahkan EDTA 20 mM, NBT 25 unit, xantin 25 mM, xantin oksidase 1 unit masing-masing 100 μL , campuran larutan tersebut kemudian ditambahkan larutan PBS pH 7,4 dan divortex. Larutan tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 35 $^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit. Setelah itu, didinginkan pada suhu ruang. Kit SOD dengan konsentrasi 40 unit diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada range panjang gelombang 500-700 nm untuk menentukan panjang gelombang maksimum SOD. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh kemudian digunakan untuk mengukur absorbansi larutan standar SOD dan absorbansi sampel.

3.4.6.2 Pengukuran Aktivitas SOD Sampel

Organ tikus, kaki kiri bagian belakang dikuliti dan diambil jaringan periartikuler (jaringan disekitar sendi). Sebanyak 100 mg jaringan periartikuler dimasukkan dalam mortar, digerus sampai halus dan ditambah dengan 1 mL PBS pH 7,4. Homogenat kemudian dimasukkan kedalam tabung propilen dan disentrifugasi 4000 rpm pada suhu 4 $^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh kemudian diambil sebanyak 500 μL . Selanjutnya ditambah dengan EDTA mM, NBT 25 unit, xantin 25 mM, xantin oksidase 1 unit masing-masing 100 μL , kemudian campuran larutan tersebut ditambah larutan PBS pH 7,4 dan dihomogenkan dengan vortex. Setelah itu diinkubasi pada suhu 35 $^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit dan didinginkan pada suhu ruang. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit pada suhu kamar. Supernatan diambil dan disaring menggunakan kertas saring, hasil saringan tersebut kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Selanjutnya supernatan diambil dan diukur

absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yaitu 580 nm.

3.4.7 Pewarnaan preparat dengan metode HE

Metode HE merupakan metode pewarnaan yang digunakan untuk melihat kerusakan tulang pada arthritis ajuvan. Langkah pertama yang harus dilakukan adalah mendeparafinasi preparat menggunakan xilol selama 5 menit dan diulang sebanyak tiga kali. Selanjutnya preparat dimasukkan kedalam etanol absolut selama 5 menit dan diulang sebanyak 3 kali. Setelah itu dimasukkan kedalam etanol bertingkat (95 %, 90 %, 80 %, dan 70 % (% v/v)) secara berurutan masing-masing selama 5 menit dan direndam dalam akuades selama 5 menit. Pewarnaan yang pertama adalah menggunakan *hematoxylin* selama 10 menit atau sampai didapatkan hasil yang terbaik. Setelah itu dilakukan pencucian dengan air mengalir dan direndam dengan akuades selama 5 menit. Pewarnaan kedua menggunakan *eosin* yang dilakukan selama 5 menit. Setelah itu direndam dengan akuades sampai tidak ada *eosin* yang berlebih. Preparat yang hampir jadi ini kemudian direndam dengan etanol bertingkat (70 %, 80 %, 90 % dan 95 %) masing-masing selama 10 menit dan selanjutnya direndam dengan etanol absolut selama 5 menit dan diulang sampai tiga kali. Setelah itu preparat dimasukkan dalam xylol selama 5 menit dan diulang sampai tiga kali. Dan langkah terakhir adalah preparat dikering-anginkan dan dimounting menggunakan entellan serta ditutup menggunakan cover glass. Preparat HE yang telah jadi kemudian diamati penampakan histologinya dibawah mikroskop cahaya.

3.5 Analisis Data

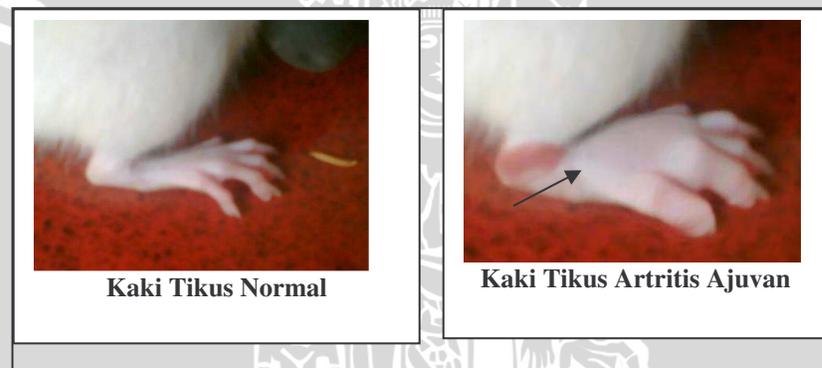
Data aktivitas SOD diperoleh dari kelompok kontrol, kelompok arthritis ajuvan terapi ekstrak teh hijau 2 g/mL dan kelompok arthritis ajuvan yang tidak diterapi. Selanjutnya data dianalisa dengan analisis ragam satu arah dengan selang kepercayaan 99 % dan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) 1 %.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Aktivitas SOD Jaringan Periartrikuler pada Tikus Arthritis Ajuvan

Tikus arthritis ajuvan yang dibuat dengan cara injeksi CFA pada kaki bagian belakang akan menyebabkan peradangan pada jaringan periartrikuler bagian kaki tersebut. Hal ini disebabkan karena CFA merupakan emulsi antigen yang dapat merangsang sistem imun, dan mendorong terjadinya proses autoimun (Anonymous^(a), 2007).

Proses autoimun ini diduga karena adanya respon dari sitokin yang merupakan mediator serta pengatur reaksi imun dan inflamasi, terhadap rangsangan mikroba dan antigen lain. Pada arthritis ajuvan diduga terdapat ketidakseimbangan jumlah sitokin yang diproduksi di tempat peradangan. Sitokin yang juga berperan dalam aktivasi sel-sel imun seperti, sel T, sel B, monosit, neutrofil dan makrofag dapat memacu sel-sel tersebut (terutama neutrofil dan makrofag) dalam menghasilkan radikal bebas (RB) yang kemudian akan menyebabkan peradangan pada arthritis ajuvan semakin akut (Baratawidjaja, 2004; Kavanaugh dan Lipsky, 1999), seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.1:



Gambar 4.1 Kaki tikus sebelum dan sesudah diinjeksi CFA (tanda panah menunjuk pada pembengkakan kaki)

Aktivitas SOD didefinisikan sebagai banyaknya mikromol (μmol) radikal ion superoksida ($\text{O}_2^{\bullet-}$) yang dirubah menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) oleh tiap mL enzim SOD permenit pada kondisi optimum, yang selanjutnya menyebabkan penghambatan reduksi NBT menjadi NBT-diformazan (Anonymous^(b), 2002).

Konsentrasi NBT-diformazan yang terbentuk dipengaruhi oleh aktivitas SOD dalam mendismutasi $\text{O}_2^{\bullet-}$ menjadi O_2 dan H_2O_2 . Semakin besar aktivitas SOD dalam mendismutasi $\text{O}_2^{\bullet-}$, maka jumlah $\text{O}_2^{\bullet-}$ dalam mereduksi NBT menjadi NBT-diformazan semakin kecil. Akibatnya konsentrasi NBT-diformazan yang terukur pada panjang gelombang 580 nm memberikan absorbansi yang kecil juga, dan sebaliknya jika aktivitas SOD kecil maka konsentrasi NBT-diformazan yang terukur memberikan absorbansi yang besar.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan aktivitas SOD antara tikus arthritis ajuvan dan tikus kontrol. Seperti yang ditunjukkan Tabel 4.1:

Tabel 4.1 Aktivitas SOD antara tikus kontrol dan tikus arthritis ajuvan.

Tikus Ke-	Aktivitas SOD (unit)	
	Kontrol	Arthritis Ajuvan
1	72,6579	28,4474
2	67,3947	28,1842
3	69,5000	25,8158
4	73,1842	23,7105
5	72,3947	26,3421
6	73,9737	27,3947
7	70,0263	25,8158
8	70,2895	24,5000
9	71,0790	22,1316
10	72,1316	26,6053
Jumlah	712,6316	258,9474
Rata-rata	71,2632 \pm 1,9889	25,8947 \pm 1,9889

Berdasarkan Tabel 4.1, aktivitas SOD artritis ajuvan lebih rendah ($25,8947 \pm 1,9889$) unit dibandingkan dengan aktivitas SOD tikus kontrol ($71,2632 \pm 1,9889$) unit, hal ini disebabkan karena pada artritis ajuvan terjadi penumpukan RB yang berlebihan dan mendorong terjadinya inaktivasi terhadap SOD. Menurut Maestro (1991), SOD dalam tubuh berfungsi sebagai *scavenger* radikal ion superoksida ($O_2^{\bullet -}$), yaitu dengan cara mendismutasi $O_2^{\bullet -}$ menjadi H_2O_2 dan O_2 . Namun, akibat RB ($O_2^{\bullet -}$ dan H_2O_2) yang diproduksi oleh makrofag lebih besar dibandingkan dengan jumlah SOD yang ada didalam tubuh. Akibatnya H_2O_2 yang terus diproduksi makrofag tersebut menginaktivasi SOD dan sekaligus menurunkan aktivitas SOD dalam melakukan fungsinya sebagai *scavenger* $O_2^{\bullet -}$.

4.2 Pengaruh Ekstrak Daun Teh Hijau Terhadap Aktivitas SOD Pada Jaringan Periartrikuler Artritis Ajuvan

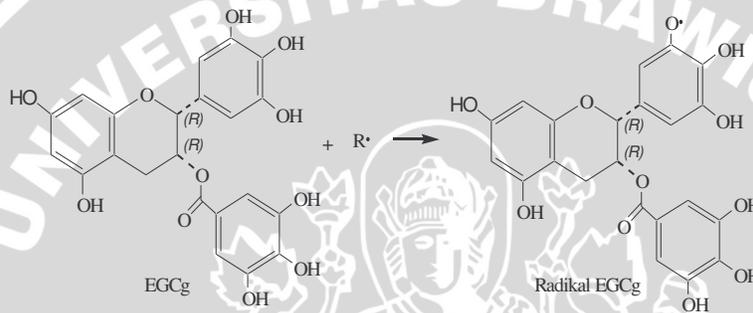
Aktivitas SOD jaringan periartrikuler artritis ajuvan pada penelitian ini ditunjukkan Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Aktivitas SOD jaringan periartrikuler tikus kontrol, artritis ajuvan terapi ekstrak daun teh hijau dan artritis ajuvan non terapi.

Tikus Ke-	Aktivitas SOD (unit)		
	Kontrol	Artritis Ajuvan Terapi	Artritis Ajuvan Non Terapi
1	72,6579	40,0263	28,4474
2	67,3947	36,8684	28,1842
3	69,5000	37,9211	25,8158
4	73,1842	36,6053	23,7105
5	72,3947	38,1842	26,3421
6	73,9737	39,2368	27,3947
7	70,0263	37,6579	25,8158
8	70,2895	39,7632	24,5000
9	71,0790	37,9211	22,1316
10	72,1316	39,2368	26,6053

Jumlah	712,6316	383,4211	258,9474
Rata-rata	71,2632±1,9889	38,3421±1,1782	25,8947±1,9889

Berdasarkan Tabel 4.2, aktivitas SOD tikus arthritis ajuvan yang diterapi dengan ekstrak daun teh hijau lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas SOD arthritis ajuvan yang tidak diterapi, yaitu (38,3421±1,1782) unit dan (25,8947±1,9889) unit. Tingginya aktivitas SOD ini diduga akibat adanya aktivitas antioksidan (AO) nonenzimatik yang terdapat pada ekstrak teh hijau. Polifenol yang terkandung di dalam daun teh hijau bertindak sebagai AO yang dapat melindungi sel dan bahan kimia tubuh melawan kerusakan yang disebabkan oleh RB (Madhavi *et al*, 1996). Polifenol daun teh dapat bereaksi dengan RB melalui penyerahan proton dan sekaligus merubah senyawa radikal menjadi non radikal. Berikut salah satu contoh reaksi *scavenger* RB oleh polifenol daun teh epigallocatekin galat (EGCg) pada Gambar 4.2 :



Gambar 4.2 Reaksi EGCg dengan RB

Reaksi *scavenger* Gambar 4.2, selain merubah RB menjadi senyawa non radikal, juga dihasilkan EGCg radikal. Tetapi, AO radikal ini tidak berbahaya karena reaktivitasnya rendah, hal ini disebabkan karena radikal pada EGCg dapat melakukan resonansi yang dapat membuat senyawa tersebut lebih stabil. Sehingga, sangat kecil kemungkinan untuk bereaksi dengan lipid dan menyebabkan kerusakan pada jaringan yang lain.

Adanya AO nonenzimatik ini menyebabkan aktivitas SOD tetap terstabilkan. Inaktivasi RB terhadap sisi aktif SOD pada jaringan periartikuler arthritis ajuvan yang diterapi dengan ekstrak teh

hijau tidak terjadi, hal ini ditunjukkan oleh lebih besarnya aktivitas SOD artritis ajuvan terapi ekstrak daun teh hijau ($38,3421 \pm 1,1782$) unit dibandingkan dengan aktivitas SOD artritis ajuvan yang tidak diterapi ($25,8947 \pm 1,9889$) unit.

Berdasarkan uji statistik terhadap aktivitas SOD dan dilanjutkan dengan uji BNT 1 % (L.5.3) didapatkan hasil bahwa ekstrak daun teh hijau berpengaruh sangat nyata terhadap peningkatan aktivitas SOD yang ditunjukkan oleh notasi yang berbeda (Tabel 4.3).

Tabel 4.3 Aktivitas SOD dan notasi BNT 1 %

Aktivitas SOD rata-rata		Kontrol	Terapi	Non Terapi	Notasi
		71,2632	38,3421	25,8947	
Kontrol	71,2632	-	-	-	a
Terapi	38,3421	32,9211*	-	-	b
Non Terapi	25,8947	45,3685*	12,4465*	-	c

Keterangan : Notasi BNT 1 % yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan sangat nyata antar perlakuan

Notasi yang berbeda pada tiap perlakuan (Tabel 4.3) menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh yang sama terhadap masing-masing perlakuan. Pada perlakuan tikus kontrol yang mempunyai notasi (a), menunjukkan adanya perbedaan aktivitas SOD yang sangat nyata dibandingkan dengan perlakuan tikus artritis ajuvan yang diterapi dengan ekstrak daun teh hijau (b) dan tikus artritis ajuvan non terapi (c). Hal ini disebabkan karena pada tikus kontrol tidak terjadi proses autoimun yang mendorong sel radang seperti makrofag dan neutrofil dalam menghasilkan RB yang berlebih, seperti yang terjadi pada tikus artritis ajuvan. Sehingga RB yang ada pada tubuh tikus kontrol masih dalam batas normal dan tidak sampai menginaktivasi SOD.

Pada perlakuan artritis ajuvan yang diterapi ekstrak teh hijau dengan notasi (b) dan artritis ajuvan non terapi dengan notasi (c), menunjukkan bahwa adanya pemberian terapi ekstrak daun teh hijau dapat memberikan aktivitas SOD yang lebih tinggi ($38,3421 \pm 1,1782$)

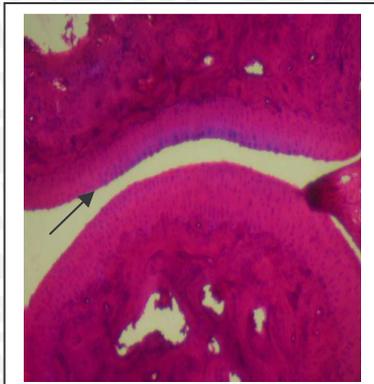
unit dibandingkan dengan artritis ajuvan yang tidak diterapi dengan ekstrak teh hijau yaitu $(25,8947 \pm 1,9889)$ unit. Lebih tingginya aktivitas SOD pada artritis ajuvan terapi ekstrak daun teh hijau disebabkan karena adanya pengaruh *scavenger* RB oleh senyawa katekin yang terkandung di dalam ekstrak daun teh hijau (Gambar 4.2). Akibatnya, inaktivasi SOD oleh RB (terutama H_2O_2) dapat dikurangi dan sekaligus dapat meningkatkan aktivitas SOD dalam mendismutasi O_2^{\bullet} menjadi O_2 dan H_2O_2 . Hal ini sesuai dengan hipotesis penelitian yaitu terapi ekstrak daun teh hijau dapat meningkatkan aktivitas SOD jaringan periartikuler artritis ajuvan dalam mereduksi radikal ion superoksida (O_2^{\bullet}).

4.3 Pengaruh Ekstrak Daun Teh Hijau Terhadap Gambaran Histologi Tulang Pada Artritis Ajuvan

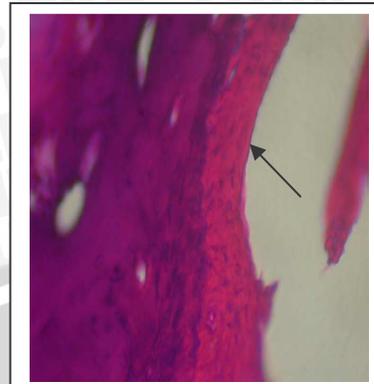
Peradangan yang terjadi pada artritis ajuvan merupakan suatu bentuk kerusakan jaringan yang mendorong terjadinya destruksi tulang dan tulang rawan, yang berlanjut pada terjadinya deformitas sendi (Kavanaugh dan Lipsky, 1999). Salah satu metode untuk mengetahui kerusakan jaringan tulang ini adalah dengan menggunakan metode pewarnaan *hematoxylin* dan *eosin* (HE). *Hematoxylin* merupakan pewarna yang bersifat basa, dimana berupa garam dari basa-basa pembawa warna dengan radikal asam yang tidak berwarna, yang akan mewarnai bagian inti sel yang bersifat basa dengan warna ungu. Sedangkan *eosin* adalah zat warna yang bersifat asam yang dapat memberikan warna merah pada sitoplasma sel yang bersifat asam (Suntoro, 1983).

Hasil pewarnaan tulang dengan menggunakan metode HE menunjukkan adanya perbedaan antara gambaran histologi tulang tikus kontrol, artritis ajuvan terapi ekstrak daun teh hijau dan artritis ajuvan non terapi (Gambar 4.3).

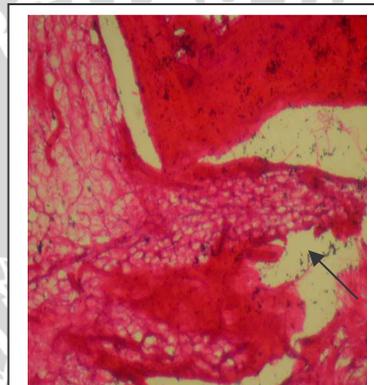




A. Histologi Tulang Tikus Kontrol



B. Histologi Tulang Arthritis Ajuvan Terapi



C. Histologi Tulang Arthritis Ajuvan Non Terapi

Gambar 4.3 : Histologi tulang tikus kontrol, arthritis ajuvan terapi ekstrak daun teh hijau dan arthritis ajuvan non terapi

Gambar 4.3 menunjukkan perbedaan gambaran histologi ditunjukkan oleh tanda panah. Pada gambar 4.3.C terlihat permukaan jaringan tulang yang tidak rata karena terjadi pembentukan panus yang selanjutnya produksi RB meningkat dan sekaligus meningkatkan kerusakan jaringan tulang dan tulang rawan yang pada jaringan tersebut. Hal ini berbeda sekali dengan gambaran histologi artritis ajuvan yang telah diterapi dengan ekstrak daun teh hijau (gambar 4.3.B), dimana permukaan jaringan tulang terlihat rata dan hampir sama keteraturannya dengan gambaran histologi jaringan tulang tikus kontrol (gambar 4.3.A). Gambaran tersebut menandakan bahwa pembentukan panus pada jaringan tulang artritis ajuvan yang diterapi dengan ekstrak daun teh hijau tersebut sudah mulai mengalami penurunan sehingga kerusakan pada jaringan tersebut juga sudah mulai mengalami perbaikan yang mendekati tikus kontrol (normal).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terapi ekstrak daun teh hijau (*green tea*) pada artritis ajuvan meningkatkan aktivitas SOD sebesar 48,07 % yaitu dari $(25,8947 \pm 1,9889)$ unit menjadi $(38,3421 \pm 1,1782)$ unit, selain itu terapi ekstrak teh hijau memperbaiki gambaran histologi tulang artritis ajuvan hingga mendekati histologi tulang tikus kontrol (normal).

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak daun teh hijau dalam air yang berfungsi sebagai antioksidan nonenzimatik.



DAFTAR PUSTAKA

Abiyoso; Rudijanto, A.; Hendrawan, D.; Soeatmadji, D.W.; Kalim, H.; Soedirjo, H.M.; Achmad, H., 1994, **Ilmu Penyakit Dalam**, Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

Anggarini, Sisca, K., 2006, **Stress Oksidatif**, PT Combiphar

Anonymous, 1996, **Arthritis Rheum**, American Collage Of Rheumatology Ad Hoc Committee On Clinical Guidelines, Guidelines for management of rheumatoid arthritis

Anonymous^(a), 2002, **Arthritis Rheum**, American Collage Of Rheumatology Ad Hoc Committee On Clinical Guidelines, Guidelines for management of rheumatoid arthritis

Anonymous^(b), 2002, **Superoxide Dismutase Assay Kit, Reagent Kit For The Analysis Of Superoxide Dismutase In Cell Extracts, Catalog# 7500-100-K**, Trevigen, Inc

Anonymous, 2005, **Stains File, Nitro Blue Tetrazolium**, <http://www.stainsfile.info/stainsfile/dyes/nbt.htm>, diakses tanggal: 20 Juli 2007

Anonim^(a), 2006, **Tanaman Teh**, www.m.s.wikipedia.org/wiki/teh, diakses 2006

Anonymous^(b), 2006, **Oxidative Stress**, [http://en.wikipedia.org/wiki/oxidative stress](http://en.wikipedia.org/wiki/oxidative_stress), diakses tanggal: 21 Februari 2007

Anonymous^(c), 2006, **Reactive Oxygen Species**, <http://en.wikipedia.org/wiki/ROS>, diakses tanggal: 21 Februari 2007

Anonymous^(d), 2006, **Reactive Oxygen Species, the free encyclopedia**, http://en.wikipedia.org/wiki/reactive_oxygen_species, diakses tanggal: 21 Februari 2007

Anonymous^(a), 2007, **Freund's Adjuvant**, http://en.wikipedia.org/wiki/Freund%27s_adjuvant, diakses tanggal: 08 agustus 2007

Anonymous^(b), 2007, **Hemtoxylin Eosin**, <http://pharmaness.com/hematox.html>, diakses tanggal: 18 November 2007

Anonim^(c), 2007, **Teh**, <http://id.wikipedia.org/wiki/Teh>, diakses: 21 Februari 2007

Anonymous^(d), 2007, **Appendix A: Staining and Commonly Used Stains**, <http://www.bu.edu/histology/m/append02.htm>, Histology Learning System, diakses tanggal: 05 Desember 2007

Banik, R.K.; Kasai, M.; Mizumura, K., 2002, **Reexamination of The Difference in Susceptibility to Adjuvant-Induced Arthritis among LEW/Crj.Slc/Wistar/ST and Slc/SD rats**

Bast, A, *et al*, 1991, **Oxidants and Antioxidant: State of Art**. The American Journal Medicine, Vol 91 Suppl 3C

Derrida, 1997, , **Green tea Extract, Green tea Polyphenol, EGCG, EC, EGC, ECG, Total Catechin, Caffeines, Green tea Modern Benefit, Applicable Uses and Research New Finding**, MDidea Professional Extract

Goldsby, R.A; Kindt, T.J.; Osborne, B.A, 2000, **Kuby Immunology**, 4th Edition, W.H. Freeman and Company, New York

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1999, **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3rd Edition, Oxford Univerxity Press, Oxford

Halliwell, B., 1991, **Reactive Oxygen Species in Living System: Source Biochemistry and Role in Human Disease**, The American Journal Medicine: Vol 91 Suppl 3C

Herawati, Heny, 2004, **Nilai Fungsional Beberapa Komponen Aktif yang Terkandung Dalam Teh**, http://jabar.litbang.deptan.go.id/html/bun_005.html, Jawa Barat, diakses November 2006

Higdon, Jane, 2002, **Tea and Chronic Disease Prevention**, LPI Research Associate

Kavanaugh, A.F. and Lipsky, P., 1999, **Rheumatoid Arthritis Inflammation, Basic Principle and Clinical Correlates**, 3rd Edition, Lippincott William and Wilkins, Philadelphia

Levites, Y., Amit, T., Youdim, M.B., Mandel S., 2002, **Involvement Of Protein Kinase C Activation and Cell Survival/ Cell Cycle Gen In Green Tea Polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate Neuroprotective Action**, J Biol Chem

Madhavi, D.L.; Deshpande, S.S; Salunke, 1996, **Food Antioxidant : Technological, Toxicological and Health Perspective**, Marcel Dekker, Inc., New York

Maestro, RD., **Free Radical And Mediators Of Tissue Injury**, In: Droesti IE., ed, Trace Elemen, Micronutrient And Free Radical, New Jersey: Human Press, 24-25

Nakagawa, M., 1999, **Catechin**, World Green Tea Assosiation, Japan

Narbuko, C dan A. Achmadi., 1997, **Metode Penelitian**, Bumi Aksara, Jakarta

Ronaghy, A., Prakken, B.J., Takabayashi, K., Firestein, G.S., Boyle, D., Zvailfler, N.J., Roor, S.T.A.; Albani, S., Carson, D.A.;

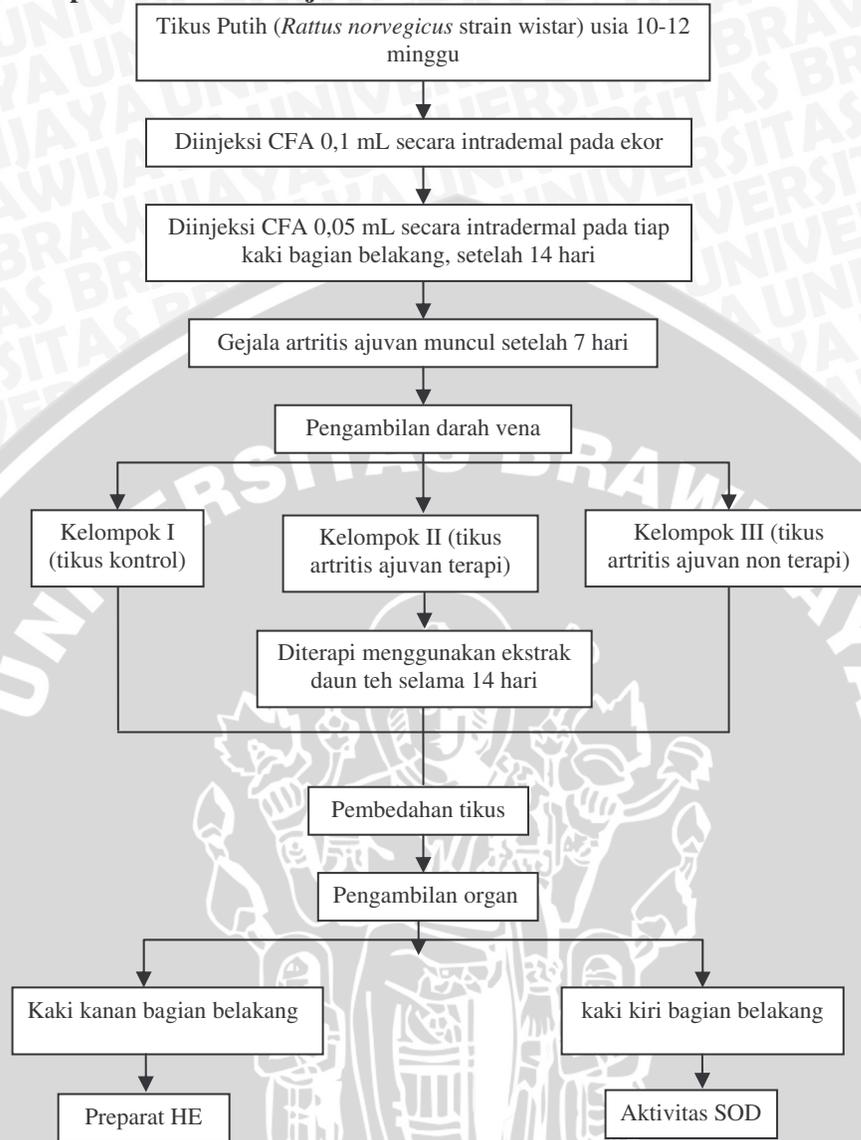
- Raz, E., 2002, **Immunostimulatory DNA Sequence Influence The Course of Adjuvant Arthritis**, *J Immunol*
- Sakuma, S., Nishigaki, F., Magari, K., Ogawa, T., Miyata, S., Ohkubo, Y., Goto, T., 2001, **FK506 is Superior to Methotrexate in Theareupetic Effect on Advanced State of Adjuvant-Induced Arthritis**, *inflanen, Res*, 50
- Santos, L and Tipping, P.G., 1994, **Attenuation of Adjuvant Arthritis in Rats by Treatment with Oxygen Radical Scavengers**, *Immunology and Cell Biology*
- Simonini, G.; Matucci, C.M.; Cimaz, R.; Anishini, M.; Cesaretti, S.; Zoppi, M.; Generini, S.; Falcini, F., 2001, **Evidence for Immune Activation Agaist Oxidazed Lipoprotein in Inactive Phase of Juvenile Chronic Arthritis**, *J Rheumatol* 28
- Tjokropawiro, A., 1993, **radikal bebas, aspek klinik dan kemungkinan aplikasi terapi**, In: Simposium Radikal Bebas Persatuan Ahli Penyakit Dalam Indonesia, Surabaya
- Van Eden, W.; Holoshitz, J.; Cohen, I., 1987, **Antigenic Mimicry between Mycobacteria and Cartilage Proteoglycans : The Model of Adjuvant Arthritis**. In (Cruse J.M., Lewis R.E,Jr, eds). **Autoimmunoregulation and Autoimmune Disease**. Basel : Karger
- Widodo, M.A., 1995, **Efek Pemicu Radikal Bebas dan Vitamin E Pada Diabetes Komplikasi Pembuluh Darah Tikus Diabetes**, Laporan Penelitian Hibah bersaing 1992-1995 Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang
- Widodo, M.A., 1997, **Xenobiotik dan Radikal Bebas Pada Patogenesa Penyakit Paru**, Kumpulan Makalah Seminar dan Lokakarya Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

Yoshida, A.; Nakano, Y.; Yamashita, Y.; Oho, T.; Ito, H.; Kondo, M.; Ohishi, M; Koga, T., 2001, **Immunodominant Region of Actinobacillus actinomycetemcomitans 40kD Heat Shock Protein in Patient with Rheumatoid Arthritis**, J Dent Res 80



LAMPIRAN

Lampiran 1 Skema Kerja Penelitian



Lampiran 2 Preparasi Larutan

L.2.1 Pembuatan Larutan PFA (Paraformaldehid) 4%

Langkah pertama dalam pembuatan larutan PFA adalah membuat larutan NaCl 0,9 % (% g/v) sebagai pelarutnya, yaitu ditimbang NaCl sebanyak 2,25 g lalu dilarutkan dengan aquades steril dan diencerkan dalam labu ukur 250 mL sampai tanda batas.

$$\begin{aligned}V_1 M_1 &= V_2 M_2 \\V_1 \times 37 \% &= 100 \text{ mL} \times 4 \% \\V_1 &= 10,8 \text{ mL}\end{aligned}$$

Larutan PFA 4 % dapat dibuat dengan mengambil 10,8 mL formaldehid 37 % (% v/v) dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan NaCl 0,9 % sampai tanda batas.

L.2.2 Pembuatan Larutan PBS pH 7,4

Larutan PBS dapat dibuat dengan mencampurkan 0,1 g KCl, 0,1 g KH_2PO_4 , 4 g NaCl, dan 1,08 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dengan 300 mL aquades steril dalam beaker gelas secara berurutan. Kemudian dilakukan pengadukan menggunakan stirer dan diukur pHnya menggunakan pH meter hingga mencapai pH 7,4. Setelah itu, larutan dipindahkan ke labu ukur 500 mL dan diencerkan hingga tanda batas. Selanjutnya disimpan dalam botol dan disterilisasi.

L.2.3 Pembuatan Larutan Stok Xantin 0,1 M

$$\begin{aligned}g &= V \times M \times \text{BM} \\&= 10 \text{ mL} \times 0,1 \text{ M} \times 152,11 \text{ g/mol} \\&= 0,1521 \text{ g}\end{aligned}$$

Xantin sebanyak 0.1521 g dilarutkan dalam aquades steril dan diencerkan dalam labu ukur 10 mL.

L.2.4 Pembuatan Larutan Xantin 0,025 M

$$\begin{aligned}V_1 M_1 &= V_2 M_2 \\V_1 \times 0,1 \text{ M} &= 10 \text{ mL} \times 0,025 \text{ M} \\V_1 &= 2,5 \text{ mL}\end{aligned}$$

Larutan xantin 0.025 M dapat dibuat dengan cara mengambil 2.5 larutan xantin 0.1 M, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan akuades steril sampai tanda batas. Selanjutnya larutan tersebut dimasukkan kedalam botol dan disterilisasi.

L.2.5 Pembuatan Larutan Xantin Oksidase 1 Unit

Larutan xantin oksidase 1 unit dapat dibuat dengan cara mengambil 1 mL larutan stok xantin oksidase 10 unit dan diencerkan dengan akuades steril dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas.

L.2.6 Pembuatan Larutan *Nitroblue Tetrazolium* (NBT) 25 Unit

Untuk membuat larutan NBT 25 unit dari larutan NBT stok 100 unit adalah dengan mengambil 2.5 mL larutan NBT stok dan dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL. Selanjutnya dilakukan pengenceran dengan akuades steril sampai tanda batas.

L.2.7 Pembuatan Larutan EDTA 0.02 M

$$\begin{aligned}g &= V \times M \times BM \\ &= 10 \text{ mL} \times 0.02 \text{ M} \times 372.24 \text{ g/mol} \\ &= 0.0744 \text{ g}\end{aligned}$$

EDTA sebanyak 0.0744 g dilarutkan dengan akuades steril kemudian diencerkan dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas. Selanjutnya dipindahkan kedalam botol dan disterilisasi.

L.2.8 Preparasi Larutan Standar SOD

Larutan standar SOD dapat dibuat dengan cara melakukan variasi konsentrasi pengenceran stok larutan SOD 80 unit.

Stok kit SOD: 500 unit

Stok larutan SOD 80 unit

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \times 500 \text{ unit} = 10 \text{ mL} \times 80 \text{ unit}$$

$$V_1 = 1,6 \text{ mL}$$

Stok kit SOD diambil 1,6 mL dan diencerkan dengan akuades steril dalam labu ukur 10 mL.

Stok larutan SOD 70 unit

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \times 80 \text{ unit} = 10 \text{ mL} \times 70 \text{ unit}$$

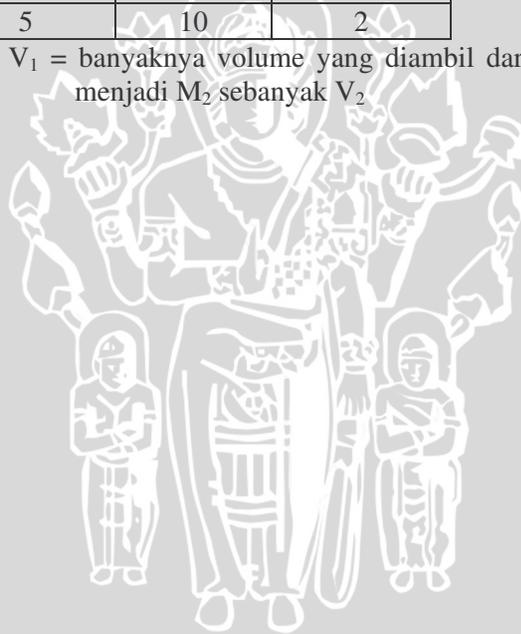
$$V_1 = 8,75 \text{ mL}$$

Larutan stok SOD 80 unit/mL diambil 8,75 mL dan diencerkan dengan akuades steril dalam labu ukur 10 mL.

Dengan cara yang sama seperti pengenceran pada konsentrasi 80 dan 70 unit, pengenceran untuk konsentrasi selanjutnya (60,50,40,30,20,10,5 dan 2 unit) dapat dilihat pada tabel L.2.9.1 dibawah ini:

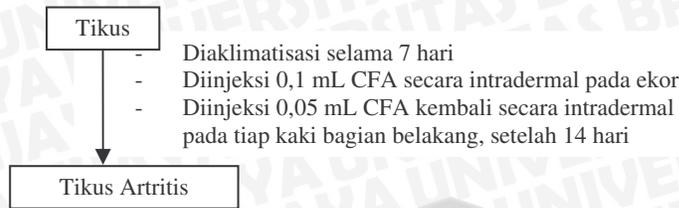
V ₁ (mL)	M ₁ (unit)	V ₂ (mL)	M ₂ (unit)
8,6	70	10	60
8	60	10	50
8	50	10	40
7,5	40	10	30
6,7	30	10	20
5	20	10	10
5	10	10	5
4	5	10	2

Keterangan : V₁ = banyaknya volume yang diambil dari M₁ agar menjadi M₂ sebanyak V₂

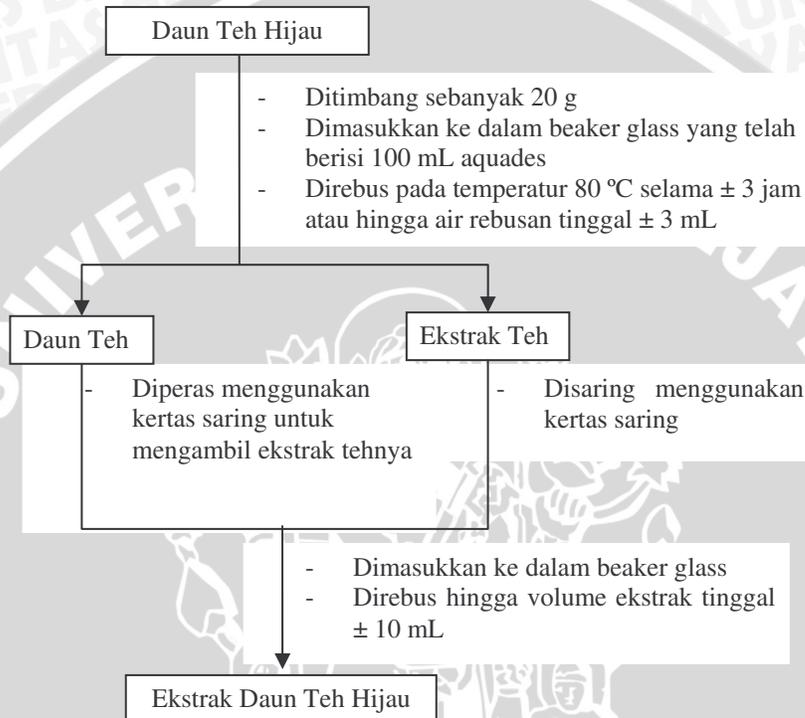


Lampiran 3. Diagram Alir

L.3.1 Injeksi Complete Freund's Ajuvant



L.3.2 Pembuatan Ekstrak Daun Teh Hijau



L.3.3 Terapi Ekstrak Daun Teh

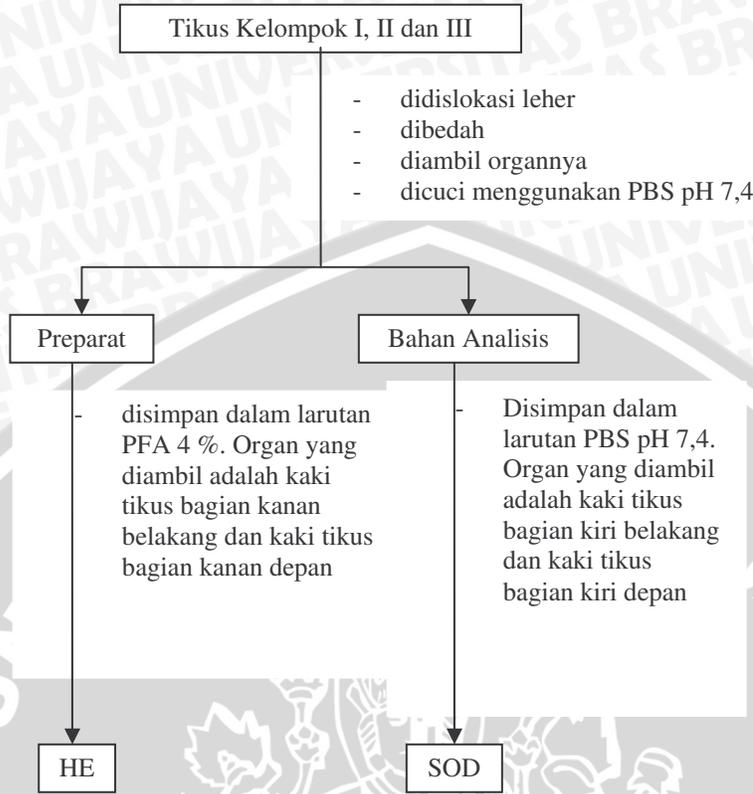
Tikus Kelompok II

- diterapi menggunakan ekstrak daun teh dengan dosis 2 g/mL, selama 14 hari

Arthritis Ajuvan Terapi



L.3.4 Pengambilan Organ



L.3.5 Pewarnaan Hematoxylen-Eosin

Preparat

- Dideparafinasi dengan xilol selama 5 menit 3 kali
- Dimasukkan dalam etanol absolut selama 5 menit (3 kali)
- Dimasukkan dalam etanol bertingkat 95 %, 90 %, 80 %, 70 % (% v/v) masing-masing selama 5 menit
- Direndam dalam aquades

Preparat

- Diwarnai dengan Hematoxylen selama 10 menit atau didapatkan hasil terbaik
- Dicuci dengan air mengalir
- Dibilas dengan aquades
- Diwarnai dengan Eosin selama 5 menit
- Direndam dalam aquades
- Dimasukkan dalam etanol bertingkat 70 %, 80 %, 90 %, 95 % (% v/v) masing-masing selama 10 menit
- Dimasukkan dalam etanol absolut selama 5 menit (3 kali)
- Dimasukkan dalam xylol selama 5 menit (2 kali)
- Dikering anginkan
- Mounting dengan menggunakan entellan
- Ditunggalkan dengan cover glass

Preparat HE

L.3.6 Pembuatan Kurva Baku SOD

Larutan Standar SOD konsentrasi
2,5,10,20,30,40,50,60,70 dan 80 unit

- Dipipet 500 μL
- Dimasukkan dalam tiap-tiap tabung reaksi
- Ditambah EDTA 20 mM 100 μL
- Ditambah 100 μL NBT 25 unit
- Ditambah 100 μL xantin 25 mM
- Ditambah 100 μL xantin oksidase 1 unit
- Divortex
- Ditambah PBS pH 7,4 500 μL
- Divortex

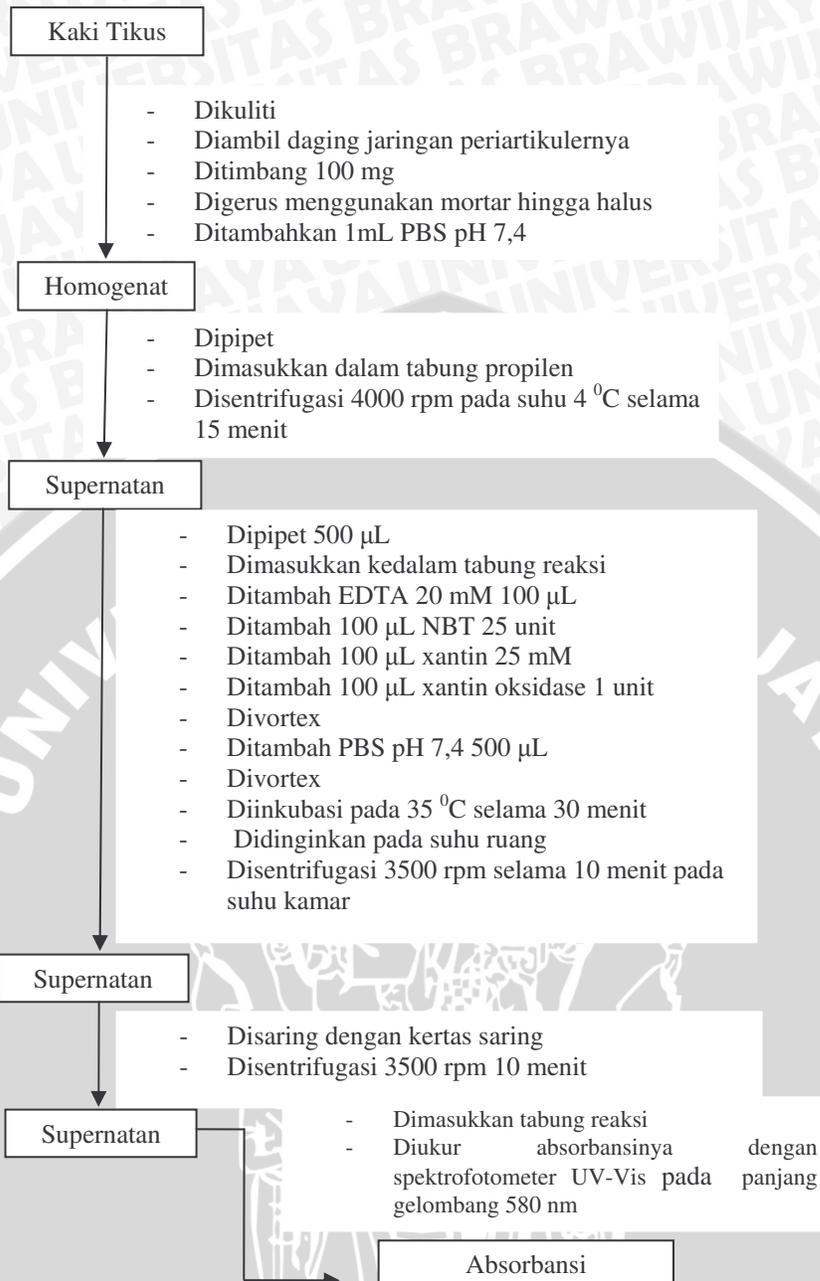
Larutan Campuran

- Diinkubasi pada suhu 35 $^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit
- Didinginkan dalam suhu ruang
- Diukur λ maksimumnya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada λ 500 sampai 700 nm
- Diukur absorbansi tiap-tiap larutan standar menggunakan λ maksimum

Absorbansi Larutan Standar SOD



L.3.7 Pengukuran Aktivitas SOD Jaringan Periartikuler



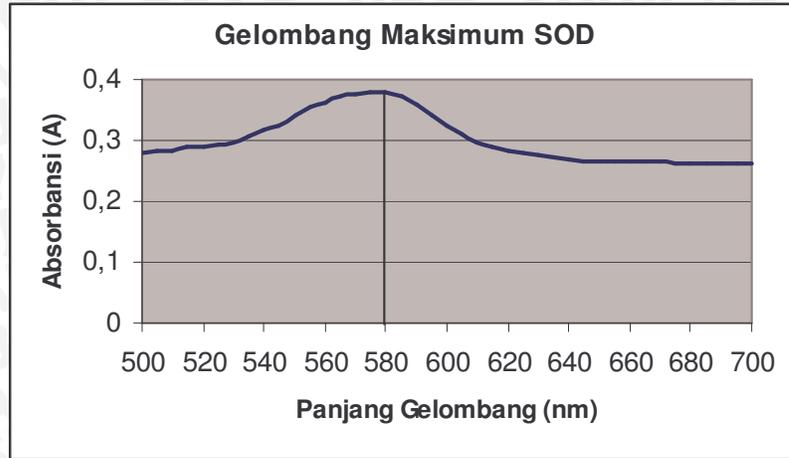
L.4 Data Hasil Penelitian

L.4.1 Mencari Panjang Gelombang λ Maksimum

Larutan standar SOD dengan konsentrasi 40 unit, diukur absorbansinya pada range panjang gelombang daerah visible yaitu antara 500 nm–700 nm.

Tabel L.4.1. Hasil pengukuran panjang gelombang λ larutan standar SOD untuk menentukan λ maksimum

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi	Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi
500	0,281	605	0,309
505	0,283	610	0,297
510	0,284	615	0,289
515	0,288	620	0,283
520	0,291	625	0,279
525	0,294	630	0,275
530	0,297	635	0,273
535	0,307	640	0,269
540	0,318	645	0,267
545	0,323	650	0,265
550	0,342	655	0,265
555	0,355	660	0,265
560	0,361	665	0,264
565	0,372	670	0,264
570	0,375	675	0,263
575	0,378	680	0,263
580	0,38	685	0,263
585	0,373	690	0,263
590	0,357	695	0,263
595	0,34	700	0,263
600	0,324		



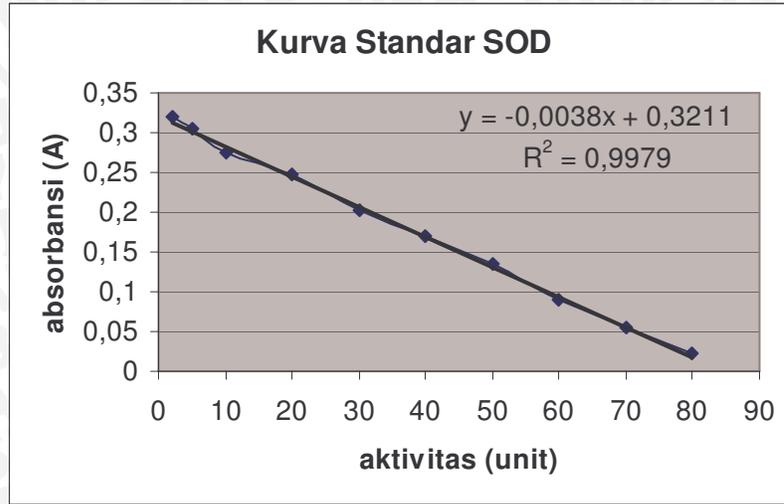
Gambar L.4.1 Kurva SOD pada aktivitas 40 unit

Pada panjang gelombang 580 nm, absorbansi larutan standar SOD memiliki absorbansi terbesar. Dengan demikian, panjang gelombang 580 nm merupakan panjang gelombang maksimum yang nantinya akan digunakan pada pengukuran absorbansi SOD selanjutnya, yang meliputi absorbansi larutan standar SOD dan sampel.

L.4.2 Kurva Standar SOD

Tabel L.4.2 Hasil pengukuran absorbansi larutan standar SOD pada panjang gelombang 580 nm

Aktivitas (unit)	Absorbansi
2	0,321
5	0,305
10	0,274
20	0,247
30	0,203
40	0,169
50	0,134
60	0,091
70	0,054
80	0,023



Gambar L.4.2 Kurva Standar SOD

L.4.3. Konsentrasi SOD Sampel

Tabel L.4.3.1. Absorbansi dan aktivitas SOD tikus kontrol

A	SOD (unit)
0,045	72,6579
0,065	67,3947
0,057	69,5000
0,043	73,1842
0,046	72,3947
0,04	73,9737
0,055	70,0263
0,054	70,2895
0,051	71,0790
0,047	72,1316

Tabel L.4.3.2 Absorbansi dan aktivitas SOD tikus arthritis ajuvan terapi

A	SOD (unit)
0,169	40,0263
0,181	36,8684
0,177	37,9211
0,182	36,6053
0,176	38,1842
0,172	39,2368
0,178	37,6579
0,17	39,7632
0,177	37,9211
0,172	39,2368

Tabel L.4.3.3 Absorbansi dan aktivitas SOD tikus arthritis ajuvan non terapi (tikus sakit)

A	SOD (unit)
0,213	28,4474
0,214	28,1842
0,223	25,8158
0,231	23,7105
0,221	26,3421
0,217	27,3947
0,223	25,8158
0,228	24,5000
0,237	22,1316
0,220	26,6053

Keterangan : aktivitas SOD sampel ditentukan berdasarkan persamaan grafik $y = -0,0038x + 0,3211$ yang terdapat pada kurva standar SOD. Dimana: absorbansi = y dan aktivitas = x
 Contoh : absorbansi sampel 0,045, maka :

$$\begin{aligned} \text{aktivitas SOD sampel} &= \left(\frac{(0,045 - 0,3211)}{-0,0038} \right) \\ &= 72,6579 \text{ unit} \end{aligned}$$

L.5. Pengolahan Data Hasil Penelitian

Tabel L..5.1. Aktivitas SOD sampel

Tikus Ke-	Aktivitas SOD (unit)		
	Kontrol	Artritis Ajuvan Terapi	Artritis Ajuvan Non Terapi
1	72,6579	40,0263	28,4474
2	67,3947	36,8684	28,1842
3	69,5000	37,9211	25,8158
4	73,1842	36,6053	23,7105
5	72,3947	38,1842	26,3421
6	73,9737	39,2368	27,3947
7	70,0263	37,6579	25,8158
8	70,2895	39,7632	24,5000
9	71,0790	37,9211	22,1316
10	72,1316	39,2368	26,6053
Jumlah	712,6316	383,4211	258,9474
Rata-rata	71,2632±1,9889	38,3421±1,1782	25,8947±1,9889

Perhitungan Statistik

$$\begin{aligned}
 \text{Faktor Koreksi (FK)} &= \frac{\left(\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2}{p \times n} \\
 &= \frac{(72,6579 + \dots + 40,0263 + \dots + 28,4474 + \dots)^2}{3 \times 10} \\
 &= 61200,8424
 \end{aligned}$$

Penentuan Jumlah Kuadrat :

1. Jumlah Kuadrat Total (JKT)

$$\begin{aligned}
 \text{(JKT)} &= \left(\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y^2_{ij} \right) - FK \\
 &= ((72,6579)^2 + \dots + (40,0263)^2 + \dots + (28,4474)^2 + \dots) - 61200,8424 \\
 &= 72274,6274 - 61200,8424
 \end{aligned}$$

$$= 11073,7851$$

2. Jumlah Kuadrat Perlakuan (JKP)

$$\begin{aligned} \text{(JKP)} &= \frac{\sum_{i=1}^p \left(\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2}{n} - FK \\ &= \frac{\left(\sum_{j=1}^n Y_{1j} \right)^2 + \left(\sum_{j=1}^n Y_{2j} \right)^2 + \left(\sum_{j=1}^n Y_{3j} \right)^2}{n} - FK \\ &= \frac{(712,6316)^2 + (383,4211)^2 + (258,9474)^2}{10} - 61200,8424 \\ &= 10990,0870 \end{aligned}$$

3. Jumlah Kuadrat Galat (JKG)

$$\begin{aligned} \text{(JKG)} &= (JKT - JKP) \\ &= 11073,7851 - 10990,0870 \\ &= 83,6981 \end{aligned}$$

Penentuan Kuadrat Tengah :

1. Kuadrat Tengah Perlakuan (KTP)

$$\begin{aligned} \text{KTP} &= \frac{(JKP)}{(p-1)} \\ &= \frac{(10990,0870)}{2} \\ &= 5495,0435 \end{aligned}$$

2. Kuadrat Tengah Galat (KTG)

$$\begin{aligned} \text{KTG} &= \frac{(JKG)}{p(n-1)} \\ &= \frac{(83,6981)}{27} \\ &= 3,0999 \end{aligned}$$



Penentuan F_{hitung}

$$F_{hitung} = \frac{(KTP)}{(KTG)}$$

$$= \frac{(5495,0435)}{(3,0999)}$$

$$= 1772,635$$

$F_{tabel}(v_1, v_2) = (2, 27)$ pada taraf nyata 1% = 5,49

Tabel L.5.2. Analisis Ragam Satu Arah Aktivitas SOD

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F	
				Hitung	Tabel 1%
Perlakuan	2	10990,0870	5495,0440	1772,6350	5,49
Galat	27	83,6981	3,0999		
Total	29	11073,7851			

Keterangan :

Yij = Aktivitas SOD (unit)
 p = banyaknya perlakuan
 n = banyaknya ulangan
 dB = derajat bebas

Hipotesis : H_0 = ekstrak teh hijau tidak berpengaruh terhadap peningkatan aktivitas SOD artritis ajuvan

H_1 = ekstrak teh hijau berpengaruh terhadap peningkatan aktivitas SOD artritis ajuvan

Berdasarkan Tabel L.5.2 diketahui bahwa $F_{hitung} > F_{tabel}$ pada taraf 1%, sehingga H_0 ditolak dan H_1 diterima. Hal ini berarti pemberian terapi ekstrak daun teh hijau memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap peningkatan aktivitas SOD jaringan periartikuler artritis ajuvan. Untuk mengetahui perlakuan mana yang mempunyai pengaruh berbeda, maka perlu dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 1%.

Uji BNT 1%

$$\text{BNT}(\alpha) = t_{\text{tabel}} \left(\frac{\alpha}{2}, \text{dBg} \right) \sqrt{\frac{2KTg}{n}}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT}(0,01) &= t_{\text{tabel}} \left(\frac{\alpha}{2}, \text{dBg} \right) \sqrt{\frac{2KTg}{n}} \\ &= t_{\text{tabel}} \left(\frac{0,01}{2}, 27 \right) \left(\sqrt{\frac{2(3,0999)}{10}} \right) \\ &= 2,7707 \times 0,7874 \\ &= 2,1816 \end{aligned}$$

Jika nilai uji BNT 1% lebih kecil atau sama dengan 2,1816, maka perlakuan tersebut tidak memberikan beda nyata dan ditunjukkan dengan pemberian notasi yang sama. Tetapi, jika nilai uji BNT 1% lebih besar dari 2,1816 maka perlakuan memberikan beda yang nyata.

Tabel L.5.3. Hasil Uji BNT 1% Aktivitas SOD

Aktivitas SOD rata-rata		Kontrol	Terapi	Non Terapi
		71,2632	38,3421	25,8947
Kontrol	71,2632	-		
Terapi	38,3421	32,9211*	-	
Non Terapi	25,8947	45,3685*	12,4465*	-
Notasi		a	b	c

*) : berbeda secara nyata pada taraf 1%

L.6. Perhitungan Prosentase Penurunan dan Kenaikan Aktivitas SOD Pada Arthritis Ajuvan

L.6.1. Prosentase Penurunan Aktivitas SOD Arthritis Ajuvan Setelah Diinjeksi dengan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA)

- Sebelum Diterapi Ekstrak Daun Teh Hijau

$$\% = \frac{(a - c)}{c} = \frac{(71,2632 - 25,8947)}{25,8947} \times 100\% = 175,20 \%$$

- Setelah Diterapi Ekstrak Daun Teh Hijau

$$\% = \frac{(a - b)}{b} = \frac{(71,2632 - 38,3421)}{38,3421} \times 100\% = 85,86 \%$$

L.6.1. Prosentase Kenaikan Aktivitas SOD Arthritis Ajuvan Setelah Diterapi dengan Ekstrak Daun Teh Hijau

$$\% = \frac{(b - c)}{c} = \frac{(38,3421 - 25,8947)}{25,8947} \times 100\% = 48,07 \%$$

Keterangan :

a : tikus kontrol (tikus normal)

b : arthritis ajuvan yang diterapi dengan ekstrak daun teh hijau

c : arthritis ajuvan yang tidak diterapi

