



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN BABANDOTAN
(*Ageratum conyzoides L.*) SEBAGAI ANTI-ARTRITIS REMATOID
PADA TIKUS YANG DIINDUKSI *COMPLETE FREUND'S*
*ADJUVANT***

TESIS

**ERNA HARFIANI
1406598680**

**FAKULTAS FARMASI
PROGRAM STUDI MAGISTER HERBAL
DEPOK
JANUARI 2017**



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN BABANDOTAN
(*Ageratum conyzoides L.*) SEBAGAI ANTI-ARTRITIS REMATOID
PADA TIKUS YANG DIINDUKSI *COMPLETE FREUND'S*
*ADJUVANT***

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Magister Sains

ERNA HARFIANI

1406598680

**FAKULTAS FARMASI
PROGRAM STUDI MAGISTER HERBAL
DEPOK
JANUARI 2017**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun yang dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Erna Harfiani

NPM : 1406598680

Tanda Tangan



Tanggal : 6 Januari 2017

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan dibawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa tesis ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika kemudian hari ternyata saya terbukti melakukan tindakan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia

Depok, 6 Januari 2017


Erna Harfiani

LEMBARAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : Erna Harfiani

NPM : 1406598680

Program Studi : Magister Herbal

Judul : Uji efektivitas ekstrak etanol daun babandotan (*Ageratum conyzoides L.*) sebagai anti-arthritis rematoid pada tikus yang diinduksi *Complete Freund's Adjuvant*.

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Magister Herbal, Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Anton Bahtiar, M. Biomed, Apt. ()

Pembimbing II : Dr. Katrin, MS, Apt. ()

Penguji I : Prof. Dr. Berna Elya, M.Si., Apt. ()

Penguji II : Dr. Dra. Ari Estuningtyas, M. Biomed, Apt. ()

Ketua Sidang : Prof. Dr. Berna Elya, M.Si., Apt. ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 6 Januari 2017

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, Puji Syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT karena atas berkat Rahmat dan Karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan tesis. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi syarat untuk mencapai gelar Magister Herbal pada Fakultas Farmasi Universitas Indonesia. Selama studi ini penulis mendapatkan bantuan beasiswa dari Program BPPDN.

Penulis menyadari banyak bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari awal studi sampai selesai penyusunan tesis ini. Oleh karena itu penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Dr. Anton Bahtiar, M.Biomed, Apt., selaku dosen pembimbing I yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan tesis
2. Dr. Katrin, MS, Apt., selaku dosen pembimbing II atas segala pendampingan dan kesediaan beliau dalam membantu penyusunan tesis
3. Prof. Dr. Berna Elya, M.Si., Apt., dan Dr. Dra. Ari Estuningtyas, M. Biomed, Apt., selaku penguji atas masukan yang sangat membantu penulis dalam penyusunan tesis
4. Dr. Mahdi Jufri, M.Si, Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Indonesia tempat penulis menimba ilmu pengetahuan yang sangat bermanfaat
5. dr. Mariono Reksoprodjo, Sp. OG, Sp KP., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Pembangunan “Veteran” Jakarta tempat penulis bekerja, yang telah memberikan ijin menuntut ilmu
6. Seluruh staff pengajar Program Studi Magister Herbal Fakultas Farmasi Universitas Indonesia yang telah memberikan ilmu pengetahuan yang sangat bermanfaat dan seluruh laboran serta tata usaha atas segala bantuan, serta dukungan kepada penulis
7. ILRC-UOBC (*Intergrated Laboratory Research Center UI-Olympus Bioimaging Centre*) Universitas Indonesia yang telah mengijinkan penulis melakukan penelitian yang diperlukan dalam penyusunan tesis

8. Orangtua tersayang Alm. Drs. H Hartono Abdurrachman, MM dan Hj Tien Soemartini, serta Bapak R. Hadiwahdjono, yang sangat berjasa dalam mendidik dan mendoakan penulis dengan tulus ikhlas
9. Ir. Riyadi Hartono, MT., suami penulis yang dengan sabar mendampingi dan membantu penulis, serta ananda Nabila, Syifa, Haidar dan Hannah, anak-anak sholeh-sholehah yang sangat membanggakan penulis dan menjadi penyemangat dalam menyelesaikan tesis
10. Kakak-kakak penulis, keluarga- Ir. Dedi Harwindiadi, MT., Ir. Winda Harwindani, Ir. Yongki Harimurti, MT yang senantiasa mendoakan dan membantu dalam studi Magister ini
11. Riri, Muti dan Tirza, sebagai team penelitian yang telah bersama-sama melakukan penelitian dengan suka dukanya serta segenap sahabat di Magister Herbal (Sarah, Anin, Paul, Astra, Mei, Siti, Lia dan semua teman yang tidak dapat disebut satu persatu) yang telah banyak membantu dan memberi semangat dalam menyelesaikan tesis ini.

Akhir kata penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis yang penulis ajukan ini dapat bermanfaat bagi penulis dan masyarakat.

Penulis
2017

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Erna Harfiani
NPM : 1406598680
Program studi : Magister Herbal
Fakultas : Farmasi
Jenis Karya : Tesis

Demi pengembangan Ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Non eksklusif (Non Exklusif Royalty Free Right)** atas karya ilmiah yang berjudul :

Uji efektivitas ekstrak etanol daun babandotan (*Ageratum conyzoides L.*) sebagai anti-arthritis reumatoid pada tikus yang diinduksi *Complete Freund's Adjuvant*

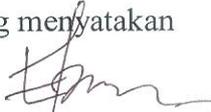
Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Non eksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 6 Januari 2017

Yang menyatakan


(Erna Harfiani)

ABSTRAK

Nama : Erna Harfiani
Program Studi : Magister Herbal
Judul : **Uji efektivitas ekstrak etanol daun babandotan (*Ageratum conyzoides L.*) sebagai anti-arthritis rematoid pada tikus yang diinduksi *Complete Freund's Adjuvant*.**

Arthritis rematoid (AR) adalah penyakit inflamasi sistemik kronik dan progresif, yang menyerang sendi secara simetris. Daun babandotan yang banyak terdapat di Indonesia dan di berbagai negara diharapkan dapat dijadikan alternatif penanganan AR karena obat anti-arthritis rematoid yang digunakan saat ini mempunyai efek samping toksisitas yang cukup besar. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek anti-rematoid arthritis dari ekstrak etanol daun babandotan berupa pengamatan pada volume edema kaki yang diinduksi *Complete Freund's adjuvant* (CFA), gambaran histopatologi membran sinovial pada sendi pergelangan kaki berupa skor sinovitis dan jumlah osteoklas pada tulang *calcaneus* kaki tikus. Setelah tikus diinduksi dan ditunggu 28 hari, diberikan perlakuan dengan ekstrak daun babandotan (40, 80, 160 mg/200 g bb), larutan normal saline (kontrol normal dan negatif) dan metotreksat (kontrol positif) pada hari ke-29 dan dilakukan pengamatan pada hari 29, 36, 43 dan 50. Pada hari ke-50, dibuat sediaan histoPA untuk mengamati skor sinovitis dan jumlah osteoklas. Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak daun babandotan dapat menurunkan volume edema kaki, skor sinovitis, dan jumlah osteoklas pada tulang *calcaneus* secara signifikan ($P < 0,05$) pada hari ke-50 dibandingkan dengan tikus kontrol arthritis. Diduga, flavonoid dari ekstrak daun babandotan, mengurangi produksi dan aktivitas sitokin pro-inflamasi, terutama TNF- α dan IL-1 dalam mekanisme anti-arthritis rematoid. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun babandotan mempunyai potensi sebagai anti-arthritis rematoid pada tikus yang diinduksi CFA.

Kata kunci : Daun babandotan (*A. conyzoides L.*), arthritis rematoid, CFA, edema kaki, sinovitis, osteoklas

xviii + 145 Halaman : 34 gambar, 12 tabel, 21 lampiran

Daftar pustaka : 104 (1963 – 2016)

ABSTRACT

Name : Erna Harfiani
Field of Study : Master of Herbs
Title : **Evaluation effectivity of ethanolic extract babandotan leaves (*Ageratum conyzoides L.*) as anti-rheumatoid arthritis in rats induced by *Complete Freund's Adjuvant***

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic chronic and progressive inflammatory disease, which attacks the joints symmetrically. Babandotan leaves are widely available in Indonesia and in various countries are expected to be used as an alternative in the treatment of RA because anti-rheumatoid arthritis drugs are used today have major toxic side effects. This study aims to determine the effect of anti-rheumatoid arthritis of the ethanol extract of the babandotan leaves by observations on paw edema volume induced by *Complete freund's adjuvant* (CFA), inflammation of the synovial membrane at the ankle joint as synovitis score and the number of osteoclasts in *calcaneus* bone. RA animal models created by inducing the CFA on the left hindpaw of rats. Volume paw edema observed at the day of induction and wait until the 28th day. Given treatment babandotan leaves extract (40, 80, 160 mg/200 g bb), normal saline (normal and negative control) and methotrexate (control positive) on day 29 and was observed on day 29, 36, 43 and 50. On day 50, preparations histopathology made at the ankle joint to observe synovitis score and the number of osteoclasts. The results showed that treatment babandotan leaves extract can reduce significantly ($P < 0.05$) the volume of paw edema, synovitis score and the number of osteoclasts in rats on day 50 compared to control rat arthritis. Allegedly, flavonoids from babandotan leaves extract play an important role in reducing the production and activity of pro-inflammatory cytokines, particularly TNF- α and IL-1. It showed that the babandotan leaves extract have a potential on anti-rheumatoid arthritis in rats induced by CFA.

Keywords : Babandotan leaves (*A. conyzoides L.*), rheumatoid arthritis, CFA, paw edema, synovitis, osteoclast
xviii + 145 pages : 34 pictures, 12 tabels, 21 appendices
Bibliography : 104 (1963 – 2016)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
LEMBAR PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR AKRONIM	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar belakang	1
1.2 Perumusan masalah	3
1.3 Tujuan penelitian	3
1.3.1 Tujuan umum	3
1.3.2 Tujuan khusus	3
1.4 Hipotesa	4
1.5 Manfaat penelitian	4
1.5.1 Manfaat teoritik	4
1.5.2 Manfaat praktis	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tanaman babandotan (<i>Ageratum conyzoides L.</i>)	5
2.1.1 Taksonomi babandotan	5
2.1.2 Morfologi babandotan	6
2.1.3 Kandungan kimia	7
2.1.4 Manfaat babandotan	8
2.1.5 Identifikasi simplisia daun <i>A. conyzoides L.</i>	9
2.1.5.1 Organoleptik	9
2.1.5.2 Gambaran makroskopis daun <i>A. conyzoides L.</i>	10
2.1.5.3 Gambaran mikroskopis daun <i>A. conyzoides L.</i>	10
2.1.5.4 Persyaratan simplisia daun <i>A. conyzoides L.</i>	12
2.1.6 Standarisasi ekstrak daun <i>A. conyzoides L.</i>	12
2.1.7 Metode ekstraksi	12
2.1.7.1 Metode ekstraksi dengan maserasi	13
2.1.7.2 Kromatografi lapis tipis (KLT)	14
2.2 Tulang dan Sendi	15
2.2.1 Tulang	15
2.2.2 Kartilago / tulang rawan sendi	18
2.2.3 Sendi	18
2.3 Inflamasi	20
2.3.1 Respon imun	22

3.4.6.3 Pengamatan membran sinovial sendi pergelangan kaki tikus dan penghitungan osteoklas secara histopatologi	58
3.5 Definisi operasional dan variabel penelitian	59
3.5.1 Definisi operasional	59
3.5.2 Variabel penelitian	60
3.6 Analisis data	60
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Tinjauan umum	61
4.2 Hasil uji pendahuluan	63
4.3 Penyiapan bahan uji	67
4.4 Penetapan randemen	68
4.5 Karakterisasi ekstrak etanol daun babandotan	68
4.5.1 Hasil pemeriksaan organoleptik ekstrak	69
4.5.2 Hasil parameter non spesifik	69
4.5.3 Hasil parameter spesifik	71
4.5.3.1 Hasil skrining fitokimia ekstrak daun babandotan	71
4.5.3.2 Hasil kromatografi lapis tipis (KLT)	77
4.6 Hasil uji anti-arthritis reumatoid pada parameter volume edema kaki tikus	78
4.7 Hasil uji anti-arthritis reumatoid pada parameter gambaran histopatologi	86
3.7.1 Perubahan gambaran membran sinovial (sinovitis) pada sendi pergelangan kaki tikus	86
3.7.2 Penghitungan jumlah osteoklas pada tulang <i>calcaneus</i>	93
5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	100
5.2 Saran	100
DAFTAR PUSTAKA	101
LAMPIRAN	109

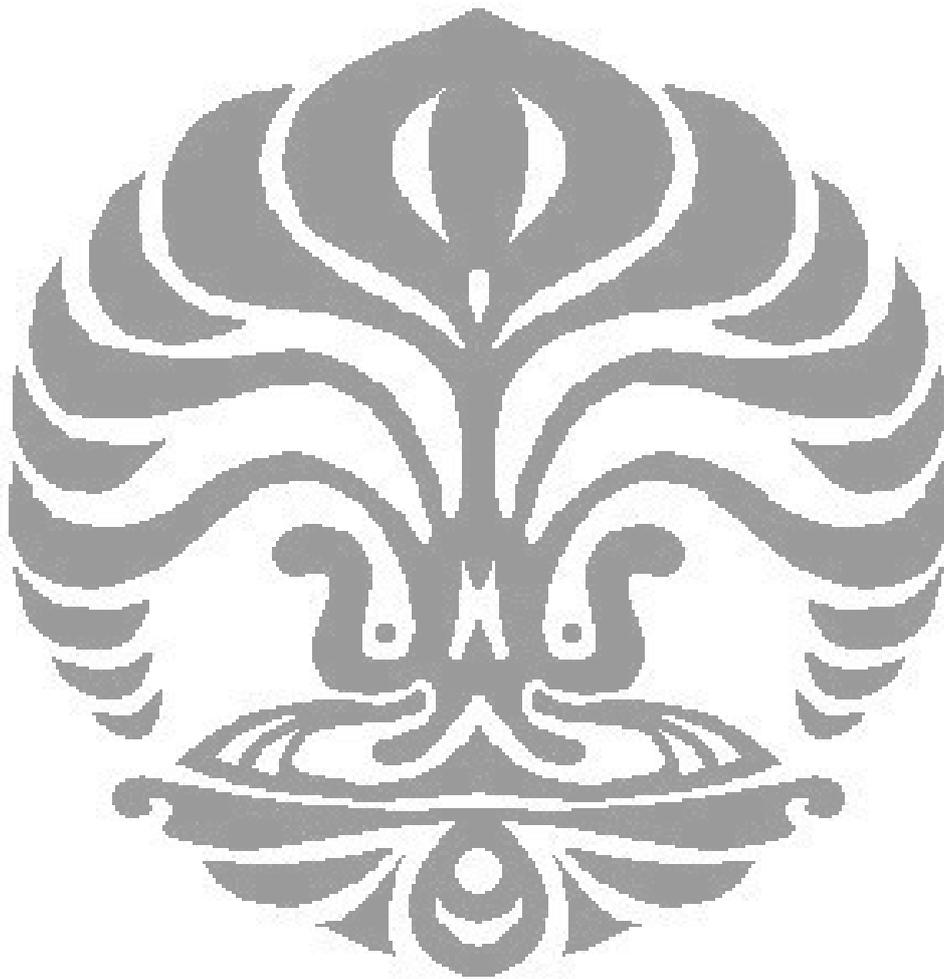
DAFTAR AKRONIM

ACR-EULAR	: <i>American Collage of Rheumatology / The European League Against Rheumatism</i>
ADAM	: <i>A Disintegrin and A Metalloprotease</i>
AICAR	: <i>Aminoimidazol karboksamida-Ribosil-5-Fosfat</i>
Anti-CCP	: <i>Anti-Cyclic Citrullinated Protein</i>
AR	: <i>Arthritis rematoid</i>
bFGF	: <i>basic Fibroblas Growth Factor</i>
CD	: <i>Cluster Differentiation</i>
CFA	: <i>Complete Freund's Adjuvant</i>
CMC	: <i>Carboxymethylcellulose</i>
COX	: <i>Siklooksigenase</i>
DMARD	: <i>Disease-Modifying Anti Rheumatic Drugs</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
ELISA	: <i>Enzymed-Linked Immunosorbent Assay</i>
FAICAR	: <i>Formimidimidazol karboksamida-Ribosil-5-Fosfat</i>
HLA	: <i>Human Leukocyte antigen</i>
ICAM	: <i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IFA	: <i>Incomplete Freund's Adjuvant</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
KCKT	: <i>Kromatografi Cair Kinerja Tinggi</i>
KG	: <i>Kromatografi Gas</i>
KLT	: <i>Kromatografi Lapis Tipis</i>
LOX	: <i>Lipoksigenase</i>
MCP	: <i>Metacarpophalangeal</i>
M-CSF	: <i>Macrophag-Colony Stimulating Factor</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMP	: <i>Matrix Metallo Proteinase</i>
MN	: <i>Monononuklear</i>
MTP	: <i>Metatarsophalangeal</i>
MTX	: <i>Metotreksat</i>
NBF	: <i>Neutral Buffered Formalin</i>
NF-kB	: <i>Nuclear Factor kappa B</i>
NSAID	: <i>Non Steroid Anti Inflammation Drugs</i>
OPG	: <i>Osteoprotogerin</i>
PIP	: <i>Proximal Interphalangeal</i>
PMN	: <i>Polimorfonuklear</i>
RANK	: <i>Reseptor Activator of Nuclear Factor kappa B</i>
RANKL	: <i>Reseptor Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand</i>
RF	: <i>Rheumatoid factor</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor -β</i>
Th	: <i>T helper</i>
TIMPS	: <i>Tissue Inhibitor of Metallo Proteinase</i>
TLR	: <i>Toll Like Reseptor</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Ageratum conyzoides L.....	7
Gambar 2.2.	Susunan kimia kuersetin.....	9
Gambar 2.3.	Gambaran makroskopis daun <i>A. conyzoides</i> L.	10
Gambar 2.4.	Penampang melintang <i>A. conyzoides</i> L.	11
Gambar 2.5.	Serbuk daun <i>A. conyzoides</i> L.	11
Gambar 2.6.	Tipe sel pada tulang	17
Gambar 2.7.	Sendi sinovial	19
Gambar 2.8.	Respon imun <i>innate</i> / bawaan	25
Gambar 2.9.	Pengaruh sitokin mengaktivasi osteoklastogenesis pada AR	27
Gambar 2.10.	Pengaruh RANKL, RANK dan OPG pada <i>Hind Paw Joint</i>	28
Gambar 2.11.	Inflamasi, respon autoimun dan destruksi kartilago-tulang pada AR	29
Gambar 2.12.	Manifestasi klinis artikular dari AR	32
Gambar 2.13.	Pengaturan enzim siklooksigenase	34
Gambar 2.14.	Struktur metotreksat	36
Gambar 2.15.	Peradangan tulang <i>calcaneus</i> pada tikus model AR	40
Gambar 3.1.	Isolasi sendi pergelangan kaki tikus	56
Gambar 3.2.	Pemotongan sendi pergelangan kaki secara sagital / longitudinal	57
Gambar 4.1.	Hasil pengamatan telapak kaki tikus uji pendahuluan	63
Gambar 4.2.	Hasil pengamatan histopatologi uji pendahuluan	65
Gambar 4.3.	Ekstrak etanol daun babandotan	69
Gambar 4.4.	Hasil skrining fitokimia uji flavonoid	72
Gambar 4.5.	Hasil skrining fitokimia uji tanin	74
Gambar 4.6.	Hasil skrining fitokimia uji alkaloid	75
Gambar 4.7.	Hasil skrining fitokimia uji terpen-sterol	76
Gambar 4.8.	Hasil skrining fitokimia uji saponin	76
Gambar 4.9.	Hasil kromatogram ekstrak daun babandotan	77
Gambar 4.10.	Telapak kaki tikus dilihat dari sisi mendatar kaki dan permukaan telapak kaki pada hari ke-29	79
Gambar 4.11.	Telapak kaki tikus dilihat dari sisi mendatar kaki dan permukaan telapak kaki pada hari ke-50.....	80
Gambar 4.12.	Grafik perbandingan volume rata-rata edema tikus pada hari ke-29, 36, 43 dan 50 setelah diinduksi CFA pada semua kelompok perlakuan kecuali kelompok kontrol normal	85
Gambar 4.13.	Gambaran histopatologi membran sinovial sendi pergelangan kaki pada semua kelompok tikus	87

Gambar 4.14.	Grafik perbandingan skor sinovitis pada semua kelompok perlakuan	92
Gambar 4.15.	Osteoklas	93
Gambar 4.16.	Gambaran histopatologi osteoklas tulang <i>calcaneus</i> kaki tikus semua kelompok	95
Gambar 4.17.	Grafik perbandingan jumlah osteoklas rata-rata per mm ² tulang <i>calcaneus</i> tikus dengan pembesaran 200x & 400x	97



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Sendi yang terlibat pada AR (telah diolah kembali).....	30
Tabel 3.1.	Pembagian kelompok hewan uji	55
Tabel 4.1.	Volume rata-rata edema kaki tikus uji pendahuluan	64
Tabel 4.2.	Penurunan volume rata-rata edema kaki dengan pemberian metotreksat tiap kelompok pada hari ke-29, ke-36, ke-43 dan ke-50	67
Tabel 4.3.	Penetapan kadar air ekstrak etanol 70% daun babandotan ..	69
Tabel 4.4.	Penetapan kadar abu ekstrak etanol 70% daun babandotan	70
Tabel 4.5.	Penetapan kadar abu tidak larut asam ekstrak etanol 70% daun babandotan	71
Tabel 4.6.	Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol 70% daun babandotan	72
Tabel 4.7.	Volume telapak kaki tikus rata-rata pada hari ke-1,29,36,43 dan 50 setelah diinduksi CFA pada semua kelompok perlakuan kecuali kelompok kontrol normal	81
Tabel 4.8.	Volume rata-rata edema tikus dan persentase penghambatan edema rata-rata pada hari ke-1,29,36,43 dan 50 setelah diinduksi CFA pada semua kelompok perlakuan kecuali kelompok kontrol normal	82
Tabel 4.9.	Hasil pengamatan gambaran histopatologi AR berdasarkan skor sinovitis	91
Tabel 4.10.	Jumlah rata-rata osteoklas per lapang pandang dan per mm ² pada semua kelompok perlakuan pada hari ke-50	96

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Sertifikat determinasi daun babandotan (<i>Ageratum conyzoides L.</i>)	110
Lampiran 2	Sertifikat hewan uji (tikus)	111
Lampiran 3	Komposisi pakan <i>Rattus norvegicus</i>	112
Lampiran 4	Hewan uji dan alat yang digunakan dalam penelitian	112
Lampiran 5	Surat lolos kaji etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia	113
Lampiran 6	Alur skema penelitian anti-AR ekstrak etanol 70% daun babandotan	114
Lampiran 7	Tanaman babandotan (<i>Ageratum conyzoides L.</i>)	115
Lampiran 8	Alat yang digunakan dalam ekstraksi daun babandotan...	115
Lampiran 9	Sertifikat analisis etanol 70 %	116
Lampiran 10	Penghitungan dosis dan pembuatan suspensi ekstrak daun babandotan	117
Lampiran 11	Pembuatan larutan metotreksat	118
Lampiran 12	Cara penghitungan volume edema dan % penghambatan edema rata-rata pada kaki tikus	119
Lampiran 13	Alat yang digunakan saat pembuatan sediaan histopatologi	119
Lampiran 14	Tabel skoring gambaran histopatologis sinovitis kronik (Krenn, et al., 2006)	120
Lampiran 15	Alat pemeriksaan sediaan histopatologi	121
Lampiran 16	Sertifikat analisis CFA	122
Lampiran 17	Hasil uji sisa residu pestisida	123
Lampiran 18	Hasil skrining fitokimia Biofarmaka Bogor	124
Lampiran 19	Tabel volume telapak kaki tikus dan volume edema kaki tikus serta hasil statistika	125
Lampiran 20	Tabel skoring sinovitis dan hasil statistika	136
Lampiran 21	Tabel perhitungan jumlah osteoklas dan hasil statistika ..	140

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Artritis rematoid (AR) adalah penyakit inflamasi sistemik kronik dan progresif, yang menyerang sendi secara simetris dengan etiologi belum jelas (Schuna, 2005; Wells et al., 2009; Radis, 2012; Rosenbergh, 2013; Ikawati, 2014). Artritis rematoid termasuk penyakit autoimun pada sendi yang menyebabkan kerusakan kartilago dan tulang (Corwin, 2001; Stolina et al., 2005; Suarjana, 2009; Klareskog et al., 2009; Komatsu & Takayanagi, 2012). Penyakit ini secara luas dapat dikategorikan sebagai penyakit sendi yang berdampak pada gangguan tulang, kecacatan fisik, komplikasi sistemik dan kematian dini (McInnes & Schett, 2011). Gangguan muskuloskeletal merupakan penyebab morbiditas dan kecacatan, sehingga menimbulkan pengeluaran biaya kesehatan yang sangat besar sampai hilangnya pekerjaan karena cenderung diderita selama usia produktif (WHO, 2015).

Artritis rematoid menyebabkan gangguan pada sendi yang bertambah parah jika tidak diobati, juga keterbatasan aktivitas sehari-hari sampai kecacatan (Ikawati, 2014). Insiden kasus umumnya terjadi antara umur 15-45 tahun dan meningkat dengan bertambahnya usia, terutama menyerang pada wanita (3 kali lebih banyak dari laki-laki) (Schuna, 2005; Carter, 2006). Penyakit ini menyebabkan terjadinya degradasi tulang rawan (Sen, 2005; Wang et al., 2014) disertai erosi tulang sebagai ciri khasnya (Stolina et al., 2005; So et al., 1999; Schuna, 2005; Ikawati, 2014) dan dapat disertai gangguan sistemik termasuk gangguan kardiovaskular, pulmonal, dan skeletal (Suarjana, 2009; McInnes & Schett, 2011; Rosenbergh, 2013). Penyakit ini juga mempunyai hubungan dengan penanda genetik sebagai pengenal antigen seperti MHC (*Major histocompatibility complex*) yang ditandai HLA-DRB1 (Mourad & Monem, 2013; Scally et al., 2013; McInnes & Schett, 2011; Candon et al., 2001) dan HLA-DR4, penderita yang mempunyai HLA-DR4 mempunyai kemungkinan 3,5 kali lebih banyak terkena AR dari pada HLA-DR yang lain (Radis, 2012; Schuna, 2005).

Prevalensi penyakit ini bervariasi antara 0,3 % - 1 % dan lebih sering terjadi di negara maju, dan sekitar 50 % dari pasien di negara-negara maju tidak dapat bekerja penuh waktu (WHO, 2015). Sedangkan prevalensi penyakit sendi berdasarkan diagnosis tenaga kesehatan di Indonesia didapatkan 11,9 persen, dengan wilayah tertinggi di Bali (19,3%), diikuti Aceh (18,3%), Jawa Barat (17,5%) dan Papua (15,4%) (Riskesdas, 2013).

Pendekatan terapi AR yang saat ini banyak dilakukan adalah dengan terapi simptomatik dengan obat-obatan NSAID (*Non Steroid Anti Inflammatory Drug*) dan golongan kortikosteroid, namun obat-obatan ini hanya mengurangi gejala dari proses inflamasi. Sedangkan penggunaan obat golongan DMARD (*Disease Modifying Anti Rheumatic Drugs*) seperti metotreksat dapat menghambat perkembangan penyakit AR, dengan mengkonsumsi obat dalam jangka waktu yang lama (Wells et al., 2009). Metotreksat merupakan *first line therapy* yang digunakan dalam terapi dini bersama dengan obat golongan NSAID dan kortikosteroid, juga pada terapi lanjutan dengan obat anti-artritis rematoid lainnya (Schuna, 2005). Namun penggunaan jangka panjang dari obat-obatan ini dapat menyebabkan efek samping yang tidak diinginkan, seperti gangguan sistem saluran pencernaan (mual, muntah, tukak lambung dan perdarahan lambung), hematologi, pernafasan dan hepatotoksik (Schuna, 2005; Rahman et al., 2012). Diperlukan penelitian untuk mendapatkan obat baru yang dapat dipergunakan sebagai obat alternatif dalam penanganan AR, terutama berasal alam karena masyarakat menganggap obat yang berasal dari alam relatif lebih aman dan lebih sedikit menimbulkan efek samping daripada obat sintetik, tentunya hal ini perlu dibuktikan dengan penelitian lebih lanjut (Mun'im & Hanani, 2011). Salah satu tanaman tradisional yang mempunyai efek anti inflamasi adalah babandotan (*Ageratum conyzoides L.*). Tanaman ini banyak terdapat di lingkungan sekitar kita dan sudah sering digunakan masyarakat sebagai pereda nyeri dan inflamasi secara umum, namun belum banyak diketahui efeknya terhadap AR. Ekstrak etanol 70 % daun *Ageratum conyzoides L* yang mengandung metabolit sekunder terutama flavonoid telah dievaluasi untuk penanganan inflamasi (Moura et al., 2005; Awad et al., 2013). Hassan et al., (2012) menyebutkan bahwa ekstrak etanol daun babandotan dapat berperan sebagai anti inflamasi akut, dimana kandungan fitokimia flavonoid khususnya kuersetin

berperan didalamnya. Uji toksisitas akut dan kronik dari babandotan menunjukkan bahwa tanaman ini aman untuk digunakan (Moura et al., 2005; Diallo et al., 2010; Hassan et al., 2012). Diharapkan kandungan flavonoid dalam babandotan ini juga dapat berpotensi sebagai anti-arthritis rematoid. Oleh karena itu dilakukan penelitian ini untuk menganalisa efek anti-arthritis rematoid daun babandotan terhadap tikus model AR yang diinduksi CFA.

1.2 Perumusan masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka permasalahan yang dapat dirumuskan adalah apakah ekstrak etanol 70 % daun babandotan mempunyai potensi sebagai anti-arthritis rematoid dibandingkan dengan obat anti-arthritis rematoid yang saat ini digunakan ?

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Tujuan penelitian ini untuk mengevaluasi efek ekstrak etanol 70 % daun babandotan (*A. conyzoides L.*) yang dikarakterisasi sebagai anti-arthritis rematoid pada tikus model AR.

1.3.2 Tujuan khusus

- a. Mengkarakterisasi ekstrak etanol 70 % daun babandotan (*A. conyzoides L.*) yang berpotensi sebagai anti-arthritis rematoid pada tikus model AR.
- b. Mengevaluasi efek ekstrak etanol 70 % daun babandotan (*A. conyzoides L.*) dalam menghambat proses AR berupa volume edema kaki tikus model AR dengan menggunakan pembanding metotreksat
- c. Mengevaluasi efek ekstrak etanol 70 % daun babandotan (*A. conyzoides L.*) dalam menghambat proses AR berupa skor sinovitis pada gambaran histopatologi membran sinovial sendi pergelangan kaki tikus model AR dengan menggunakan pembanding metotreksat.
- d. Mengevaluasi efek ekstrak etanol 70 % daun babandotan (*A. conyzoides L.*) dalam menghambat proses AR berupa jumlah osteoklas pada tulang *calcaneus* tikus model AR dengan menggunakan pembanding metotreksat.

1.4 Hipotesa

Hipotesa H_0 pada penelitian ini adalah :

Ekstrak etanol 70 % daun babandotan mempunyai potensi sebagai anti-arthritis rematoid dibandingkan dengan obat anti-arthritis rematoid yang saat ini digunakan.

1.5 Manfaat penelitian

1.5.1 Manfaat teoritik

- a. Diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai tanaman obat tradisional yang tumbuh di Indonesia yaitu *A. conyzoides L.* yang dapat digunakan sebagai anti-arthritis rematoid
- b. Memberikan kontribusi ilmiah terhadap penelitian-penelitian lebih lanjut mengenai ekstrak daun *A. conyzoides L.* sebagai anti-arthritis rematoid

1.5.2 Manfaat praktis

Sebagai dasar ilmiah untuk mengkaji manfaat ekstrak daun *A. conyzoides L.* lebih lanjut sebagai anti-arthritis rematoid serta diharapkan dapat dikembangkan sebagai obat arthritis rematoid yang baru ataupun sebagai terapi komplementer dari terapi yang sudah ada.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman babandotan (*Ageratum conyzoides* L.)

Genus *Ageratum* berasal dari bahasa Yunani “*a geras*” yang berarti ‘*non-aging*’ atau tanaman yang berumur lama (Singh et al., 2013; Kamboj & Saluja, 2013). Babandotan di temukan di berbagai negara tropis dan sub tropis seperti di Afrika, Asia dan Amerika (Kamboj & Saluja, 2011; Singh et al., 2012; Bosi et al., 2013). *A. conyzoides* L. berasal dari Amerika. Di Indonesia, tanaman ini banyak ditemukan berupa tumbuhan liar dan lebih dikenal sebagai tumbuhan pengganggu (gulma).

Habitat *A. conyzoides* L. berupa tumbuhan semusim, tumbuh tegak atau bagian bawahnya terbaring. Tumbuh di ketinggian 1 sampai 2.100 meter di permukaan laut. Tanaman ini banyak ditemukan di kebun dan ladang, dapat pula ditemukan di perkarangan rumah, tepi jalan, tanggul dan sekitar saluran air. Jika telah layu, akan mengeluarkan bau yang tidak enak seperti bau kambing. *A. conyzoides* L. menghendaki tempat terbuka dan sangat mudah pemeliharaannya (BPOM, 2008).

2.1.1 Taksonomi *A. conyzoides* L.

Kerajaan : Plantae
Divisi : Tracheophyta
Sub Divisi : Spermatophyta
Kelas : Magnoliopsida
Bangsa : Asterales
Suku : Asteraceae
Marga : *Ageratum*
Jenis : *Ageratum conyzoides* L. (ITIS, 2015)

Sinonim :

A. ciliare Lour. (non Linn), *A. cordifolium* Roxb.

Nama umum : Babandotan, bandotan

Nama daerah : Sumatera: bandotan, daun tombak, siangit, tombak jantan, siangik kahwa, rumput tahi ayam. **Sunda:** babandotan. **Jawa:** bandotan, bandotan letik, bandotan beureum, bandotan hejo, jukut bau, ki bau, berokan, wedusan. **Madura :** dus wedusan. **Sulawesi :** dawet, lawet, rukut manooe, rukut weru (Depkes, 1989).

Nama Asing : Sheng hong ji (C), bulak manok (Tag.), ajganda, sahadevi (IP), billy goat weed, white weed, bastard agrimony (I), celestine, eupatoire bleue (Singh et al., 2013).

Nama Simplisia:

Agerati folium (daun babandotan)

2.1.2 Morfologi *A. conyzoides*

Batang : Tanaman ini mempunyai tinggi berkisar 30–90 cm dan bercabang. Batang berbentuk bulat berbulu tebal.

Daun : Daun tunggal bertangkai, letaknya saling berhadapan dan bersilang, helaian daun bulat telur dengan pangkal membulat dan ujung meruncing, tepi bergerigi, panjangnya 1-10 cm, lebar 0,5-7 cm, kedua permukaan daun merona dengan kelenjar yang terletak di permukaan bawah daun, berwarna hijau.

Bunga : Bunga majemuk berkumpul 3 atau lebih, berbentuk malai rata yang keluar dari ujung tangkai, biasanya berwarna biru hingga berwarna ungu, terkadang putih. Panjang bonggol bunga 6-8 mm, dengan tangkai yang berambut

Buah : Buah berbentuk bulat panjang berwarna hitam dan bentuknya kecil (BPOM, 2008; Singh et al., 2013). Gambar tanaman babandotan dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Keterangan : (a) Tanaman Babandotan; (b) daun; (c) batang; (d) akar

[Sumber : BPOM, 2008; Dokumentasi pribadi]

Gambar 2.1 *Ageratum conyzoides* L.

2.1.3. Kandungan kimia :

Penelitian fitokimia dari tanaman didapatkan komponen bioaktif seperti flavonoid, tanin, terpenoid, alkaloid, sterol dan kromen. Daun dan bunga *Ageratum conyzoides* mengandung flavonoid (terutama kuersetin), tanin, alkaloid, saponin, terpenoid/sterol dan polifenol. Daunnya juga mengandung asam amino, minyak asiri kumarin, ageratochromen, friedelin, β -sitosterol, stigmasterol, sulfur, dan kalium chlorida. Akar mengandung minyak asiri, alkaloid, dan kumarin (Kamboj & Saluja, 2013; Okunade, 2002; Hassan et al., 2012; Singh et al., 2013).

Ageratum conyzoides mengandung *polyoxygenated flavonoid*, termasuk *poly methoxylated flavone*, *polyhydroxyflavone* seperti scutellarein-5,6,7,4'-tetrahidroksiflavan, kuersetin, kuersetin-3-rhamnopyranosid, kaempferol,

kaempferol-3-rhamnopyranosid, dan kaempferol 3,7-diglukopiranosid (Okunade, 2002; Singh et al., 2013).

Dari minyak *Ageratum* didapatkan kandungan monoterpen dan sesquiterpen. Kandungan monoterpen yang terbanyak adalah sabinen dan β -pinen, β -pellandren, 1,8-cineol dan limonen, terpinen-4-ol dan α -terpineol. Sesquiterpen utama mengandung β -caryophyllen, δ -cadinen, caryophyllen epoxid, β -sesquippellandren. Komponen utama dari minyak esensial adalah 7-methoxy-2,2-dimethylchromen (precocin I) (Okunade, 2002; Singh et al., 2013).

Triterpen yang diisolasi dari tanaman berupa friedelin, dan sterol utamanya adalah β -sitosterol dan stigmasterol. Terdapat jenis sterol lainnya seperti brassicasterol dan dihidrobrassicasterol, spinasterol, dan dihidrospinasterol (Okunade, 2002; Singh et al., 2013).

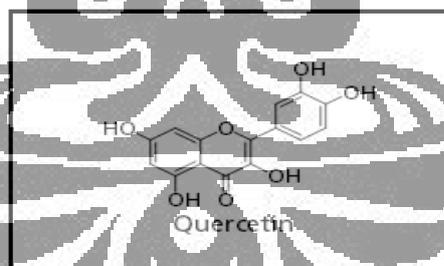
Licopsamin, dihidrolicopsamin dan asetil-licopsamin, merupakan alkaloid pyrrolizidin, yang dapat diisolasi dari tanaman ini (Bosi et al., 2013). Komponen lainnya meliputi echinatin, sesamin, aurantiamida acetat, asam fumarat, asam *caffaic*, *phytol*, HCN and hydrocarbon. Dari minyak biji mengandung asam oleat, palmitat, stearik, linoleat, linolenat dan asam hexadecanoat. Daun dan bunga mengandung fruktosa, ribosa dan glukosa dan vitamin B, sementara vitamin A dilaporkan didapatkan di bunga (Okunade, 2002; Singh et al., 2013).

2.1.4 Manfaat *A. conyzoides L.*

A. conyzoides L. ini telah digunakan secara tradisional di berbagai negara dalam beberapa pengobatan seperti anti peradangan dan anti bengkak, gangguan pencernaan (diare, disentri, kolik intestinal), penurun panas, menghentikan perdarahan, peluruh haid (emenagog), peluruh kencing (diuretik), peluruh kentut (karminatif), antijamur, sesak nafas, dan insektisida. Secara turun temurun *A. conyzoides L.* telah digunakan oleh masyarakat Indonesia untuk berbagai gangguan kesehatan, terutama sebagai anti peradangan (anti inflamasi). Babandotan belum banyak digunakan sebagai pengobatan arthritis rematoid, namun penelitian menunjukkan mempunyai potensi sebagai anti-arthritis rematoid (Kamboj & Saluja, 2008; Singh et al., 2013; Moura et al., 2005).

Studi epidemiologi menunjukkan babandotan dapat digunakan sebagai anti inflamasi / peradangan, kandungan aktif yang paling berpotensi adalah flavonoid. Dari penelitian Hassan et al., (2012), didapatkan ekstrak etanol daun babandotan mengandung metabolit sekunder berupa flavonoid, dengan kadar total diperoleh sebanyak 281,88 mg/g yang setara dengan kuersetin.

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam. Flavonoid terbagi lagi menjadi flavanon, flavonol, flavon, katekin, isoflavonoid, dan antosianidin (Durga et al, 2014). Kuersetin merupakan senyawa kelompok flavonol terbesar, dengan susunan kimianya dapat dilihat pada Gambar 2.2. Kuersetin dan glikosidanya berada dalam jumlah sekitar 60-75% dari flavonol yang mempunyai efek antioksidan yang kuat (Bellik et al., 2013). Kuersetin dapat menginduksi supresi sitokin pro-inflamasi, terutama TNF- α melalui penghambatan aktivasi NF- κ B dan dapat menghambat mekanisme konversi asam arakidonat menjadi prostaglandin (Ansari et al., 2014). Kuersetin dapat mengurangi perlekatan molekul pada sel endotel. Pada penelitian Al-Rekabi et al., (2014), didapatkan kuersetin berperan sebagai immunomodulator dengan menurunkan jumlah IL-6 dan ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*) serta dapat meningkatkan IL-10. Diharapkan flavonoid (kuersetin) dapat digunakan sebagai anti-arthritis rematoid karena mempunyai patofisiologi penyakit berdasarkan mekanisme inflamasi.



[Sumber : Bagalkotkar, et al., 2006]

Gambar 2.2 Susunan kimia kuersetin

2.1.5 Identifikasi simplisia daun *Ageratum conyzoides* L.

2.1.5.1 Organoleptik

Bau aromatik, khas babandotan, lama-lama agak menyebabkan mual, rasa agak pahit, agak kelat (Depkes RI, 1989).

2.1.5.2 Gambaran makroskopis daun *Ageratum conyzoides* L.

Helaian daun umumnya utuh, warna hijau sampai hijau tua atau hijau kelabu, berbentuk bundar telur, panjang 3-4 cm, lebar 1-2,5 cm, ujung daun runcing, pangkal daun tumpul, pinggir daun beringgit, tangkai daun 0,5 – 3 cm, tulang daun pada permukaan atas dan bawah berambut, daun muda agak berambut padat, warna rambut keputih-putihan, tulang daun menyirip (Depkes RI, 1989). Gambar makroskopis daun terlihat di Gambar 2.3.

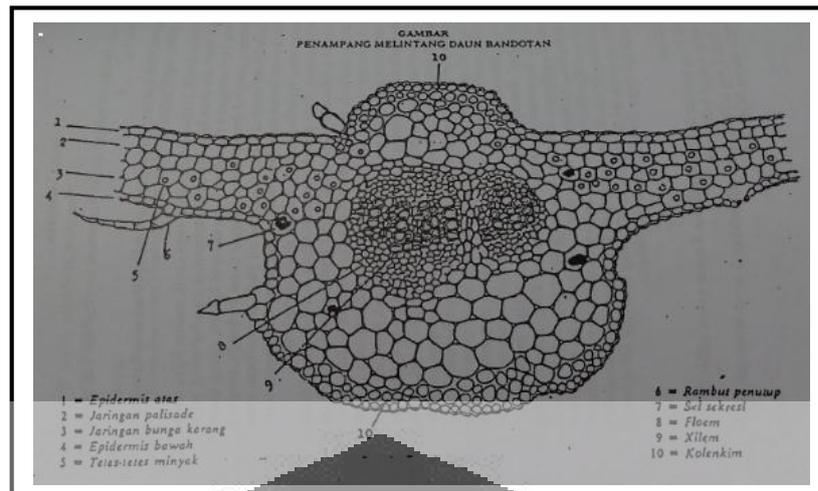


[Sumber : Dokumentasi pribadi]

Gambar 2.3 Gambaran makroskopis daun *A.conyzoides* L.

2.1.5.3 Gambaran mikroskopis daun *Ageratum conyzoides* L.

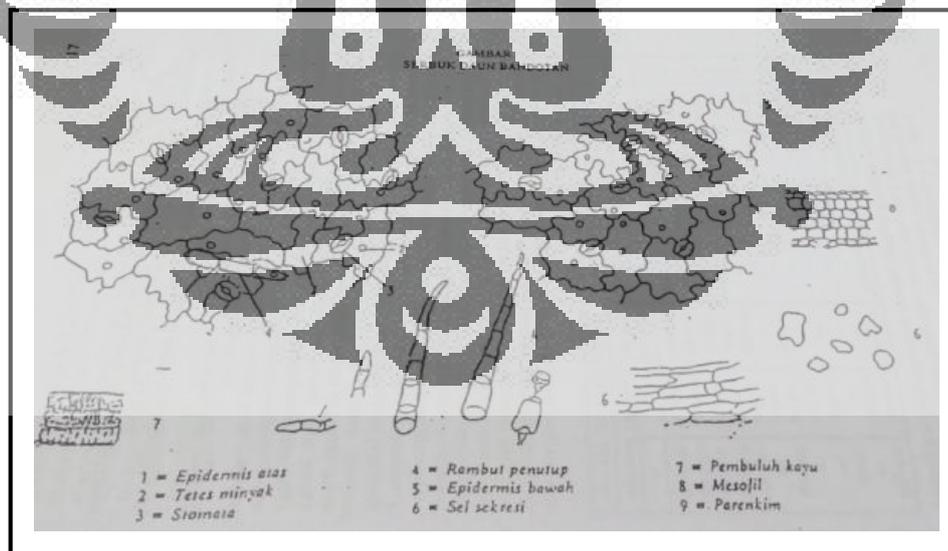
Pada penampang melintang melalui tulang daun tampak epidermis atas terdiri dari 1 lapis sel berbentuk segiempat, kutikula tebal berbintik-bintik, stomata sedikit, rambut penutup terdiri dari 2-5 sel. Epidermis bawah terdiri dari satu lapis sel berbentuk segi empat, kutikula tebal berbintik-bintik, stomata lebih banyak daripada epidermis atas. Mesofil meliputi jaringan palisade terdiri dari 1 lapis sel. Jaringan bunga karang terdiri dari 3-4 lapis sel, terdapat sel sekresi dan sel yang berisi tetes minyak. Berkas pembuluh tipe kolateral. Pada sayatan paradermal tampak epidermis atas dan epidermis bawah berbentuk tidak beraturan, dinding bergelombang, stomata tipe anomositik. Penampang melintang daun secara mikroskopis terlihat pada Gambar 2.4.



[Sumber : Depkes RI, 1989]

Gambar 2.4 Gambaran mikroskopis penampang melintang daun *A. conyzoides* L.

Serbuk daun babandotan berwarna hijau tua kecoklatan. Fragmen pengenal adalah epidermis atas dinding bergelombang, bentuk tidak beraturan, terdapat tetes-tetes minyak, stomata tipe anomositik, epidermis bawah dinding bergelombang, terdapat tetes minyak. Rambut penutup panjang, ujung tumpul terdiri dari beberapa sel. Jaringan mesofil yang terdapat sel sekresi. Pembuluh kayu dengan penebalan tangga (Depkes RI, 1989). Serbuk daun babandotan dapat dilihat pada Gambar 2.5.



[Sumber : Depkes RI, 1989]

Gambar 2.5 Serbuk daun *A. conyzoides* L.

2.1.5.4 Persyaratan simplisia daun *Ageratum conyzoides L.*

Pemeriksaan kadar dari simplisia daun *A. conyzoides L.* yang didapatkan mempunyai syarat berupa kadar abu pada daun tidak lebih dari 13 %, kadar abu yang tidak larut dalam asam pada daun tidak lebih dari 2,5 %, kadar sari larut dalam air pada daun tidak kurang dari 27%, kadar sari larut dalam etanol di daun tidak kurang dari 41 %. Dan didapatkan bahan organik asing daun tidak lebih dari 2 %. (Depkes RI, 1989).

2.1.6 Standarisasi ekstrak *Ageratum conyzoides L.*

Metode dan hasil penetapan parameter ekstrak, terdiri atas ;

a. Parameter non spesifik

Parameter non spesifik terdiri dari parameter yang mempunyai batasan berbeda pada setiap ekstrak seperti kadar air, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam. Dapat pula sama dengan kadar sisa pelarut organik, residu pestisida untuk fosfor dan klor organik, cemaran logam berat dan cemaran mikroba.

Batasan pada parameter non spesifik tersebut adalah : kadar air ekstrak tidak lebih dari 10 %, kadar abu tidak lebih dari 1,20 % dan kadar abu tidak larut asam tidak lebih dari 0,06 % (Depkes, 2011). Batasan sisa pelarut organik tidak lebih dari 1,0%; residu pestisida untuk fosfor dan klor organik tidak lebih dari 5µg/kg; cemaran logam berat Pb (tidak lebih dari 10 mg/kg), Cd (tidak lebih dari 0,3 mg/kg) dan As (tidak lebih dari 5 µg/kg); cemaran mikroba (angka lempeng total tidak lebih dari 10⁴ kol/g, angka kapang tidak lebih dari 10³ kol/g, MPN koliform negatif dan mikroba patogen negatif) (BPOM, 2006).

b. Parameter spesifik

Senyawa identitas dan kandungan kimia dalam ekstrak dipaparkan secara kualitatif dengan profil kromatografi lapis tipis (KLT) dan secara kuantitatif dengan metode penetapan kadar yang sesuai (BPOM, 2006).

2.1.7 Metode ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstrak mengandung bahan aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak larut

(Depkes, 2000). Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan (Depkes, 1989). Hasil ekstraksi disebut sebagai ekstrak yaitu sediaan kering, kental atau cair yang diperoleh dengan menyari senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan dan diluar pengaruh cahaya matahari langsung (Depkes, 2000; Depkes, 2011; Hanani, 2016).

Metode ekstraksi dengan cara dingin dapat dilakukan dengan maserasi dan perkolasi, sedangkan cara panas dapat dilakukan dengan cara refluks, soxhlet dan destilasi uap. Penggunaan ekstraksi dengan cara panas dapat dilakukan apabila metabolit sekundernya bersifat termostabil. Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Soxhlet adalah ekstraksi yang menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat soxhlet sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Sedangkan destilasi uap merupakan salah satu metoda untuk menyari minyak atsiri pada tanaman, dimana minyak atsiri akan tertarik bersamaan uap air lalu didinginkan melalui kondensor untuk ditampung (Depkes, 2000; Elya et al., 2015).

2.1.7.1 Metode ekstraksi dengan maserasi

Maserasi adalah metode ekstraksi simplisia dengan cara merendam simplisia dengan pelarut pada suhu kamar yang dilakukan dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan sehingga diperoleh konsentrasi pada keadaan kesetimbangan. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan dengan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya. Pengulangan ini dilakukan agar tidak terdapat lagi kandungan kimia yang dapat disari oleh pelarut yang digunakan. Hasil yang diperoleh dari maserasi ini disebut maserat atau ekstrak cair, dan selanjutnya pelarutnya akan diuapkan kembali sehingga diperoleh ekstrak kental atau ekstrak kering (Depkes, 2000; Elya et al., 2015).

Metode ekstraksi yang digunakan tergantung pada jenis, sifat fisik, dan sifat kimia kandungan senyawa yang akan diekstraksi dan pelarut yang digunakan tergantung pada polaritas senyawa yang akan disari (Hanani, 2016). Simplisia yang digunakan dapat berupa serbuk, potongan kecil atau irisan dari bagian tanaman yang sudah dikeringkan atau dalam keadaan segar. Pengeringan simplisia dilakukan agar simplisia ini dapat disimpan dalam jangka waktu lama, karena pengeringan dapat menghentikan reaksi enzimatik yang terdapat pada tanaman dan dapat melindungi dari pertumbuhan jamur. Maserasi dapat dilakukan dengan menggunakan satu macam pelarut atau beberapa pelarut yang ditingkatkan kepolarannya (maserasi bertingkat). Maserasi dengan satu macam pelarut dilakukan dengan pertimbangan pelarut tersebut sudah dapat menarik semua kandungan kimia pada simplisia atau didapat dari hasil kajian literatur (Elya et al., 2015).

2.1.7.2 Kromatografi lapis tipis (KLT)

Kromatografi merupakan suatu prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi differensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase (fase diam dan fase gerak). Fase diam bertindak sebagai penyerap, contohnya silika gel. Fase gerak membawa zat terlarut melalui media, hingga terpisah dari zat terlarut lainnya. Umumnya zat terlarut dibawa melewati media pemisah oleh aliran suatu pelarut berbentuk cairan atau gas yang disebut eluen (Depkes, 2011).

Jenis kromatografi dalam analisis kualitatif dan kuantitatif yang digunakan dalam penetapan kadar dan pengujian pada FHI adalah Kromatografi lapis tipis (KLT), Kromatografi gas (KG) dan Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). KLT umumnya lebih banyak digunakan untuk tujuan identifikasi, karena mudah dan sederhana serta memberikan pilihan fase diam yang lebih luas dan berguna untuk pemisahan masing-masing senyawa secara kuantitatif dari suatu campuran. KG dan KCKT keduanya membutuhkan peralatan yang lebih rumit dan memerlukan bahan dalam jumlah yang sangat kecil (Depkes, 2011; Hanani, 2016).

Secara luas KLT banyak digunakan untuk berbagai analisis tumbuhan obat. Kromatogram yang dihasilkan berupa pola yang menggambarkan senyawa dalam setiap tumbuhan obat sehingga bermanfaat dalam kendali mutu tumbuhan obat baik pencirian bahan mentah maupun produk akhir. Beberapa faktor yang menunjang

teknik KLT diantaranya, 1) fase diam; ukuran partikel penunjang fase diam berperan penting, semakin kecil dan seragam akan meningkatkan daya pemisahan. Fase diam yang paling banyak digunakan untuk KLT adalah silika gel karena silika mempunyai kekuatan pemisahan yang sangat baik. 2) Penotolan larutan; penotolan dapat dilakukan secara manual dan otomatis. 3) Fase gerak; pemilihan fase gerak sangat penting dalam teknik KLT, dipilih berdasarkan absorben yang digunakan pada fase diam dan struktur komponen yang akan dipisahkan, komposisi yang digunakan harus sesederhana mungkin. 4) Bejana kromatografi; berbagai macam bejana kromatografi dapat digunakan sesuai dengan metode yang ada (Puspita, 2009).

Pada KLT dilakukan penotolan larutan uji, larutan pembanding dan suatu campuran larutan uji dan pembanding dalam jumlah yang kurang lebih sama pada lempeng tipis. Perbandingan jarak rambat suatu senyawa tertentu terhadap jarak rambat fase gerak, diukur dari titik penotolan sampai titik yang memberikan intensitas maksimum pada bercak, dinyatakan sebagai harga senyawa tersebut. Perkiraan identifikasi diperoleh dengan pengamatan bercak dengan nilai R_f (jarak rambat dengan intensitas maksimum) yang identik dan ukuran yang hampir sama. Penetapan letak bercak yang dihasilkan KLT dapat ditetapkan dengan: pengamatan langsung, ultra violet gelombang pendek (254 nm) atau gelombang panjang (366 nm) dan pengamatan setelah disemprot larutan penampak bercak (Depkes, 2011; Hanani, 2016).

2.2 Tulang dan sendi

2.2.1 Tulang

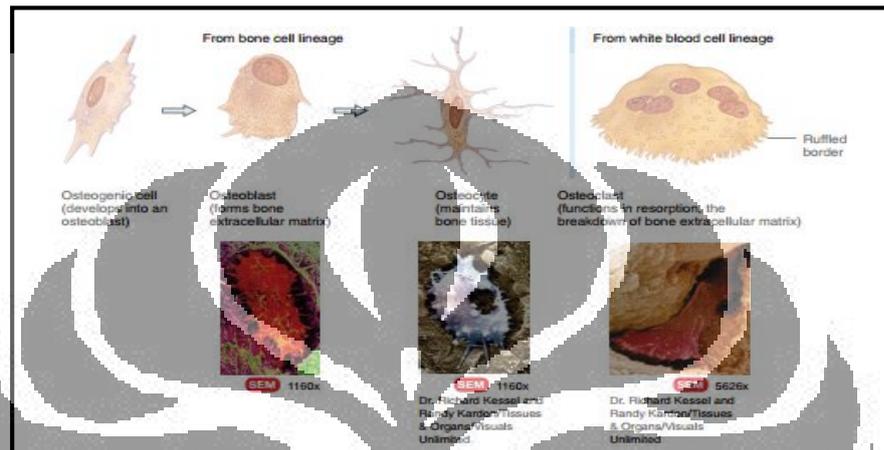
Tulang adalah organ vital yang berfungsi untuk alat gerak pasif, proteksi alat-alat gerak didalam tubuh, pembentuk tubuh, metabolisme kalsium dan mineral dan organ hematopoetik (Setiyohadi, 2009). Tulang merupakan jaringan yang kompleks dan dinamis, dimana secara terus menerus melakukan remodeling yaitu proses konstruksi tulang baru dan perbaikan dari tulang yang telah rusak/tua. Proses ini memerlukan kerjasama antar tulang dengan kartilago, dan bersama dengan ligamen dan tendon membentuk sistem skeletal (Tortora & Derrickson, 2012).

Sebagaimana jaringan ikat lainnya, tulang terdiri dari komponen matrik dan sel. Matrik tulang terdiri dari serat-serat kolagen dan protein non kolagen.

Sedangkan sel tulang terdiri dari osteoblas, osteoklas dan osteosit (Setiyohadi, 2009). Komponen non seluler utama dari tulang adalah mineral dan matrik organik (kolagen dan proteoglikan). Kalsium dan fosfat membentuk suatu garam kristal (hidroksiapatit), yang tertimbun pada matrik kolagen dan proteoglikan. Mineral-mineral inilah yang memampatkan kekuatan tulang. Matrik organik tulang disebut juga osteoid yang sebagian besar merupakan kolagen yang kaku. Asam hialuronat juga merupakan salah satu matrik organik pembentuk tulang (Carter, 2006; Dudek, 2001).

Secara umum tipe sel pada jaringan tulang, yaitu : (1) osteoblast, yang merupakan sel pembentuk tulang. Sel ini mensintesa dan menghasilkan kolagen dan komponen organik yang dibutuhkan untuk pembuatan matrik ekstra selular dari tulang dan sel ini selanjutnya menjadi osteosit (Tortora & Derrickson, 2012). Dibawah mikroskop cahaya, osteoblas tampak memiliki inti yang bulat pada basal yang berdekatan dengan permukaan tulang. Osteoblas tampak melapisi matriks tulang yang diproduksinya sebelum dikalsifikasi (Setiyohadi, 2009). (2) Osteosit, yang merupakan tulang yang matur dan mempertahankan jaringan tulang. Sel ini menjaga metabolisme seperti pergantian nutrisi dan pembuangannya ke darah (Tortora & Derrickson, 2012). Sel ini memiliki juluran sitoplasma yang menghubungkan antara satu osteosit ke osteosit lainnya dan juga *bone lining cell* dipermukaan tulang. Sekali osteoblas selesai mensintesis osteosit, maka osteoblas akan langsung menjadi osteosit dan terbenam dalam osteosit yang disintesisnya (Setiyohadi, 2009). (3) Osteoklas, merupakan sel *multinukleated* yang terbentuk dari banyak monosit-makrofag (Miyamoto & Suda, 2003; Udagawa et al., 2002; Karmakar et al., 2010). Sel ini dapat mengeluarkan enzim lisosomal dan asam yang dapat merusak komponen protein dan mineral pada matrik tulang ekstraselular (Tortora & Derrickson, 2012). Sel ini bertanggung jawab terhadap resorpsi tulang. Pada tulang trabekular osteoklas akan membentuk cekungan pada permukaan tulang yang aktif yang disebut lakuna *howship*, sedangkan pada tulang kortikal osteoklas akan membentuk kerucut sebagai hasil resorpsinya yang disebut *cutting cone* dan osteoklas berada di apeks kerucut tersebut (Setiyohadi, 2009). Berbeda dari osteoblas yang berasal dari mesenkimal stem sel, osteoklas berasal dari hematopoetik stem sel (Miyamoto & Suda, 2003; Udagawa et al., 2002).

Osteoblas mengekspresikan reseptor estrogen dan reseptor vitamin D, berbagai sitokin, seperti *reseptor Activator of nuclear factor kappa B ligand* (RANKL) dan osteoprotegerin (OPG). RANKL berperan pada maturasi prekursor osteoklas karena prekursor osteoklas memiliki reseptor RANK pada permukaannya dan efek RANKL dihambat oleh OPG (Aeschlimann & Evans, 2004; Setiyohadi, 2009). Gambar 2.6 Berikut menggambarkan macam macam tipe sel pada tulang.



[Sumber : Tortora & Derrickson, 2012]

Gambar 2.6 Tipe sel pada tulang

Secara fisiologis tulang mengalami remodeling berupa pembentukan dan resorpsi tulang pada suatu tingkat yang konstan, kecuali pada masa pertumbuhan usia kanak-kanak, terjadi lebih banyak pembentukan daripada resorpsi tulang, yang dibantu dengan vitamin D dan hormon PTH (Paratiroid Hormon) (Carter, 2006). Ketidakseimbangan antara pembentukan tulang oleh osteoblas dan resorpsi tulang oleh osteoklas dapat menyebabkan gangguan seperti osteopetrosis (gangguan osteoklastogenesis atau gangguan fungsi osteoklas), osteoklerosis (peningkatan pembentukan tulang), dan osteoporosis (peningkatan resorpsi tulang). Perkembangan osteoklas diawali dari hematopoetik stem sel menjadi sel progenitor monosit-makrofag lalu menjadi mononuklear osteoklas dan selanjutnya terjadi fusi beberapa mononuklear osteoklas menjadi multinuklear osteoklas yang mempunyai fungsi resorpsi tulang yang kuat. Pembentukan osteoklastogenesis ini dipengaruhi oleh M-CSF (*Macrophage-Colony Stimulating Factor*) dan ikatan RANKL-RANK (*Reseptor Activator of Nuklear Factor-kB*) serta beberapa mediator kimia/sitokin

seperti TNF- α , IL-1, IL-6 dan IL-17 (Miyamoto & Suda, 2003; Udagawa et al., 2002; Braun & Zwerina, 2011).

2.2.2. Kartilago / tulang rawan sendi

Kartilago merupakan jaringan ikat khusus yang tidak mempunyai vaskularisasi dan jaringan syaraf yang melapisi permukaan tulang dari sendi diartrosis (sendi yang dapat bergerak bebas), yang berfungsi sebagai bantalan saat menerima beban benturan saat gerakan sendi. Tulang pada sendi sinovial dilapisi oleh lapisan kartilago hialin yang disebut kartilago artikular (Carter, 2006; Setiyohadi, 2009; Tortora & Derrickson, 2012).

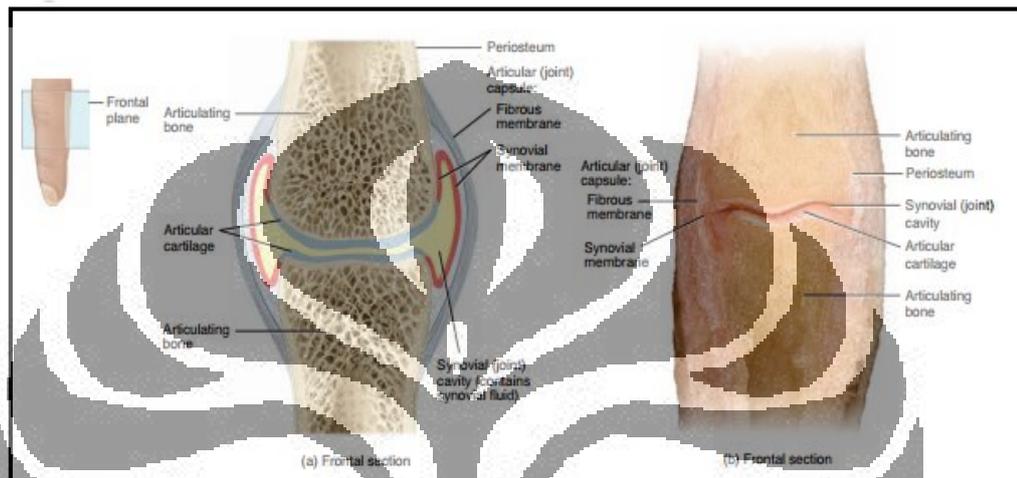
Kartilago memiliki satu sel spesialis yang berperan dalam sintesis dan pemeliharaan matrik ekstraselular yang dikenal dengan kondrosit. Kartilago terdiri dari zona superfisial (tangensial), zona tengah (intermedia/transisional), zona dalam (radial) dan zona kalsifikasi, yang bentuk selnya semakin keluar semakin tinggi densitasnya dan semakin pipih. Matrik rawan sendi terutama terdiri dari air, proteoglikan, dan kolagen. Bersama asam hialuronat, proteoglikan membentuk agregat yang dapat menghisap air dari sekitarnya sehingga membentuk bantalan yang berfungsi sebagai tulang rawan sendi. Kolagen rawan sendi terutama tipe II, berfungsi sebagai kerangka untuk membatasi pengembangan berlebihan dari agregat proteoglikan. Kolagen ini didegradasikan oleh enzim proteolitik yang disekresi oleh kondrosit dan sinoviosit, antara lain MMP (seperti kolagenase dan stromelisin/MMP3) dan ADAMT (Isbagio, 2009; Mohammed et al., 2015). Berbagai sitokin juga berperan dalam degradasi kolagen dan proteoglikan dan menghambat sintesa proteoglikan, seperti IL-1 dan TGF- β (Isbagio, 2009).

2.2.3. Sendi

Sendi atau artikulasi adalah pertemuan antara dua tulang atau antara tulang dan tulang rawan. Pembagian sendi berdasarkan dua klasifikasi, yaitu :

- a. Ada tidaknya ruangan antar sendi tulang
- b. Tipe jaringan penyambung antar tulang (sendi fibrosa, sendi kartilago dan sendi sinovial) (Tortora & Derrickson, 2012).

Kapsul sendi terdiri dari selaput penutup fibrosa padat, (yaitu berupa lapisan dalam yang terbentuk dari jaringan ikat dengan pembuluh darah yang banyak), dan membran sinovial (sinovium) yang membentuk suatu kantung melapisi seluruh sendi. Bentuk sendi sinovial unik karena memiliki ruangan yang disebut ruangan sinovial antar pertemuan tulang. Gambaran sendi sinovial dapat dilihat pada gambar Gambar 2.7.



[Sumber : Tortora & Derrickson, 2012]

Gambar 2.7 Sendi sinovial

Permukaan dalam kapsul sendi dilapisi oleh membran sinovial (sinovium) tetapi tidak sampai permukaan rawan sendi. Membran sinovial merupakan jaringan avaskular, yang tersusun dari 1-2 lapis sel sinovial (sinoviosit) yang menutupi jaringan subsinovial dibawahnya tanpa dibatasi oleh membran basalis. Walaupun banyak pembuluh darah dan limfe di dalam jaringan subsinovial, tetapi tidak ada yang mencapai lapisan sinoviosit. Sel sinoviosit terdiri dari 2 tipe, sinoviosit tipe A (20-30%) yang mempunyai banyak persamaan dengan makrofag, dan tipe B (70-80%) yang mempunyai persamaan dengan fibroblas. Sinoviosit tipe A berfungsi melepaskan debris sel kedalam rongga sendi, sedangkan sinoviosit tipe B berperan mensintesis dan mensekresikan hialuronat yang merupakan zat aditif dalam cairan sendi dalam mekanisme lubrikasi dan juga berperan dalam proses remodeling tulang (Isbagio, 2009; Smith, 2011).

Pada rongga sinovial terdapat cairan sendi yang dihasilkan oleh membran sinovial. Kartilago sendi dan tulang yang membentuk sendi, normalnya terpisah

dengan adanya cairan sinovial. Cairan sinovial ini normalnya berwarna bening, jernih atau kekuningan berisi asam hialuronik yang dihasilkan oleh sinoviosit tipe B di membran sinovial (*fibroblast-like sinoviocyt*) dan cairan dari plasma darah. Jumlah yang ditemukan pada tiap-tiap sendi normal relatif kecil (1-3 ml). Hitung sel darah putih pada cairan ini normalnya kurang dari 200 sel/ml dan terutama terdiri dari sel MN. Asam hialuronidase adalah senyawa yang bertanggung jawab terhadap viskositas cairan sinovial dan dihasilkan oleh sel pembungkus sinovial. Cairan ini melindungi kapsul articular dan mengurangi gesekan dengan melumasi sendi. Cairan ini juga mengandung sel fagosit yang berperan mengatasi mikroba dan debris yang ada di sendi (Carter, 2006; Tortora & Derrickson, 2012).

Sel-sel yang terdapat di jaringan ikat sendi ada dua macam, yaitu (1) Sel yang tetap berada dalam jaringan ikat, contohnya : fibroblas, kondrosit dan osteoblas, yang mensintesis serat (kolagen dan elastin) serta proteoglikan jaringan. (2) Sel yang tidak tetap / berkembang pada jaringan ikat, contohnya: sel mast, sel plasma, limfosit, monosit dan lekosit PMN, yang nantinya memegang penting dalam proses imun atau peradangan pada penyakit rematik. Sel-sel ini dapat memasuki jaringan ikat dari darah dan secara teratur diganti (Carter, 2006; Dudek, 2001).

2.3 Inflamasi

Pertahanan hidup organisme mengharuskan terjadinya eliminasi terhadap benda asing yang masuk ke tubuh, misalnya agen yang mengakibatkan infeksi dan jaringan yang rusak, dimana fungsi ini dibantu oleh respon tubuh kompleks. Inflamasi merupakan respon perlindungan yang melibatkan sel tubuh, pembuluh darah serta protein dan mediator lain untuk mengeliminasi penyebab kerusakan sel dan memulai proses pemulihan jaringan (Baratawidjaya & Rengganis, 2012). Reaksi proses peradangan dapat berlebihan (infeksi berat), berkepanjangan maupun tidak tepat (sehingga menyebabkan penyakit autoimun) (Rosenbergh, 2013).

Inflamasi bisa bersifat akut atau kronik. Inflamasi akut terjadi cepat, berlangsung beberapa jam sampai hari, dan terdapat gambaran khas timbul cairan dan eksudasi protein plasma serta akumulasi lekosit dan netrofil. Reaksi inflamasi dapat berhenti sendiri atau responsif terhadap terapi, bila terapi gagal maka proses

inflamasi kronis dapat terjadi (Baratawidjaya & Rengganis, 2012). Reaksi inflamasi kronik terjadi secara bertahap dan waktunya lebih lama (hari sampai tahun), dan ditandai timbunan limfosit dan makrofag, disertai proliferasi vaskular dan fibrosis (jaringan parut). Inflamasi diinduksi oleh mediator kimia yang dihasilkan oleh sel tubuh untuk merespon stimulus, sehingga sel tubuh terutama makrofag, sel dendrit, sel mast mensekresi sitokin atau mediator kimia lainnya untuk mengatur respon inflamasi berikutnya. Manifestasi inflamasi seringkali disebut tanda kardinal, yaitu keadaan dimana terdapat tanda panas (kalor), kemerahan (rubor), edema/bengkak (tumor), nyeri (dolor) dan hilangnya fungsi. Komponen utama inflamasi adalah reaksi vaskuler berupa vasodilatasi dan permeabilitas vaskuler meningkat dengan mediator kimia seperti prostaglandin dan histamin dan respon sel berupa masuknya lekosit terutama netrofil/PMN dari sirkulasi ke tempat inflamasi dengan mediator kimia seperti IL-1 dan TNF- α (Baratawidjaya & Rengganis, 2012; Rosenbergh, 2013).

Inflamasi akut dapat berkembang menjadi inflamasi kronik apabila sulit ditanggulangi, seperti infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Inflamasi kronik juga dapat timbul dari pengaktifan berlebihan dari sistem imun, sehingga menyerang jaringan tubuh sendiri dan menyebabkan penyakit autoimun, misalnya artritis reumatoid (Radji, 2015). Kombinasi inflamasi berkepanjangan dan berulang, destruksi jaringan dan fibrosis merupakan tanda inflamasi kronik yang meliputi interaksi kompleks berbagai sel dan mediator yang disekresikan. Sel yang berperan terutama adalah makrofag (yang berasal dari monosit darah yang keluar ke tempat radang) dan limfosit (sel T dan B). Makrofag akan menyajikan antigen ke sel T dan menghasilkan sitokin yang menstimulasi respon sel T. Limfosit T yang teraktivasi juga akan mengaktifasi makrofag dan meningkatkan timbulnya antigen dan sekresi sitokin, sehingga terus mempertahankan inflamasi kronik (Rosenbergh, 2013).

Sitokin merupakan produk polipeptida yang berfungsi sebagai mediator inflamasi dan respon imun. Sitokin utama pada inflamasi akut antara lain TNF- α , IL-1, IL-6 dan kemokin (kelompok sitokin yang berfungsi untuk kemoatraktan). TNF- α dan IL-1 diproduksi oleh sel yang teraktifkan, termasuk makrofag, sel mast, sel endotel, yang sekresinya distimulasi oleh produk mikroba, kompleks imun ataupun limfosit T. TNF- α dan IL-1 dapat menstimulasi ekspresi molekul adesi

pada sel endotel, meningkatkan dan mengerahkan lekosit, meningkatkan produksi sitokin lain dan eikosanoik. IL-1 dapat mengaktifkan fibroblas, dan meningkatkan proliferasi dan produksi ekstraselular matrik. Sitokin ini dapat masuk sirkulasi dan menginduksi reaksi fase akut sistemik yang berhubungan dengan penyakit infeksi dan inflamasi (Baratawidjaya & Rengganis, 2012; Rosenbergh, 2013).

2.3.1 Respon imun

Sistem imun merupakan kumpulan sel yang bertanggung jawab untuk mempertahankan tubuh terhadap berbagai mikroba patogen yang terdapat di lingkungan. Respon imun tubuh yang tidak tepat atau berlebihan dapat menyebabkan penyakit imunitas. Pertahanan tubuh terhadap mikroba terdiri dari dua jenis, yaitu imunitas bawaan/alami/non spesifik (seperti penyangga epitel dari kulit, saluran GI dan saluran respiratorik) dan imunitas adaptif/didapat/spesifik yang normalnya tidak aktif dan akan bereaksi bila ada mikroba infeksi untuk menetralkannya. Ada dua jenis reaksi imun adaptif, yaitu imunitas humoral (yang diperantarai protein terlarut/antibodi dan diproduksi limfosit B) dan imunitas seluler yang diperantarai limfosit T (Radji, 2015; Rosenbergh, 2013).

Limfosit T / sel T berasal dari timus, yang merupakan 60-70% limfosit di darah. Sel T dapat mengenal fragmen peptida dari antigen protein yang terikat pada MHC untuk menerima atau menolaknya. Sel penyaji (APC) menangkap mikroba / antigen lain untuk membawanya ke organ limfoid dan menyajikannya kepada limfosit untuk dikenal melalui MHC. APC yang paling efisien adalah sel dendrit, yang berada didalam dan dibawah lapisan epitel dan sebagian besar jaringan. Limfosit T dalam pertahanan tubuh terhadap mikroba dapat berperan langsung dengan cara membunuhnya (limfosit T-pembunuh/CD8+) ataupun tidak langsung melalui mediator/sitokin (limfosit T-penolong/CD4+). Sedangkan limfosit B berasal dari sumsum tulang, yang dapat memproduksi antibodi. Sel B mengenal antigen dengan adanya antibodi yang terikat pada membrannya. Setelah terstimulasi sel B berdiferensiasi menjadi sel plasma yang dapat mensekresi antibodi dalam jumlah banyak, dan berfungsi sebagai mediator imunitas humoral. Terdapat lima kelas dari immunoglobulin yaitu IgG, IgM, IgA, IgE dan IgD (Radji, 2015; Rosenbergh, 2013).

Individu normal tidak bereaksi terhadap antigen sendiri/self. Adanya reaksi imun terhadap antigen diri/self dapat menyebabkan penyakit autoimun yang dapat menyebabkan kerusakan setempat sampai sistemik. Dalam keadaan normal kompleks imun (antigen-antibodi) dalam sirkulasi diikat dan diangkut ke hati dan limpa untuk difagosit oleh sel MN, bila keadaan ini tidak terjadi maka kompleks imun akan tetap berada di sirkulasi dan akan menyebabkan gangguan bila mengendap di jaringan. Salah satu penyakit yang berhubungan dengan inflamasi kronik dan gangguan autoimun dengan menghasilkan kompleks imun pada sendi adalah artritis rematoid (Baratawidjaya & Rengganis, 2012).

2.4 Artritis rematoid

2.4.1 Definisi dan etiologi

Artritis adalah suatu istilah yang berasal dari bahasa Yunani (*arthro* : sendi -*itis*: peradangan), yaitu sekelompok kondisi yang melibatkan kerusakan/peradangan pada sendi tubuh (Ikawati, 2014). Artritis rematoid (AR) adalah penyakit inflamasi sistemik kronik dan progresif, yang menyerang sendi secara simetris dengan etiologi belum jelas (Schuna, 2005; Wells et al., 2009; Radis, 2012; Rosenbergh, 2013; Ikawati, 2014). Penyakit ini tidak diketahui sebabnya secara pasti, namun termasuk penyakit autoimun karena terjadi kelainan sistem imun, dan biasanya ditemukan adanya destruksi tulang dan sendi yang progresif (Corwin, 2001; Stolina et al., 2005; Suarjana, 2009; Klareskog et al., 2009; McInnes & Schett, 2011; Komatsu & Takayanagi, 2012). Manifestasi klinis klasik pasien AR adalah poliartritis simetris yang terutama mengenai sendi-sendi kecil pada tangan dan kaki (Suarjana, 2009).

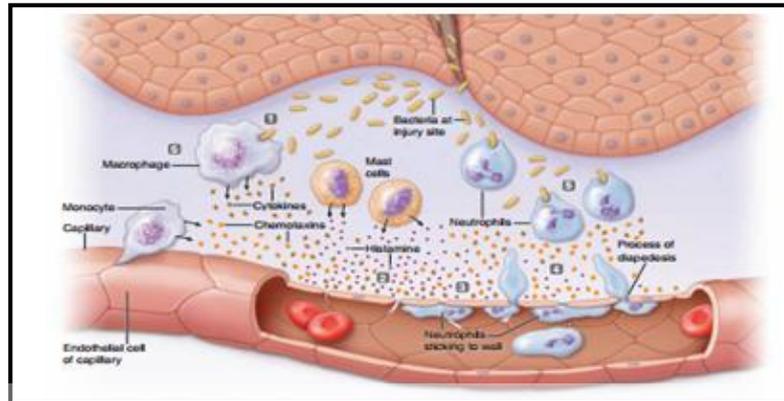
Penyakit ini ada hubungannya dengan penanda genetik HLA-DRB1 dan HLA-DR4, alel HLA ini mempermudah pengenalan dan ikatan antara APC dan limfosit T sehingga meningkatkan kemungkinan insiden menderita AR (Candon et al., 2001; Carter, 2006; Wells et al., 2009; Scally & Peterson, 2013; Mourad & Monem, 2013).

2.4.2 Epidemiologi

AR terjadi dua setengah kali lebih banyak pada wanita dari pada laki-laki. Kejadiannya meningkat dengan bertambahnya usia, dan insiden umumnya terjadi pada usia produktif yaitu 15-45 tahun. Faktor resiko yang berhubungan dengan peningkatan insiden AR adalah jenis kelamin wanita, riwayat keluarga penderita AR, dan merokok (Schuna, 2005; Suarjana, 2009). Penyakit ini dapat menyerang semua orang diseluruh dunia, dimana sekitar 1-2% orang dewasa menderita AR dan dilaporkan bahwa di Amerika serikat setiap tahun terdapat sebanyak 750 kasus baru per satu juta penduduk (Schuna, 2005; Carter, 2006).

2.4.3 Patofisiologi artritis reumatoid

Inflamasi merupakan bagian dari patologi utama pada AR yang terutama terjadi pada sendi. Proses dimulai saat aktivasi oleh antigen menyebabkan limfosit T helper (CD4+) bermigrasi menuju jaringan sinovial/sendi yang selanjutnya akan menghasilkan berbagai protein mediator/sitokin yang memulai proses inflamasi, menarik berbagai sel inflamasi ke jaringan, mengaktifkan sel-sel yang berada di jaringan inflamasi dan menyebabkan produksi cairan sinovial berlebihan. Migrasi sel diawali dengan proses *tethering* dimana aliran sel-sel lekosit (termasuk limfosit) melambat dan menepi ke dinding pembuluh darah dibantu molekul adesi selektin. Selanjutnya terjadi proses *rolling*, yaitu sel lekosit berputar-putar sehingga menepi dan tertambat di sel endotelial dinding pembuluh darah dengan bantuan molekul adesi integrin yang berinteraksi dengan *intercellular adhesion molecule* (ICAM). Selanjutnya sel lekosit melekat dan berintegrasi menuju jaringan dengan bantuan *chemokine* sebagai *chemoattractan*. Sel lekosit yang berada di pembuluh darah dapat masuk ke dalam jaringan sinovial dan selanjutnya sel-sel seperti makrofag, sel mast berperan dalam pengeluaran sitokin (Theofilopoulos & Bona, 2002; Sherwood, 2010). Gambar 2.8 berikut menjelaskan proses terjadinya respon imun *innate* /bawaan.



[Sumber : Sherwood, 2010, telah diolah kembali]

Gambar 2.8 Respon imun *innate*/bawaan.

Di jaringan sinovial limfosit berinteraksi dengan makrofag yang berperan sebagai *antigen presenting cell* (APC) yang menangkap dan mengolah antigen menjadi peptida lalu mempresentasikan ke protein permukaan sel APC yang disebut *major histocompatibility complex* (MHC) II. Pada penyakit autoimun seperti AR ini senyawa endogen sering dianggap sebagai antigen yang lalu dapat menyebabkan reaksi inflamasi (Ikawati, 2014; Radji, 2015). Interaksi limfosit dan makrofag ini akan menyebabkan aktivasi produksi berbagai sitokin seperti IL-2, TNF- α dan IL-1. IL-2 dapat memicu proliferasi sehingga memperbanyak jumlah sitokin yang dihasilkan. Sitokin yang banyak dijumpai pada AR adalah IL-1 dan TNF- α . Didapatkan pula subset dari limfosit CD4+ yaitu T helper (Th17) yang juga berperan dalam proses inflamasi dan kerusakan sendi pada AR dan dapat menghasilkan juga sitokin IL-17, IL-22, IFN- γ , TNF- α dan IL-6 (Komatsu & Takayanagi, 2012; Radji, 2015). Selanjutnya limfosit T akan mengaktifkan limfosit B dan menghasilkan autoantibodi, diantaranya adalah *rheumatoid factor* (IgM-RF) dan *anti-cyclic citrullinated protein* (anti-CCP) yang sering dipakai sebagai penanda dalam diagnosis AR (Niewold et al., 2007; Malemud, 2013; Wang et al., 2014).

Kerusakan sendi pada AR terjadi karena proliferasi makrofag dan fibroblas sinovial (*fibroblast-like synoviocytes*) setelah adanya faktor pencetus berupa inflamasi kronik atau proses autoimun (Sen, 2005; Lipsky, 2007; Wang et al., 2014). Limfosit menginfiltrasi daerah perivaskular dan terjadi proliferasi sel-sel endotel yang selanjutnya terjadi neovaskularisasi. Lapisan jaringan sinovial sendi

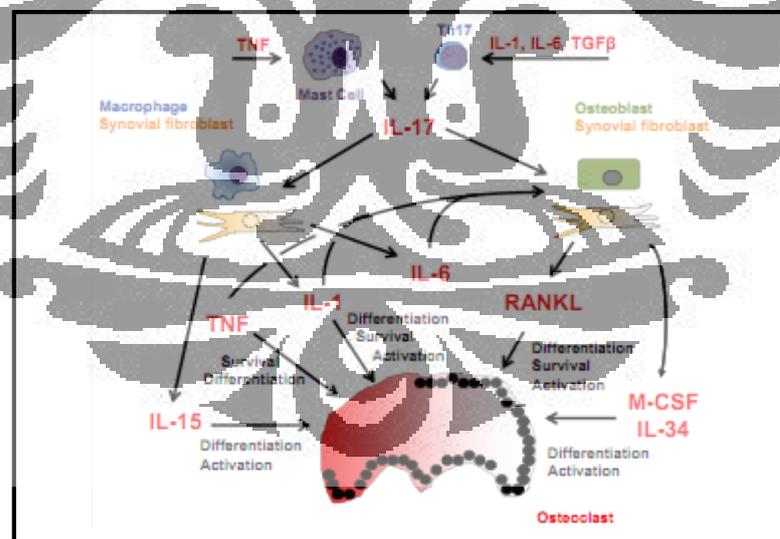
berproliferasi karena inflamasi kronik sehingga terjadi pertumbuhan *irregular* pada jaringan sinovial sehingga membentuk panus. Panus menginvasi dan menyebabkan degradasi kartilago dan erosi tulang sehingga merusak sendi. Berbagai macam sitokin, interleukin, protease dan faktor pertumbuhan dilepaskan ditambah resorpsi tulang yang berlebihan merupakan karakteristik penyakit inflamasi pada sendi yang terjadi pada artritis rematoid sehingga dapat mengakibatkan destruksi sendi sampai komplikasi sistemik (Schuna, 2005; Suarjana, 2009; Bahtiar et al., 2011)

Destruksi jaringan sendi terjadi melalui dua cara: (1) Pertama adalah destruksi yang disebabkan oleh produksi dari enzim protease, kolagenase dan enzim hidrolitik lainnya. Enzim-enzim ini memecah kartilago, ligamen, tendon dan tulang pada sendi lalu dilepaskan pula radikal oksigen dan metabolit asam arakidonat oleh lekosit polimorfonuklear kedalam cairan sinovial. Proses ini diduga sebagai bagian dari respon autoimun terhadap antigen yang diproduksi secara lokal. (2) Destruksi jaringan juga dapat terjadi karena kerja panus. Panus merupakan jaringan granulasi vaskular yang terbentuk dari sinovial dan makrofag yang teraktivasi dan meradang kemudian meluas ke sendi. Di sepanjang pinggir panus terjadi destruksi kolagen dan proteoglikan pada kartilago melalui produksi enzim oleh sel di dalam panus tersebut (Carter, 2006).

Pada AR terjadi degradasi tulang rawan/kartilago yang menyebabkan disfungsi sendi. Kartilago adalah sejenis jaringan ikat khusus yang terdiri dari kondrosit, yang memproduksi *extra cellular matrix* (ECM). Pada kondisi normal terjadi keseimbangan sintesa dan degradasi ECM. Pada AR terjadi peningkatan degradasi ECM, dimana enzim *matrix metalloproteinase* (MMP) seperti MMP-1, MMP-8 dan MMP-13 (*kolagenase*), banyak terekspresi dan berperan penting dalam kecepatan degradasi kartilago (So et al., 1999; Klareskog et al., 2009). MMP-1 diproduksi terutama oleh sel sinovial pada persendian, MMP-13 juga dihasilkan oleh kondrosit di persendian. Ekspresi MMP-3 (stromelisin) dapat mendegradasi matriks nonkolagen pada persendian, seperti gelatin dan proteoglikan (Ikawati, 2014). MMP-3 terdapat dalam jumlah besar di dalam membran dan cairan sinovial dapat mengaktivasi MMPs lainnya seperti MMP-1 dan MMP-9 (So et al., 1999). Secara fisiologis MMP akan dihambat oleh inhibitorynya yaitu *tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMPS) lokal di jaringan

dan α -2 macroglobulin (α -2M) di sirkulasi sistemik (Mohammed et al., 2003; Ikawati, 2014).

Pada AR, selain terjadi degradasi kartilago, juga terjadi erosi tulang akibat peningkatan pembentukan dan aktivitas resorpsi oleh osteoklas, yang dipengaruhi oleh beberapa sitokin seperti TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17, RANKL dan M-CSF. Secara fisiologis, keseimbangan pertumbuhan tulang dijaga oleh keseimbangan pembentukan dan aktivitas osteoblas dan osteoklas. Osteoklas berasal dari monosit-makrofag sebagai sel prekursor, dimana pembentukannya memerlukan *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand* (RANKL) dan *macrophag colony-stimulating factor* (M-CSF) (Suzuki et al., 2001). RANKL akan mengikat RANK di permukaan lalu memicu diferensiasi sel menjadi osteoklas, dimana proses ini dapat dihambat oleh *osteoprotegerin* (OPG) dengan berikatan dengan RANKL (Udagawa et al., 2002; Stolina et al., 2005, Braun & Zwerina, 2011). RANKL dipicu oleh sinovial fibroblas dan limfosit T yang teraktifasi serta sitokin terutama IL-17, IL-1 dan TNF- α (Theofilopoulos & Bona, 2002; Stolina et al., 2005; Ikawati, 2014). Gambar 2.9 berikut menjelaskan sitokin yang mengaktifasi proses osteoklastogenesis pada AR.

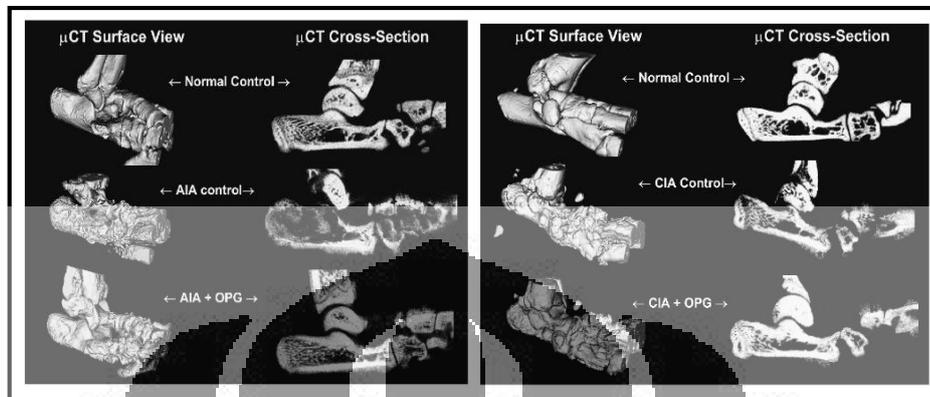


[Sumber : Braun & Zwerina, 2011; telah diolah kembali]

Gambar 2.9 Pengaruh sitokin mengaktifasi osteoklastogenesis pada AR

Pembentukan osteoklas yang diperantarai oleh ikatan RANKL-RANK dan M-CSF serta beberapa sitokin pro-inflamasi menyebabkan destruksi tulang.

Gambar 2.10 berikut ini menjelaskan bahwa dengan induksi pada hewan model AR dapat mempengaruhi pembentukan osteoklas yang diperantarai RANKL, RANK dan OPG sehingga menyebabkan kerusakan pada *hind paw joint*.



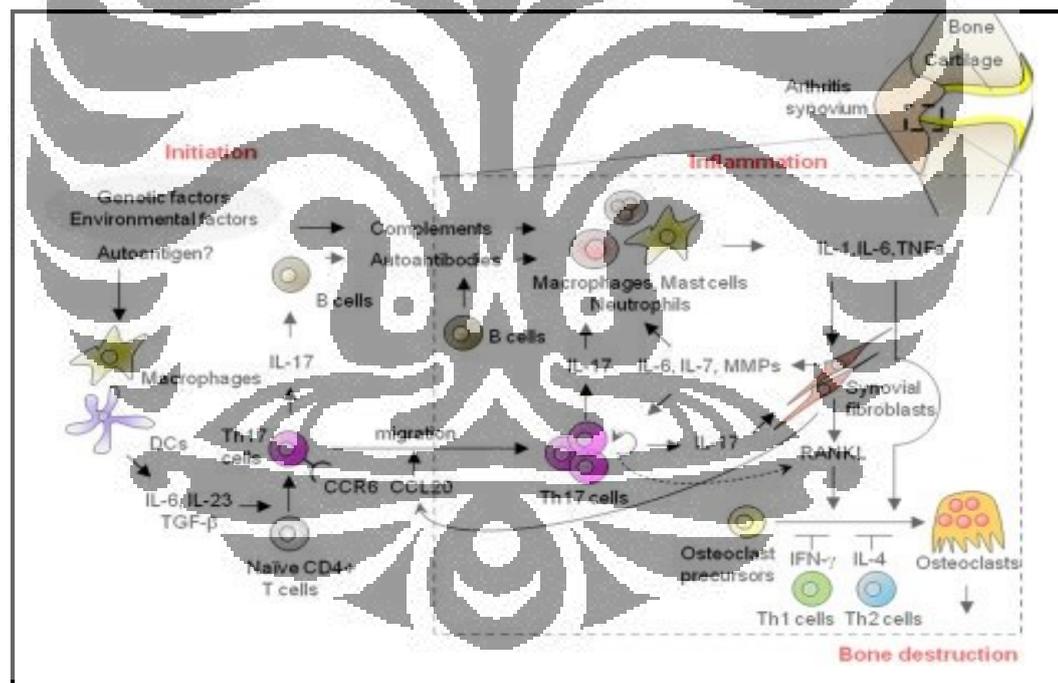
[Sumber : Stolina et al., 2005; telah diolah kembali]

Gambar 2.10 Pengaruh RANKL, RANK dan OPG pada *Hind Paw Joint*

Pada AR, sitokin IL-6 dan *transforming growth factor-beta* (TGF- β) yang kebanyakan berasal dari APC aktif, memberi signal pada sel Th-17 untuk menginduksi pengeluaran IL-17. Sel Th17 berkontribusi dalam perkembangan semua fase melalui aktivasi respon imun bawaan dan fibroblas sinovial dan akhirnya terjadi kerusakan tulang dan kartilago serta sinovitis. Fibroblas sinovial berkontribusi dalam fase inflamasi dengan memudahkan migrasi Th17 ke sendi yang meradang, dan meningkatkan proliferasi sehingga produksi IL-17 meningkat. IL-17 mempunyai efek independen dan sinergistik dengan sitokin pro-inflamasi lainnya (TNF- α dan IL-1) pada sinovium, yang menginduksi pelepasan sitokin, produksi *metalloproteinase*, ekspresi RANKL/RANK dan osteoklastogenesis (Komatsu & Takayanagi, 2012).

Terjadinya inflamasi dan kerusakan tulang terus berlanjut bersamaan dengan terbentuknya autoantibodi. Sel B matur yang diaktivasi oleh sel T dan stimulasi TLR (*toll-like reseptor ligand*) akan berdiferensiasi menjadi *short-lived plasma cells* atau masuk ke jaringan germinal sehingga berubah menjadi sel memori dan *long-lived plasma cells* yang dapat memproduksi antibodi. Pada AR, reaksi kompleks imun yang terjadi antara faktor reumatoid dengan bagian Fc-IgG tertimbun dalam sinovial sendi dan akan mengaktifkan sistem komplemen. Kompleks imun

yang terjadi dengan dibantu dengan pengaktifan sistem komplemen dapat menimbulkan agregasi trombosit, aktivasi makrofag, perubahan permeabilitas vaskuler, aktivasi sel mast, produksi dan pelepasan mediator inflamasi dan bahan kemotaktik serta influks netrofil (Suarjana, 2009; Radji, 2015). Keberadaan PMN / netrofil dalam jumlah banyak akan mengeluarkan sitotoksin dan radikal bebas yang dapat dapat merusak jaringan setempat dan memperparah kerusakan pada sinovium dan tulang (Schuna, 2005; Wells, et al., 2009). Senyawa enzimatik yang dilepas oleh netrofil akan memecah kolagen dan tulang rawan sendi yang menimbulkan destruksi permukaan sendi dan akibat inflamasi yang berulang terjadi penimbunan fibrin dan penggantian tulang rawan oleh jaringan ikat, sehingga sendi sulit digerakkan (Radji, 2015). Gambar 2.11 berikut ini menjelaskan tentang terjadinya inflamasi dan reaksi autoimun yang dapat menyebabkan kerusakan kartilago dan tulang pada AR.



[Sumber : Komatsu & Takayanagi, 2012]

Gambar 2.11 Inflamasi, respon autoimun dan destruksi kartilago-tulang pada AR

Gambaran akhir dari inflamasi kronik bisa berbeda-beda, kehilangan kartilago dapat menyebabkan kehilangan ruang sendi. Pembentukan granulasi

kronik atau panus dapat menyebabkan gangguan pergerakan sendi sampai penyatuan (*fusion*) tulang yang disebut ankilosis (Schuna, 2005).

2.4.4 Gambaran klinis

Gambaran klinis yang lazim ditemukan pada AR bisa sangat bervariasi dan tidak selalu ditemukan secara bersamaan. Gambaran klinis tersebut berupa :

- a. Gejala umum : kelelahan, anoreksia, berat badan menurun dan demam ringan
- b. Poliartritis simetris, terutama di sendi perifer dan kecil termasuk sendi-sendi di tangan dan kaki (namun biasanya tidak melibatkan sendi interfalang distal) dan berjalan perlahan sesuai perkembangan sinovitis (inflamasi pada membran sinovial yang membungkus sendi). Sendi yang sering terlibat pada AR dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1. Sendi yang terlibat pada AR (Suarjana, 2009) (telah diolah kembali)

Sendi yang terlibat	Frekuensi (%)
MCP (<i>Metacarpophalangeal</i>)	85
Pergelangan tangan	80
PIP (<i>Proximal interphalangeal</i>)	75
Lutut	75
MTP (<i>Metatarsophalangeal</i>)	75
Pergelangan kaki (tibiotalar+subtalar)	75
Bahu	60
Midfoot (tarsus)	60
Panggul (Hip)	50
Siku	50
Acromioclavicular	50
Vertebra servical	40
Temporo mandibular	30
Sternomandibular	30

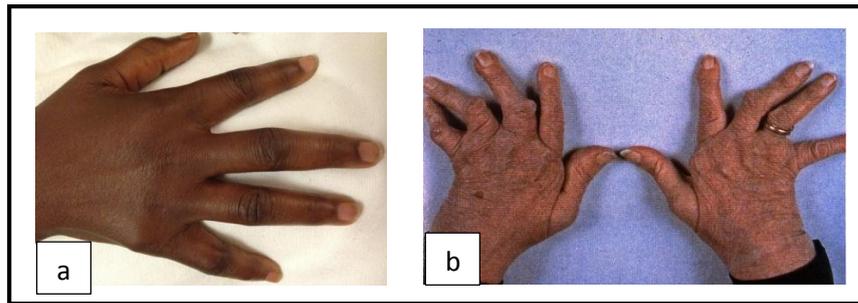
- c. Kekakuan di pagi hari yang cukup lama, dapat lebih dari 1 jam, berbeda pada OA (osteoarthritis), kekakuan hanya beberapa menit atau kurang dari 1 jam
- d. Arthritis erosif, merupakan gejala khas dari gambaran radiologi dimana terjadi peradangan sendi yang kronik dan mengakibatkan erosi di tepi tulang.

- e. Deformitas, terjadi kerusakan struktur penunjang sendi, kehilangan fungsi articular sampai ankilosis tulang (destruksi sendi dan pertumbuhan berlebihan terutama sendi pergelangan tangan dan kaki) yang makin meningkat seiring dengan perjalanan penyakit.
- f. Nodul rematoid, merupakan massa subkutan yang terutama terdapat di bursa olekranon/ sendi siku atau sepanjang permukaan ekstensor lengan
- g. Manifestasi ekstra articular, AR dapat menyerang organ lain di luar sendi, seperti mata (keratokonjungtivitis sicca), jantung (perikarditis), paru (pleuritis), GIT (sjogren sindrom), neurologi, ginjal dan metabolik (osteoporosis) (Schuna, 2005; Carter, 2006; Suarjana, 2009).

2.5 Kriteria diagnostik

Diagnosa stadium awal AR agak sulit ditegakkan. Berdasarkan *American College of Rheumatology*, AR didiagnosis dengan menggunakan tujuh kriteria, yaitu sebagai berikut:

- a. Kekakuan pagi hari (lebih dari 1 jam)
- b. Arthritis pada tiga atau lebih sendi
Terdapat 14 (empat belas) daerah persendian yang mungkin terlibat, yaitu : PIP, MCP, pergelangan tangan, siku, lutut, pergelangan kaki dan MTP kanan atau kiri
- c. Arthritis pada sendi-sendi jari tangan
Paling sedikit ada satu pembengkakan pada sendi : pergelangan tangan, MCP atau PIP
- d. Arthritis yang simetris
- e. Nodul rematoid
Nodul subkutan pada daerah tonjolan tulang, permukaan ekstensor atau daerah juksta artikuler
- f. Faktor rematoid dan atau anti-CCP positif dalam serum
- g. Perubahan radiologik (terutama tangan dan pergelangan tangan)
Terjadi erosi atau dekalsifikasi tulang yang terdapat pada sendi atau daerah dekat sendi. Gambaran manifestasi klinis articular dapat terlihat pada Gambar 2.12.



[Sumber : Radis, 2012]

Gambar 2.12 Manifestasi klinis artikular dari AR

(a) : Gejala awal AR pada MCP-PIP. (b) : Deformitas progresif AR

Diagnosa AR dikatakan positif bila minimal didapatkan empat dari tujuh kriteria diatas terpenuhi, dan berlangsung minimal enam minggu (Carter, 2006; Suarjana, 2009).

2.6 Terapi artritis rematoid

2.6.1 Terapi non farmakologi

Beberapa terapi non farmakologis dapat diberikan untuk penderita AR, seperti :

- a. Istirahat yang cukup
- b. Penurunan berat badan
- c. Pemberian edukasi tentang penyakit dan obat pereda nyeri
- d. Pemberian edukasi tentang aktivitas dan olahraga (Schuna, 2005; Carter, 2006; Wells et al., 2009).

2.6.2 Terapi farmakologi

Tujuan utama yang diharapkan dari terapi AR adalah untuk mencapai remisi lengkap dari penyakit AR, namun hal ini sulit untuk dicapai. Penatalaksanaan yang dilakukan berupa mengurangi pembengkakan, kekakuan dan nyeri pada kaki, menghambat progresifitas perjalanan penyakit berupa kerusakan sendi, mempertahankan fungsi sendi, memperbaiki kualitas hidup, dan mencegah komplikasi sistemik. Terapi farmakologi AR dilakukan dengan menggunakan obat-

obatan golongan NSAID, kortikosteroid, dan DMARD (Schuna, 2005; Wells et al., 2009).

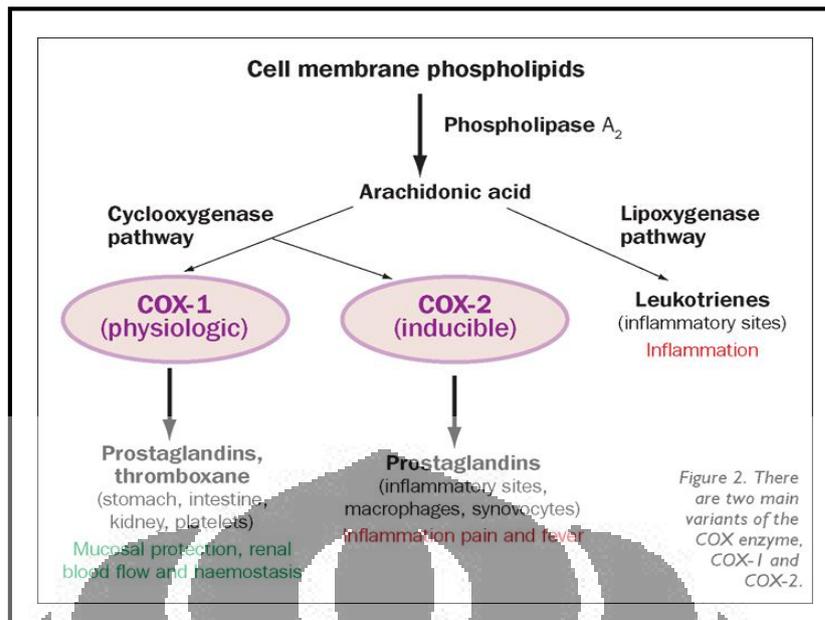
2.6.2.1 Obat golongan NSAID (*Non Steroid Anti Inflammation Drugs*)

Penggunaan obat NSAID (seperti aspirin, ibuprofen, asam mefenamat) pada AR dilakukan untuk mengurangi gejala-gejala inflamasi yang ditimbulkan. Kerja golongan NSAID adalah penghambatan enzim siklooksigenase (COX-2) dalam merespon stimulasi radang (Rosenbergh, 2013). Sel membran fosfolipid menghasilkan asam arakidonat melalui kerja fosfolipase oleh stimulus mekanik, kimia atau fisik atau mediator radang. Asam arakidonat berperan dalam jalur siklooksigenase (COX) dan lipoksigenase (LOX). COX mempunyai 2 jalur, dimana COX-1 diperlukan tubuh untuk pemeliharaan berbagai fungsi normal tubuh, sedangkan COX-2 penting dalam proses inflamasi dan menghasilkan prostaglandin.

NSAID bekerja menghambat sintesa prostaglandin sehingga terjadi efek analgesik dan anti inflamasi serta mengurangi kekakuan. Penghambatan prostaglandin dapat menurunkan permeabilitas vaskuler sehingga menurunkan terjadinya edema dan dibantu bradikinin dapat menurunkan gejala nyeri yang terjadi. Namun NSAID tidak dapat memperlambat progresitas penyakit atau mencegah terjadinya erosi tulang dan kerusakan sendi, namun hanya menutupi gejalanya, sehingga NSAID jarang digunakan sebagai monoterapi AR (Schuna, 2005; Wells et al., 2009).

Berdasarkan mekanisme penghambatan, siklooksigenase dapat dikelompokkan menjadi NSAID selektif COX-2 (selekoksib, etekoksib dan rofekoksib) dan NSAID non selektif COX-2 (aspirin, ibuprofen, asam mefenamat, piroksikam, natrium diklofenak) yang juga dapat menghambat COX-1. NSAID selektif penghambat COX-2 menyebabkan gangguan yang lebih ringan pada saluran cerna dibandingkan NSAID non selektif penghambat COX-2 karena mekanisme aksi kerjanya yang lebih selektif (Schuna, 2005; Wells et al., 2009).

Pengaturan enzim siklooksigenase dapat dilihat pada Gambar 2.13.



Gambar 2.13 Pengaturan enzim siklooksigenase

Efek samping yang ditimbulkan dari pemakaian jangka panjang dari obat ini dapat menyebabkan gangguan di saluran pencernaan, seperti mual, dispepsia, tukak lambung, perdarahan sampai perforasi saluran pencernaan, hal ini disebabkan karena efeknya yang menekan COX-1 (siklooksigenase-1) yang diperlukan tubuh untuk memproduksi mukosa lambung dalam pertahanan fisiologis lambung (Schüna, 2005; Wells et al., 2009).

2.6.2.2 Golongan kortikosteroid

Kortikosteroid mempunyai kemampuan sebagai obat anti inflamasi dan immunosupresan. Obat ini dapat menekan enzim fosfolipase A₂ sehingga tidak terbentuk asam arakidonat. Siklooksigenase dapat memproduksi prostaglandin dan lipoksigenase yang memproduksi leukotrin serta menekan kerja netrofil dan monosit dalam proses inflamasi. Prostaglandin mempunyai peran sebagai mediator inflamasi dan nyeri, menyebabkan vasodilatasi dan edema. Tromboksan menyebabkan vasokonstriksi dan agregasi platelet, sedangkan leukotrin menyebabkan permeabilitas vaskular meningkat, kemotaksis dan adesi lekosit (Rosenbergh, 2013). Penggunaan kortikosteroid dapat mengatasi keluhan nyeri dan

sinovitis dalam pengobatan bersama DMARD pada saat DMARD belum memberikan efek terapi di awal gejala (*'bridging therapy'*) (Wells et al., 2009).

Pemberian obat golongan kortikosteroid dalam jangka waktu lama beresiko tinggi dapat menimbulkan banyak efek samping seperti osteoporosis, katarak, edema, hipertensi, tukak lambung dan perdarahan saluran cerna, glaukoma dan gangguan kadar gula darah. ACR merekomendasikan penderita yang mendapat terapi kortikosteroid harus disertai dengan pemberian kalsium 1500 mg dan vitamin D 400-800 IU per hari untuk menghindari kekurangan mineral tulang yang menyebabkan osteoporosis. Sehingga penggunaan kortikosteroid harus dipertimbangkan untuk pengobatan komplikasi kronik yang memerlukan waktu yang lama (Wells et al., 2009).

Gejala dapat kambuh kembali bila terapi steroid dihentikan, terutama bila menggunakan steroid dosis tinggi, oleh karena itu obat steroid sebaiknya dihentikan secara bertahap untuk menghindari efek *rebound* (Suarjana, 2009).

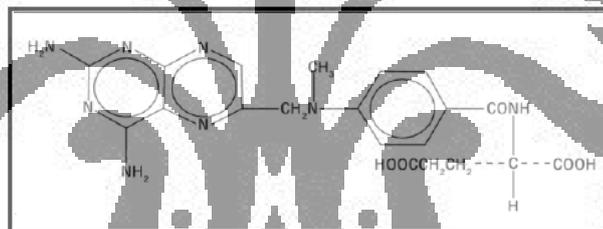
2.6.2.3 Golongan DMARD (*Disease-modifying anti rheumatic drugs*)

Golongan DMARD saat ini merupakan golongan obat yang paling banyak digunakan. DMARD dapat menghambat proses perjalanan penyakit, namun mempunyai efek samping dan toksisitas yang cukup besar (Ikawati, 2014). Pengobatan dini dengan DMARD dapat mengurangi resiko kematian. Obat-obatan DMARD antara lain adalah metotreksat, leflunomida, *hydroxychloroquin* (klorokuin fosfat), sulfasalazin, minosiklin dan garam emas. Metotreksat atau MTX merupakan obat golongan DMARD yang menjadi *first line therapy* sebagai anti-artritis rematoid karena menunjukkan hasil yang lebih baik dalam penggunaan jangka waktu lama dibandingkan dengan obat golongan DMARD yang lain ditambah dengan harga obat yang terjangkau dibanding DMARD biologis (Schuna, 2005; Wells et al., 2009).

Pengobatan dini AR dengan menggunakan MTX diberikan selama 3-4 bulan dengan atau tanpa disertai obat golongan NSAID dan kortikosteroid. Apabila hasilnya belum baik maka dilakukan alternatif lain, yaitu pemberian *mono therapy* DMARD jenis lain; *DMARD combo therapy*; atau DMARD biologis *mono therapy* atau *combo therapy* dengan DMARD. Dan apabila hasilnya masih belum baik maka

dapat diberikan kombinasi *triple drugs* (DMARD + DMARD biologis + kortikosteroid dosis rendah) untuk jangka waktu yang lebih lama (Schuna, 2005; Wells et al., 2009).

MTX merupakan obat antagonis asam folat, yang dapat bersaing dengan reseptor folat dan masuk kedalam jalur asam folat dan dapat menyebabkan defisiensi asam folat dalam tubuh sehingga pemberian obat ini sebaiknya disertai dengan preparat folat (Blits et al., 2013; Cronstein, 2005). Sebagai obat anti inflamasi, MTX berperan sebagai *inhibitor dihidrofolat reduktase*, mengurangi kadar folat intraseluler, menghambat produksi sitokin, menghambat biosintesis purin-pirimidin dan menstimulasi pelepasan adenosin yang berakibat sebagai penghambatan terhadap reaksi inflamasi, menghambat mekanisme NF- κ B dan meningkatkan apoptosis dari sel T (Tian et al., 2007; Wells et al., 2009; Wang & Chiang, 2012). MTX melalui reseptor RFC1 (*Reduced folate carrier 1*) juga dapat menghambat proliferasi sel T melalui efek metabolisme purin-pirimidin. Struktur metotreksat dapat dilihat pada Gambar 2.14.



[Sumber : Departemen Kesehatan RI, 1995]

Gambar 2.14 Struktur metotreksat

MTX yang masuk kedalam tubuh akan diserap kedalam sel dan akan dirubah menjadi adenosin. Hal ini menyebabkan jumlah adenosin di dalam sel meningkat sehingga adenosin yang dapat berperan sebagai agen inflamasi semakin banyak. Metotreksat-PG berfungsi sebagai prodrug yang menghambat ATIC sehingga terjadi akumulasi AICAR (*5-aminoimidazol 4-karboksamida-ribosil-5-fosfat*) yang dapat menyebabkan penghambatan AMP deaminase dan adenosine deaminase (ADA) sehingga jumlah adenosin yang berperan sebagai anti inflamasi meningkat di intra dan ekstra seluler. MTX melalui reseptor adenosin (A2a dan A2b), dapat menghambat pengeluaran sitokin TNF- α , IFR- γ , IL-2, IL-12 dan mengganggu biosintesa DNA dan RNA (Sinaga, 2012; Tian et al., 2007; Cronstein,

2005; Cutolo et al., 2001). Adenosin juga dapat menghambat proses adesi dan fagositosis sel inflamasi, menghambat diferensiasi dan ekspresi osteoklas, mengurangi sekresi VEGF oleh monosit dan dapat meningkatkan perkembangan Th17 (Tian et al., 2007).

MTX mempunyai efek terhadap limfosit dan monosit dimana MTX dapat menghambat produksi dan ekspresi IL-1 yang dihasilkan oleh makrofag/monosit di membran sinovial serta meningkatkan reseptor antagonis IL-1 (IL-1ra). MTX juga dapat meningkatkan ekspresi IL-10 dan IL-4 yang merupakan sitokin yang berperan dalam anti-inflamasi. Sehingga terapi MTX sebagai anti-inflamasi dapat menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi (IL-1, IL-6 dan TNF- α), menurunkan ekspresi sitokin pro-inflamasi Th1 (IL-2 dan IFN- γ) dan meningkatkan ekspresi sitokin anti-inflamasi Th2 (IL-4 dan IL-10) (Cutolo et al., 2001).

Obat ini mempunyai onset yang cepat dimana hasilnya dapat dilihat 2-3 minggu setelah terapi. Pemberian MTX dapat dilakukan secara oral, intramuskular atau subkutan (Schuna, 2005). Secara farmakokinetik puncak level serum MTX peroral didapat setelah 1-4 jam dimana konsentrasi dapat diturunkan oleh makanan. Sekitar 50 % terikat secara reversibel dengan protein serum dan dapat secara transport aktif melewati membran sel. $T_{1/2}$ MTX dosis rendah peroral berkisar antara 6-8 jam dan tidak terdeteksi di serum dalam 24 jam (Cutolo et al., 2001). Efek samping MTX yang dapat terjadi adalah gangguan saluran pencernaan (stomatitis, mual, muntah, diare, perdarahan), hematologi (penurunan leukosit, dan trombosit), pernafasan (pneumonitis, fibrosis), gangguan fungsi hati, ruam, alopecia, dan nodulosis (Schuna., 2005; Anonymous, 2008; Wells et al., 2009; Suarjana, 2009; Cronstein, 2005).

2.6.2.3 Golongan DMARD biologis / *Drug targetted*

Golongan DMARD biologis bersifat lebih selektif, karena dapat bekerja langsung pada targetnya. Anti TNF- α dapat menekan ekspresi TNF- α , sehingga menekan ekspresi sitokin yang lainnya seperti IL-1. Contoh obat : infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab, certolizumab (Wells et al., 2009; Bevaart et al., 2010; Ikawati, 2014).

Antagonis Reseptor IL-1 berperan dalam menekan IL-1 dengan cara mengikat IL-1 di target sel (Wells et al., 2009; Bevaart et al., 2010). IL-1 merupakan sitokin yang diproduksi oleh makrofag yang teridentifikasi pada cairan sinovial penderita AR dan berperan penting terhadap terjadinya inflamasi dan kerusakan sendi. Sitokin ini merupakan *inducer* poten untuk MMP, eikosanoid, iNOS dan RANKL yang merupakan mediator pro-inflamasi. Contoh obat : anakinra (Ikawati, 2014).

Obat antagonis reseptor IL-6 bekerja untuk mengatasi ekspresi yang berlebihan dari IL-6 yang menyebabkan peningkatan produksi auto-antibodi, peningkatan aktivasi osteoklas, peningkatan ekspresi ICAM-1 dan terlibat dalam rekrutmen sel inflamasi untuk masuk ke jaringan. Sitokin IL-6 banyak dijumpai pada serum maupun cairan sinovial pasien AR dan diproduksi oleh makrofag, monosit, limfosit T, sel endotelial dan fibroblas sinovial. Contoh obat : tocilizumab (Bevaart et al., 2010; Ikawati, 2014).

Efikasi terapi kombinasi memperlihatkan hasil yang lebih baik daripada terapi tunggal, dengan pemantauan keamanan. ACR merekomendasikan evaluasi dasar yang harus dilakukan antara lain: darah perifer lengkap, kreatinin serum dan transaminase hati. Untuk penggunaan metotreksat dan leflunomid perlu pemeriksaan tambahan yaitu pemeriksaan hepatitis B dan C (Wells et al., 2009; Suarjana, 2009).

2.7 Induksi hewan model AR dengan CFA (*Complete freund's adjuvant*)

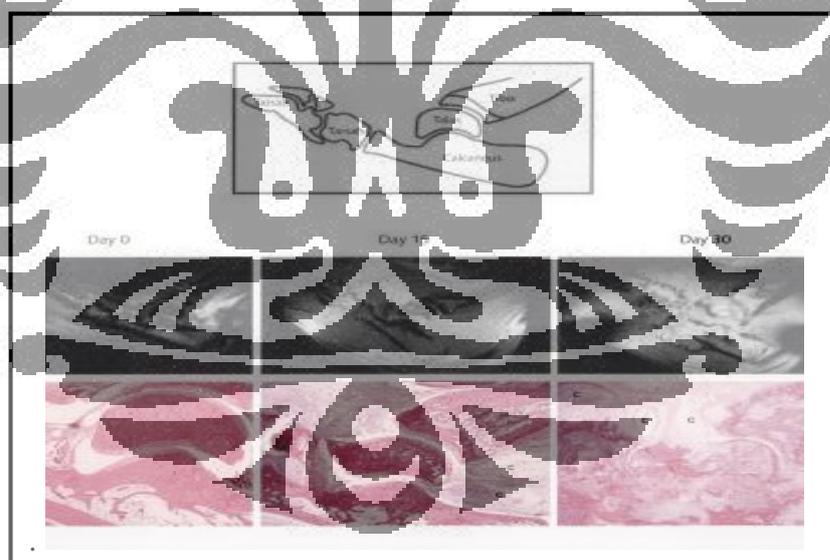
Untuk melakukan pemeriksaan AR secara *invivo*, diperlukan hewan model AR. Beberapa metode pembuatan hewan model AR yang dapat dilakukan adalah *Adjuvant-induced arthritis* (AIA), *Collagen-induced arthritis* (CIA), *Proteoglycan-induced arthritis* (PGIA), *Streptococcal cell wall-induced arthritis* (SCW-IA) dan yang lainnya. Masing-masing metode ini mempunyai kelebihan dan kekurangan. Model hewan AR dengan AIA dibuat dengan memberikan induksi CFA (*Completed freund's adjuvant*) pada tikus yang hasilnya akan memberikan onset yang cepat, gambaran inflamasi poliartrikular, pembengkakan sendi, infiltrasi sel radang, dan degradasi kartilago-tulang seperti pada manusia (Bevaart et al., 2010; Laste et al., 2014).

CFA (*Complete freund's adjuvant*) adalah suatu emulsi air dalam minyak yang mengandung *Mycobacterium butyricum* yang telah dimatikan dan dikeringkan, untuk digunakan untuk meningkatkan antigenisitas dan merangsang respon kekebalan. Sedangkan *incompleted freund's adjuvant* (IFA), merupakan emulsi air dalam minyak saja, digunakan untuk alasan yang sama. Tujuan pemberian CFA ini adalah untuk membentuk suatu reaksi imun dari *adjuvant* yang diberikan kepada hewan uji. Penggunaan CFA menyebabkan peradangan, edema, indurasi, dan/atau nekrosis pada tempat penyuntikan dari hewan uji laboratorium, bahkan dapat meluas secara sistemik bila dosis yang diberikan terlalu besar. CFA mengakibatkan inflamasi lokal di tempat penyuntikan, sehingga menyebabkan reaksi masuknya sejumlah lekosit ke jaringan. Respon inflamasi yang terjadi dapat berakibat buruk pada hewan sehingga pemberian *adjuvant* ini harus dilakukan sesuai prosedur yang telah ditentukan. Pemberian CFA dapat melalui intramuskular (IM), subkutaneus (SC), atau intradermal (ID) (ARAC, 2013).

Efek anti-arthritis rematoid pada tikus dapat dinilai berdasarkan penurunan besarnya volume edema kaki yang ditimbulkan oleh *complete freund's adjuvant* (Raji et al., 2002) dan perubahan gambaran histopatologi membran sinovial / skor sinovitis (Krenn et al., 2002). Pengamatan yang dilakukan adalah pengukuran volume edema dengan cara mengukur volume air yang digantikan oleh alat pletismometer yang terjadi karena inflamasi (Woode et al., 2008). Gambaran histopatologi pada tikus yang diinduksi CFA ditunjukkan dengan adanya proliferasi membran sinovial/sinovitis, infiltrasi sel MN, panus dan destruksi kartilago-tulang (Krenn et al., 2002; Setiawan, 2012).

Gambaran histologi sendi pergelangan kaki/*ankle* tikus memperlihatkan 2 jenis sel yang melapisi membran sinovial, tipe A yang menyerupai makrofag (*macrophag-like synoviocytes*) dan tipe B yang menyerupai fibroblas (*fibroblast-like synoviocytes*). Kedua tipe sel sinoviosit ini bersifat fagositik (Juncqueira & Carneiro, 1992). *Fibroblast-like synoviocytes* (FLS) merupakan sel sinoviosit yang diduga dapat menyebabkan hiperplasia fibroblas dan terbentuknya panus pada penderita AR dan selanjutnya dapat menyebabkan kerusakan kartilago dan tulang pada sendi (Wang et al., 2014).

Pada gambaran histopatologi, memperlihatkan adanya inflamasi kronis yang awalnya ditandai dengan terjadinya edema pada membran sinovial, selanjutnya terjadi neovaskularisasi, hiperplasia serta pertumbuhan fibroblastik. Pada fase lanjut diikuti dengan perubahan pada articular kartilago, ligamen-tendon, kapsul fibrosa yang dapat mengakibatkan deformitas dan kaku sendi. Pada AR didapatkan sinovitis yang disebabkan oleh peradangan di membran sinovial sendi pergelangan kaki. Terdapat hiperplasia sinovial yang disebabkan oleh proliferasi sel sinoviosit sehingga membran sinovial terus bertambah dan selanjutnya dapat membentuk panus. Selanjutnya ditemukan infiltrasi sel radang terutama limfosit dan sel plasma serta peningkatan densitas stroma membran sinovial. Serangan invasif dari panus ini dapat menyebabkan kerusakan kartilago dan tulang sebagai bentuk perjalanan kronis dari AR. Terjadinya peradangan pada artritis rematoid karena induksi CFA dapat terlihat pada Gambar 2.15, dimana proses peradangan pada sendi pergelangan kaki tikus di hari ke-15 sudah terjadi dan semakin terlihat jelas pada hari ke-30 (Morgan & Marshall, 1999).



[Sumber : Morgan & Marshall, 1999]

Gambar 2.15 Peradangan sendi pergelangan kaki tikus model AR

Belakangan ini, skoring sinovial secara histopatologis diperlukan untuk melihat hubungan derajat manifestasi klinis AR dan sinovitis, keberadaan infiltrasi sel radang dan efek terapi pada sinovitis. Untuk membuat diagnosa secara

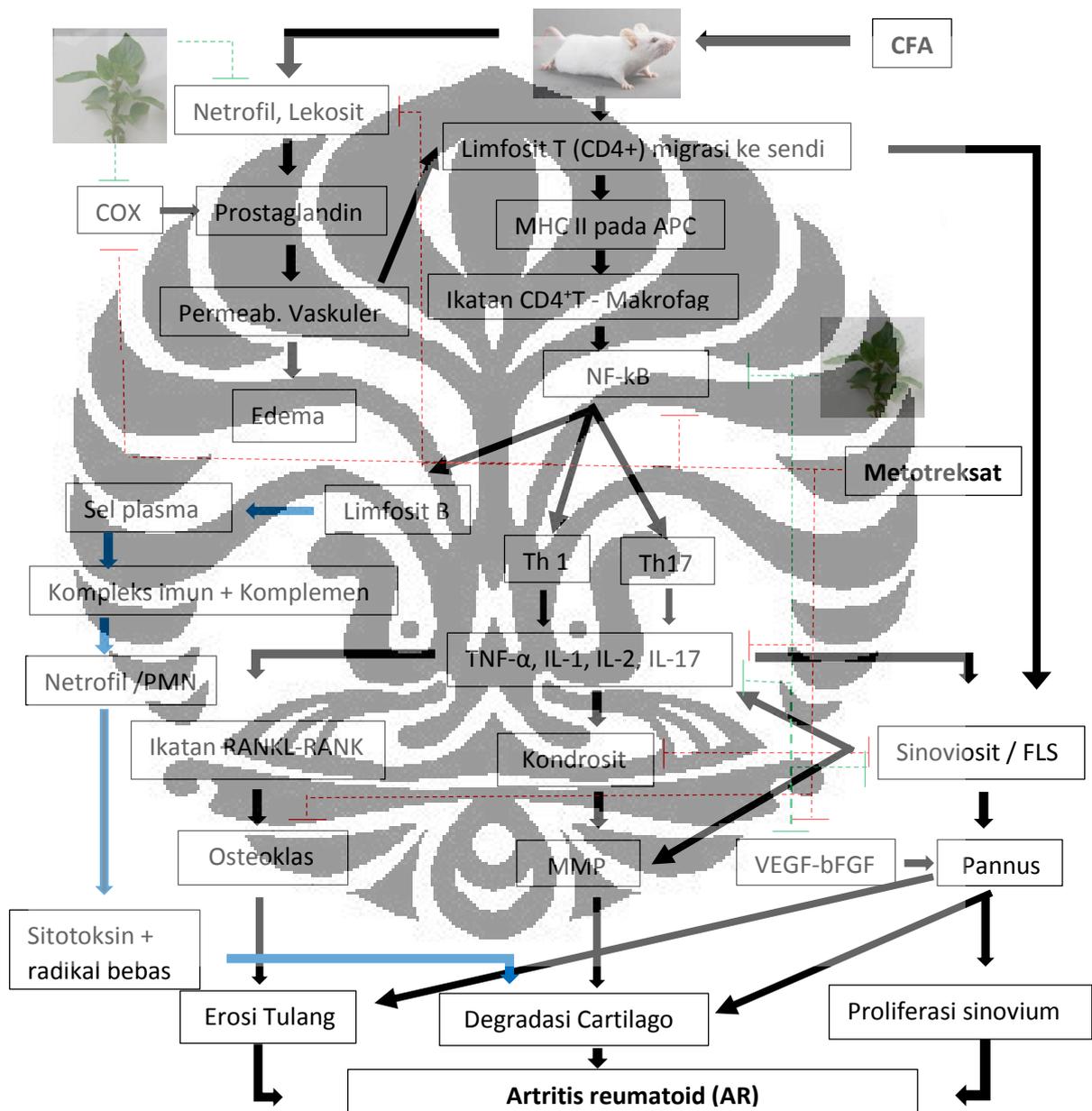
histopatologi diperlukan pemeriksaan derajat histopatologi yang bisa berlaku pada berbagai penyakit sendi dan berguna secara kronis (*long term*) serta cukup valid pada pemeriksaan sinovektomi. Skoring dari Krenn memenuhi kriteria ini dan berfokus pada perubahan histologis yang cukup mudah diperiksa dengan pemeriksaan pewarnaan rutin H&E. Sehingga pemeriksaan histopatologi pada membran sinovial dapat lebih menguatkan diagnostik AR (Krenn et al., 2006).

Selanjutnya untuk lebih menguatkan diagnostik AR dapat dilakukan dengan melihat kerusakan tulang pada hewan model AR melalui pemeriksaan osteoklas. Osteoklas merupakan derivat dari makrofag/monosit yang berfungsi dalam proses pertumbuhan tulang, yaitu dalam degradasi tulang. Kerja osteoklas berbeda dengan osteoblas yang berfungsi dalam pembentukan matriks tulang. Osteoklas dipengaruhi oleh sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , IL-1, IL-6 dan IL-17, sehingga apabila terjadi peradangan seperti pada AR maka akan terjadi peningkatan jumlah dan ekspresi osteoklas yang dapat meningkatkan erosi tulang dan memperparah keadaan artritis rematoid (Bolon, 2004).



2.8 Kerangka konsep

Kerangka konsep hubungan CFA, metotreksat dan ekstrak etanol daun babandotan terhadap AR. Mekanisme AR yang disebabkan inflamasi kronik (CFA) (panah hitam) dan autoimun (panah biru). Metotreksat (garis putus merah) dan ekstrak etanol daun babandotan (garis putus hijau) dapat berperan sebagai anti-arthritis reumatoid pada tikus yang diinduksi oleh CFA.



(Sumber: Bolon et al., 2011; Komatsu & Takayanagi, 2012; Nair et al., 2006; Chen et al., 2004; Bellik et al., 2013; Rosenbergh, 2013; McInnes & Scheet, 2011, Karmakar et al., 2010; Ji et al., 2013; Tian et al., 2007; Schuna, 2005; Wells et al., 2009; Cutolo et al., 2001).

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Indonesia Depok, laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Indonesia dan ILRC-UIOBC (Intergrated Laboratory Research Center UI-Olympus Bioimaging Center) Universitas Indonesia, mulai bulan Juli 2015 sampai bulan Mei 2016.

3.2 Bahan dan alat penelitian

3.2.1 Bahan uji

Bahan uji berupa simplisia kering daun babandotan (*Ageratum conyzoides L.*) yang didapat dari BALITTRO (Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat), Bogor dan dideterminasi di Pusat Penelitian Biologi-LIPI (Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia) Bogor (Lampiran 1).

3.2.2 Hewan uji

Hewan uji berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan dengan berat berkisar 150-250 g dan berumur 2-3 bulan. Didapat dari Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor (IPB), Bogor (Lampiran 2). Bahan makanan tikus yang diberikan merupakan pakan standar hewan uji berupa makanan dan minuman standar secara *ad libitum* dan seragam (Lampiran 3). Dilakukan pengamatan rutin terhadap keadaan umum dan penimbangan berat badan tikus. Tikus yang sehat memiliki ciri-ciri bulu bersih, mata jernih bersinar, tingkah laku normal, memiliki feses normal, dan berat badan yang tidak berkurang.

Dilakukan aklimatisasi tikus selama 7 hari di laboratorium dalam kandang (dengan alas serbuk kayu) agar dapat beradaptasi dengan lingkungan yang baru. Dilakukan randomisasi dimana tikus akan dikelompokkan secara acak dari tiap kelompok, sehingga dalam 1 kandang terdapat 6 ekor tikus (Lampiran 4).

Jumlah tikus yang diperlukan dihitung berdasar rumus Federer, sebagai berikut :

$$(t-1)(n-1) \geq 15 \quad (3.1)$$

Keterangan : t adalah jumlah perlakuan (6 kelompok)

n adalah jumlah pengulangan tiap perlakuan

Jumlah kelompok dalam penelitian ini, $t = 6$, maka $n \geq 4$. Maka diperlukan minimal 36 ekor tikus, hal ini dimaksudkan agar dapat dianalisa dalam perhitungan statistik dan untuk mengantisipasi drop out hewan uji.

Kriteria inklusi dari penelitian ini :

- a. Tikus (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley*
- b. Berkelamin jantan
- c. Mempunyai berat badan 150-250 g
- d. Berumur 2-3 bulan

Tikus yang diteliti harus dalam kriteria inklusi dan selama penelitian dilakukan penimbangan serta pengamatan umum sesuai prosedur.

Kriteria eksklusi/drop out : apabila tikus sakit dan tidak mau makan, atau tikus mati pada saat penelitian.

3.2.3 Bahan kimia

Bahan kimia yang dipergunakan berupa normal salin/natrium klorida 0,9 % steril (Otsuka), asam klorida, asam sulfat pekat, asetat anhidrida, benzene, benzyl benzoate, obat DMARD/metotreksat tablet (Ebewe Pharma), entellan (Merck), xilol, eter, eosin, hematoksilin, dinatrium hidrogen fosfat, natrium dihidrogen fosfat, formaldehid, etanol 70% (Brataco), akuades (Brataco), karboksimetilselulosa /CMC (Brataco), reagen penyemprot, larutan gelatin 10%, serbuk Mg, serbuk Zn, pereaksi *Bouchardat*, *Meyer*, *Dragendorff*, *Liebermann-Bouchart*, *Complete freund's adjuvant* (CFA) yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* (Sigma-Aldrich USA).

3.2.4 Alat penelitian

Peralatan yang digunakan di penelitian ini seperangkat alat bedah, jarum suntik 27 G ½ (Terumo), spuit 1 mL dan 3 mL (Terumo), *object glass*, *cover glass*,

cawan penguap, lumpang dan mortir, tabung reaksi, *breaker glass*, tabung ukur, alkoholmeter, pipet, kertas saring, corong, pengaduk, lempeng KLT *silica gel F₂₅₄*, *chamber*, linomat 5 (Camag), lampu UV, kamera (optilab), mikroskop (Olympus IX73 *Research Inverted Microscope*), *magnetic stirrer* (Boecco), oven paraffin (Sakura), oven, tanur (Nabertherm), desikator (Vakumfest), krus porselen, pletismometer, panci maserasi, *rotary vaccum evaporator* (Buchi Ika), *rotary microtome* (820 Spenser Microtome), *water bath*, *shaker*, sonde oral, lemari pendingin, kandang tikus, timbangan hewan, timbangan analitik (Mettler Toledo).

3.3 Desain penelitian

Metoda yang digunakan adalah *Pure experimental control group design* (Dahlan, 2012; Supardi & Surahman, 2014).

Dilakukan penelitian dengan subyek tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan. Penelitian ini sudah mendapatkan lolos kaji etik dari FK-UI (Lampiran 5). Dalam penelitian ini digunakan enam kelompok uji yang terdiri dari 1 kelompok kontrol normal, 1 kelompok kontrol negatif, 1 kontrol positif dan 3 kelompok perlakuan dengan 3 macam dosis dengan masing-masing kelompok terdiri dari 6 tikus. Lama intervensi untuk kelompok kontrol dan kelompok perlakuan adalah 21 hari setelah diberikan induksi CFA hari ke-1 dan ditunggu sampai hari ke-28 (empat minggu) untuk mencapai kondisi inflamasi kronis dari AR. Waktu tersebut diluar masa adaptasi selama 7 hari. Alur penelitian anti-arthritis rematoid ekstrak etanol daun babandotan dapat dilihat pada Lampiran 6.

Pada penelitian ini dilakukan uji pendahuluan untuk menentukan keberhasilan induksi CFA dan menentukan waktu yang paling optimal terjadinya arthritis rematoid pada tikus, yang diperlukan dalam menguji efek kuratif. Uji pendahuluan menggunakan satu kelompok kontrol normal (disuntik normal saline sebanyak 0,1 ml) dan dua kelompok arthritis (disuntik CFA dosis 1 mg/ml sebanyak 0,1 ml), dan di minggu keempat pada kelompok arthritis sudah didapatkan keadaan inflamasi kronis / arthritis pada kaki tikus. Sehingga diperlukan masa tunggu pada penelitian ini selama empat minggu / 28 hari.

Dilakukan pula uji pendahuluan untuk menentukan dosis obat kontrol positif yaitu metotreksat, dikarenakan efek samping obat tersebut yang bersifat

toksik sehingga dapat menyebabkan kematian pada tikus. Dosis optimal yang didapatkan dari uji pendahuluan adalah 0,05 mg/200 g bb/hari (dari dosis 0,2 mg, 0,1 mg dan 0,05 mg) karena dengan dosis 0,05 mg tersebut sudah dapat menurunkan volume edema namun tidak menyebabkan kematian pada tikus.

3.4 Prosedur penelitian

3.4.1 Persiapan bahan

3.4.1.1 Penyiapan dan pembuatan serbuk daun babandotan

Daun babandotan (*A. conyzoides* L.) didapatkan dalam bentuk simplisia kering lalu digrinding (Lampiran 7). Serbuk simplisia diayak menggunakan ayakan mesh 40, selanjutnya serbuk ditimbang sebanyak 1,5 kilogram.

3.4.1.2 Pembuatan ekstrak daun babandotan

Pembuatan ekstrak daun babandotan dibuat dengan cara maserasi (Lampiran 8) dengan pengadukan dan menggunakan pelarut etanol 70 % (Lampiran 9). Dasar pemilihan pelarut untuk ekstrak babandotan adalah berdasarkan dari penelitian Moura et al., (2003), Hassan et al., (2012), Awad, et al., (2013), dan Afrianti dkk., (2014), yang melaporkan bahwa ekstrak etanol 70% dari daun babandotan memiliki efek anti inflamasi.

Cara pembuatan ekstrak adalah sebagai berikut ;

- a. Sebanyak 1.500 gram serbuk simplisia ditambahkan etanol 70% dengan perbandingan 1:5 dan direndam selama 72 jam dengan 6 jam pertama sambil sesekali dilakukan pengadukan dengan *shaker*
- b. Maserat dipisahkan dengan cara difiltrasi menggunakan kain penyaring.
- c. Proses remaserasi dilakukan sampai tiga kali dengan jenis dan pelarut yang sama, warna maserat dari hijau kecoklatan gelap sampai hampir tidak berwarna dan seluruh maserat dikumpulkan .
- d. Maserat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary vaccum evaporator* dengan suhu 50 °C dengan kecepatan putar 30 rpm.
- e. Maserat yang tersisa diuapkan menggunakan cawan penguap di dalam *waterbath* dengan suhu 40-50 °C dan dilanjutkan dengan oven vakum sampai diperoleh ekstrak kental.

- f. Ekstrak yang didapatkan selanjutnya ditimbang dan diukur kadar airnya dan disimpan dalam botol kaca gelap lalu dihitung rendemennya (Margaretha, 2012; Depkes RI, 2011; Ansel, 2008).

3.4.1.3 Penyiapan suspensi CMC

Ekstrak disuspensikan sesuai perhitungan dosis, dengan menggunakan CMC (*Carboxymethylcellulose*) 0,5% sebagai bahan pensuspensi. Sejumlah serbuk CMC sebanyak 100 mg ditimbang, lalu ditaburkan pada lumpang yang berisi akuades hangat (70°C) sebanyak 5 mL. CMC dibiarkan mengembang selama sekitar 10 menit, lalu digerus perlahan-lahan bersama sediaan ekstrak sampai larut sambil ditambahkan akuades hingga jumlah 20 mL. Suspensi baru dibuat saat akan diberikan ke tikus, dan pemberian dilakukan secara oral dengan sonde.

3.4.1.4 Pembuatan *neutral buffered formalin*

Larutan formaldehid 37-40 % 10,0 mL dicampurkan dengan natrium dihidrogen fosfat 400 mg dan dinatrium hidrogen sulfat 650 mg, lalu diaduk hingga larut, kemudian ditambahkan akuades hingga volume mencapai 100,0 mL sambil diaduk sampai rata.

3.4.2 Penentuan dosis

3.4.2.1 Dosis ekstrak etanol 70 % daun babandotan

Belum didapatkan dosis ekstrak daun *A. conyzoides* sebagai anti-arthritis rematoid, namun berdasarkan Hassan et al., (2012), dosis ekstrak yang dapat digunakan untuk anti-inflamasi pada tikus adalah 200-3200 mg / kg bb po dengan batas aman sampai 3200 mg/kg bb po. Dosis yang paling efektif pada penelitian tersebut adalah 400 mg, sehingga digunakan sebagai dosis kedua dari penetapan dosis bahan uji. Faktor konversi manusia ke tikus adalah 0,018 dan faktor koreksi farmakokinetika =10. Berikut ini adalah penentuan dosis harian ekstrak daun babandotan per 200 g bb tikus (Lampiran 10):

- a. Dosis I : $200 \text{ mg/kg bb} \times 200 \text{ g/1000 g} = 40 \text{ mg}$
- b. Dosis II : $400 \text{ mg/kg bb} \times 200 \text{ g/1000 g} = 80 \text{ mg}$

c. Dosis III : $800 \text{ mg /kg bb} \times 200 \text{ g/1000 g} = 160 \text{ mg}$

3.4.2.2 Pembuatan dan penentuan dosis larutan metotreksat

Berdasarkan kriteria *American College of Rheumatology* (Dehestani et al, 2015), dosis serbuk metotreksat per oral yang digunakan untuk artritis rematoid adalah 7,5 mg–15 mg perminggu, sedangkan menurut Cronstein (2005) adalah 15-17,5 mg perminggu. Dengan LD₅₀ dosis oral pada tikus adalah 180 mg/kg. Dari dosis terendah ACR didapatkan dosis untuk tikus pada uji artritis adalah 0,198 mg/200 g bb perhari.

$$\begin{aligned} \text{Dosis konversi} &= \text{dosis manusia} \times \text{f. konversi tikus} \times \text{f. farmakokinetik} & (3.2) \\ &= 1,1 \text{ mg / hari} \times 0,018 \times 10 \\ &= 0,198 \text{ mg /200 g} = 0,2 \text{ mg / 200 g bb tikus/ hari} \end{aligned}$$

Sedangkan menurut Wang dan Chiang (2012), dosis metotreksat pada tikus biasanya menggunakan kisaran 0,1-0,5 mg/kg/hari (0,02 mg-0,1 mg/200 g bb/hari). Dari uji pendahuluan optimasi dosis metotreksat didapatkan dengan dosis 0,05 mg sudah dapat menurunkan volume edema kaki tikus. Sehingga di penelitian ini dipakai dosis 0,05 mg/200 g bb/hari (Lampiran 11) (Wang & Chiang, 2012).

3.4.3 Penetapan rendemen

Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan dibandingkan dengan bobotnya dengan serbuk simplisia awal yang digunakan. Perbandingan tersebut dinyatakan dalam % (persen). Semakin tinggi nilai rendemen semakin banyak jumlah ekstrak yang dihasilkan. Penetapan rendemen berguna untuk pemberian dosis ekstrak yang akan diberikan pada hewan uji (Depkes RI, 2000). Didapatkan dari Afrianti dkk., (2014), bahwa rendemen ekstrak etanol 70% daun babandotan yang didapat adalah sebanyak 7,16 %.

3.4.4 Karakterisasi ekstrak daun babandotan

Dilakukan karakterisasi ekstrak dengan meliputi: pemeriksaan organoleptik ekstrak, parameter non spesifik dan parameter spesifik.

3.4.4.1 Pemeriksaan organoleptik ekstrak

Diperiksa berupa bentuk, warna, bau, dan rasa dari ekstrak

3.4.4.2 Parameter non spesifik

Parameter yang diperiksa berupa penetapan kadar air, kadar abu total, dan kadar abu tidak larut asam.

a. Penetapan kadar air

Alat Labu 500 mL (A) dihubungkan dengan pendingin air balik (C) melalui alat penampung (B) yang dilengkapi dengan tabung penerima 5 mL (E) yang berskala 0,1 mL. Dipanaskan menggunakan pemanas listrik yang suhunya dapat diatur atau tangas minyak. Bagian atas labu tabung penyambung (D) sebaiknya dibungkus dengan asbes. Pereaksi : *Toluen jenuh air*. Dikocok sejumlah toluen P dengan sedikit air, dibiarkan memisah dan lapisan air dibuang.

Prosedur.

Tabung penerima dan pendingin dibersihkan dengan *asam pencuci*, dibilas dengan air, kemudian dikeringkan dalam lemari pengering. Ditimbang saksama sejumlah bahan yang diperkirakan mengandung 1 sampai 4 mL air, masukkan ke dalam labu kering. Dimasukkan lebih kurang 200 mL toluen jenuh air ke dalam labu, dan dipasang rangkaian alat. Toluene jenuh air dimasukkan ke dalam tabung penerima (E) melalui pendingin sampai leher alat penampung (B). Labu dipanaskan dengan hati-hati selama 15 menit.

Setelah toluen mulai mendidih, penyulingan diatur dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik, lalu dinaikkan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluen jenuh air. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima didinginkan hingga suhu ruang. Volume air dibaca setelah air dan toluen memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b (Depkes RI, 2011).

b. Penetapan kadar abu total

Krus silikat / *crusable* porselen dipanaskan dalam tanur dengan suhu 600°C selama 2 jam selanjutnya krus dimasukkan ke dalam desikator dan didiamkan selama 60 menit. Dilakukan penimbangan awal. Selanjutnya prosedur yang sama seperti diatas diulangi (pemanasan dengan tanur dan

dimasukkan dalam desikator). Dilakukan penimbangan beberapa kali sampai didapatkan berat krus yang konstan.

Selanjutnya ekstrak dimasukkan ke dalam krus setelah ditimbang secara seksama sebanyak 2 gram. Dilakukan pemanasan dalam tanur dengan suhu 600°C selama 2 jam selanjutnya krus dimasukkan ke dalam desikator dan didiamkan selama 60 menit. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas, diaduk dan disaring melalui kertas saring bebas abu. Dilakukan pemijaran kertas saring beserta sisa penyaringan dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus, diuapkan dan dipijarkan hingga bobot tetap. Dilakukan penimbangan sampai didapat berat konstan dan dicatat kadar abu dari ekstrak. Prosedur dilakukan secara triplo. Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b (Depkes RI, 2011).

c. Penetapan kadar abu tidak larut asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total dididihkan dengan 25 mL asam klorida encer LP selama 5 menit. Bagian yang tidak larut dikumpulkan dalam asam, disaring melalui kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, krus dipijarkan dalam tanur bersuhu 600°C selama 2 jam selanjutnya dimasukkan kedalam desikator selama 60 menit. Dilakukan penimbangan hingga didapat bobot tetap. Prosedur dilakukan secara triplo. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b (Depkes RI, 2011).

3.4.4.3 Parameter spesifik

Parameter yang diperiksa meliputi skrining fiokimia dan Kromatografi lapis tipis.

a. Skrining fitokimia

Dilakukan untuk mengetahui senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak etanol 70% daun babandotan seperti flavonoid, tanin, alkaloid, terpenoid-sterol, dan saponin. Pengujian ini dilakukan dengan cara sebagaimana berikut (Depkes RI, 1995; Elya, dkk, 2015) :

a.1 Uji flavonoid

Sebanyak 50 mg ekstrak dilarutkan dalam 3 mL etanol (95%), kemudian ditambahkan 100 mg serbuk Mg dan 10 tetes asam HCl pekat. Jika terjadi warna merah ungu menunjukkan adanya flavonoid. Jika warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon dan auron.

Sebanyak 50 mg ekstrak dilarutkan dalam 3 mL etanol (95%), kemudian ditambahkan 100 mg serbuk Zn dan 2 mL HCl 2N didiamkan 1 menit lalu ditambahkan 10 tetes HCl pekat P, jika dalam waktu 2-5 menit terjadi warna merah intensif, menunjukkan ada flavonoid (glikosida-3-flavonol) (Depkes RI, 1995).

a.2 Uji tanin

Sekitar 20 mg ekstrak kental dilarutkan dalam 15 mL akuades panas, lalu dikocok hingga homogen dan disaring. Selanjutnya sebanyak 1 mL dikerjakan sebagai berikut : filtrat ditambahkan 3 mL gelatin 10% akan didapat endapan putih. Selanjutnya filtrat ditambah 2 tetes larutan FeCl_3 3%, akan terbentuknya warna hijau violet. Dan filtrat ditambah 3 mL larutan NaCl+gelatin akan menunjukkan adanya endapan putih. Semua ini menunjukkan bahwa dalam simplisia terdapat tanin (Depkes RI, 1995).

a.3 Uji alkaloid

Sekitar 20 mg ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 mL asam klorida encer dan 9 mL air, lalu dipanaskan dalam breaker glass diatas *waterbath* selama 2 menit. Larutan didinginkan lalu disaring. Filtrat dari hasil penyaringan dibagi menjadi 3 bagian untuk diuji oleh beberapa pereaksi, seperti: pereaksi *Mayer*, pereaksi *Bouchardat* dan pereaksi *Dragendorff*.

Pada penambahan reaksi *Mayer*, hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna putih atau kuning yang larut dalam metanol. Hasil positif dari pereaksi *Bouchardat* ditunjukkan dengan adanya endapan berwarna coklat hingga hitam. Hasil positif dari pereaksi

Dragendorff ditunjukkan dengan adanya endapan jingga coklat (Depkes RI, 1995).

a.4 Uji terpenoid-sterol

Sejumlah 100 mg ekstrak diencerkan dengan 3 mL etil asetat, ditambahkan pereaksi *Lieberman-Bouchard* (campuran asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (2:1). Hasil positif ditandai oleh terbentuknya warna merah hijau atau violet biru (Depkes RI, 1995).

a.5 Uji saponin

Sebanyak kurang lebih 50 mg ekstrak dalam tabung reaksi ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan lalu dikocok kuat-kuat selama kurang lebih 10 detik, lalu didiamkan selama 10 menit. Terjadi pembentukan buih, sekurang-kurangnya setinggi 1-10 cm dan persisten selama 10 menit serta buih tidak hilang setelah penambahan 1 tetes asam klorida encer menunjukkan dalam simplisia terdapat saponin (Depkes RI, 1995).

b. Kromatografi lapis tipis

Untuk melakukan pemisahan kandungan kimia sehingga dapat diidentifikasi komponen dalam ekstrak tanaman uji maka dilakukan kromatografi lapis tipis (KLT). Pemisahan yang terjadi pada KLT berdasarkan pada adsorpsi partisi dari fase diam dan fase gerak yang digunakan. bercak yang didapatkan dari ekstrak tanaman uji dibandingkan dengan larutan pembanding dan selanjutnya dideteksi dengan pendeteksi sinar UV 254 nm dan 366 nm dan bila perlu diberikan larutan penyemprot pereaksi.

Dilakukan penjenjuran bejana dengan cara menempatkan kertas saring dalam bejana kromatografi. Tinggi kertas saring 18 cm dan lebarnya sama dengan lebar bejana. Masukkan sejumlah larutan pengembang ke dalam bejana kromatografi, hingga tinggi 0,5-1 cm dari dasar bejana. Selanjutnya ditutup kedap dan dibiarkan hingga kertas saring basah seluruhnya. Kertas saring selalu harus tercelup ke dalam larutan pengembang pada dasar bejana.

Ekstrak sebanyak 10 mg direndam sambil dikocok dengan 10 mL pelarut yang sesuai (etanol) selama 10 menit diatas penangas air. Filtrat dimasukkan ke dalam labu terukur 10 mL, dan ditambahkan pelarut etanol sampai tanda. Sebagai larutan pembandingnya digunakan kuersetin dalam pelarut etanol.

Larutan uji dan larutan pembanding (kuersetin) disiapkan dengan menggunakan fase diam silika gel F₂₅₄, dan fase gerak toluene : etil asetat : asam format (58:33:9). Larutan larutan uji dan larutan pembanding masing masing ditotolkan sebanyak 10 µL dengan jarak 1,5 - 2 cm dari tepi bawah tempat penotolan dan dimasukkan ke bejana kromatografi. Penotolan juga dapat dilakukan dengan alat linomat 5 (Camag). Larutan pengembang dalam bejana harus mencapai tepi bawah lapisan penyerap dan totolan jangan sampai terendam. Tutup bejana diletakkan pada tempatnya dan sistem fase gerak dibiarkan merambat sampai batas jarak rambat. Lempeng dikeluarkan dan dikeringkan di udara lalu bercak diamati dengan sinar tampak, ultraviolet gelombang 254 nm dan 366 nm. Bercak dari titik penotolan diamati, diukur dan dicatat. Selanjutnya nilai R_f (*retardation factor*) ditentukan, dimana nilai R_f diperoleh dengan mengukur jarak rambat senyawa dari titik awal hingga pusat bercak dibagi dengan jarak rambat fase gerak hingga garis depan (Hanani, 2016; Depkes RI, 2011).

3.4.5 Penyiapan hewan uji

Sebelum dilakukan perlakuan, tikus diaklimasi selama 1 minggu dalam kandang di Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi UI, agar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan baru. Dilakukan pengamatan terhadap keadaan umum hewan uji, seperti berat badan dan keadaan fisiknya. Apabila diketahui sakit atau cacat maka tidak diikuti dalam pengujian ini. Dilakukan randomisasi dimana tikus dikelompokkan secara acak dengan jumlah 6 ekor untuk tiap kelompoknya dalam satu kandang. Tikus yang diteliti harus dinyatakan sehat dan dilakukan penimbangan serta pengamatan umum secara rutin (Ridwan, 2013).

3.4.6 Prosedur uji anti-arthritis rematoid

Semua tikus diberikan aklimatisasi/proses adaptasi selama 7 hari dan tikus diperiksa keadaan umumnya lalu secara acak sederhana dikelompokkan menjadi 6 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 6 tikus.

Pada hari ke-1, semua tikus ditimbang bobotnya dan diukur volume telapak kaki kiri belakang dan selanjutnya dilakukan induksi tikus dengan CFA (*Complete freund's adjuvant*) dengan dosis 1 mg/mL sebanyak 0,1 mL, kecuali tikus kelompok normal yang disuntik dengan normal salin sebanyak 0,1 mL. Penyuntikan dilakukan secara subkutan pada *hindpaw* kaki kiri tikus (telapak kaki bagian belakang). Tikus ditunggu selama 28 hari sampai terlihat tanda peradangan dan pembengkakan telapak kaki sampai mata kaki, yang menunjukkan tikus mengalami gejala arthritis (Morgan & Marshall, 1999; Almarestani, et al., 2011; Patel & Shah, 2013).

Selanjutnya perlakuan tikus dibedakan berdasarkan kelompoknya. Pembagian perlakuan tikus dibedakan berdasarkan kelompoknya, yaitu :

- a. Pada kelompok normal, hari ke-29 sampai dengan hari ke-49 diberi suspensi CMC 0,5% sebanyak 2 mL/ hari secara oral per sonde.
- b. Pada kelompok kontrol negatif, hari ke-29 sampai dengan hari ke-49 diberi suspensi CMC 0,5% sebanyak 2 mL/ hari secara oral per sonde.
- c. Pada kelompok kontrol positif, hari ke-29 sampai dengan hari ke-49 diberi larutan metotreksat dalam normal salin sebanyak 2 mL/hari secara oral per sonde
- d. Dan kelompok bahan uji, yaitu dosis I, II dan III, hari ke-29 sampai dengan hari ke-49 diberi suspensi bahan uji ekstrak daun babandotan dalam CMC 0,5% sebanyak 2 mL/ hari secara oral per sonde.

Pembagian kelompok perlakuan pada tikus dapat dilihat pada Tabel 3.1 berikut ini.

Tabel 3.1 Pembagian kelompok tikus

No	n (ekor)	Kelompok	Perlakuan pada tikus
I	6	Kontrol normal tanpa induksi CFA	Hari-1 diberi suntikan NS 0,1 mL Hari ke-29-49 diberi sonde CMC 0,5 %, 2 mL
II	6	Kontrol negatif dengan induksi CFA	Hari-1 diberi suntikan berisi CFA 0,1 mL Hari-29 sampai hari-49 diberi sonde berisi suspensi CMC 0,5 % tanpa obat sebanyak 2 mL
III	6	Kontrol positif metotreksat	Hari -1 diberi suntikan berisi CFA 0,1 mL Hari ke-29-49 diberi sonde berisi larutan metotreksat dalam normal salin sebanyak 2 mL
IV	6	Perlakuan daun babandotan dosis I (40 mg)	Hari -1 diberi suntikan berisi CFA 0,1 mL Hari ke-29-49 diberi sonde berisi suspensi ekstrak bahan uji dalam CMC 0,5%, 2 mL
V	6	Perlakuan daun babandotan dosis II (80 mg)	Hari -1 diberi suntikan berisi CFA 0,1 mL Hari ke-29-49 diberi sonde berisi suspensi ekstrak bahan uji dalam CMC 0,5%, 2 mL
VI	6	Perlakuan daun babandotan dosis III (160 mg)	Hari -1 diberi suntikan berisi CFA 0,1 mL Hari ke-29-49 diberi sonde berisi suspensi ekstrak bahan uji dalam CMC 0,5% 2 mL

3.4.6.1 Pengukuran volume edema kaki tikus

Volume telapak kaki tikus pada tiap kelompok diukur dengan cara mencelupkan telapak kaki tikus ke dalam alat pletismometer (Lampiran 4) pada hari ke-1 sebelum diinduksi oleh CFA selanjutnya ditunggu sampai hari ke-28 (minggu ke-4). Setelah semua kelompok tikus diberi perlakuan, telapak kaki tikus diukur lagi tiap minggu mulai hari ke 29, 36, 43, dan 50 (selama 21 hari). Pengukuran volume edema kaki tikus berupa volume kaki dari jari sampai batas mata kaki tempat terjadinya edema setelah penyuntikan CFA, didapatkan dari pengurangan volume telapak kaki hari ke-x dikurangi dengan volume telapak kaki hari ke-1 (Lampiran 12). Hasil volume telapak kaki tikus setelah diberi perlakuan dibuat rata-ratanya tiap kelompok. Dilakukan penghitungan volume edema kaki dan data yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan statistik.

3.4.6.2 Isolasi sendi pergelangan kaki tikus dan pembuatan preparat tulang *calcaneus*

Pada hari ke-50 atau akhir perlakuan, semua tikus dikorbankan dengan menggunakan uap eter. Pembedahan dilakukan untuk mengisolasi sendi pergelangan kaki (sendi *ankle*) pada kaki kiri tikus dengan menggunakan alat bedah. Tulang dibersihkan dari jaringan dan lemak yang menempel. Bagian sendi pergelangan kaki sampai ujung distal kaki tikus yang sudah diisolasi dimasukkan ke dalam *neutral buffer formalin* 10% (NBF). Selanjutnya untuk pemeriksaan histopatologi dilakukan potongan secara sagital/longitudinal pada tengah telapak kaki tikus (mid line) yang dapat dilihat pada Gambar 3.1 (Bolon et al., 2011).



(Sumber Bolon et al., 2011, dengan modifikasi.)

Gambar 3.1 Isolasi sendi pergelangan kaki tikus

Dilakukan pembuatan preparat histologi dari tulang *calcaneus* kaki tikus dengan cara fiksasi, dekalsifikasi, dehidrasi, penjernihan, infiltrasi dan penanaman/embedding pada blok paraffin, pemotongan, dan deparafinisasi. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan Hematoksin-Eosin (H&E) (Lampiran 13). Adapun pembuatan preparat histologi dari tulang kaki dengan langkah kerja sebagai berikut:

1. Fiksasi

Dilakukan fiksasi spesimen tulang selama 48 jam pada suhu ruang dengan 10% *neutral buffered formalin* (NBF), dengan diberikan volume larutan fiksasi 15-20 kali volume jaringan.

2. Dekalsifikasi

Spesimen kemudian dibilas dengan akuades dan ditempatkan dalam larutan pendekalsifikasi menggunakan larutan TB-1 dengan volume 10-15 kali volume spesimen, selama 24-48 jam dengan pengadukan perlahan. Spesimen

lalu dibilas dengan akuades dan direndam dalam etanol 70%, lalu dibilas kembali dengan akuades.

3. Pemotongan dan dehidrasi

Setelah spesiemen menjadi lunak karena proses dekalsifikasi, spesiemen dipotong longitudinal (Gambar 3.2). Spesiemen direndam dalam air mengalir. Spesiemen direndam dengan etanol 70% selama 1 jam dengan pengadukan, lalu direndam ke dalam etanol 96% selama 1 jam dengan pengadukan, lalu rendam kembali dengan etanol 96% segar selama 1 jam dengan pengadukan dan dilanjutkan dengan perendaman etanol absolut selama 1 jam lalu rendam kembali dengan etanol absolut segar selama 1 jam dengan pengadukan.



(Sumber Bolon et al., 2011, dengan modifikasi)

Gambar 3.2 Pemotongan sendi pergelangan kaki secara sagital/ longitudinal

4. Penjernihan

Spesiemen dijernihkan dengan 50% etanol dan 50% xilen selama 1 jam, kemudian dengan 100% xilen, 1 jam dan perendaman ulang menggunakan 100% xilen segar selama 1 jam.

5. Infiltrasi dan penanaman / *embedding* pada blok parafin

Spesiemen mengalami proses infiltrasi dengan perendaman dalam parafin cair pada oven bersuhu 66⁰C selama 1 jam dalam kondisi vakum, langkah kerja dengan parafin cair diulang menggunakan parafin segar, dan ditanam dengan alat pencetak pada suhu 5-10⁰C diatas titik lebur kemudian didiamkan hingga dingin.

6. Pemotongan

Spesiemen dipotong dengan mikrotom putar sehingga didapatkan ketebalan potongan sebesar 3-5 μ m. Dipanaskan pada *waterbath* suhu 45⁰C. Selanjutnya diletakkan irisan yang rata tanpa tertekuk pada kaca obyektif.

7. Deparafinisasi

Irisan spesimen dideparafinisasi dengan 2 kali perendaman menggunakan xilol, masing masing 10 menit. Lalu dibilas 2 kali dengan etanol absolut, etanol 96% dan etanol 70% masing masing 5 menit untuk menghilangkan xilol, dan kemudian hidrasi diakhiri dengan pembilasan menggunakan akuades selama 5 menit.

8. Pewarnaan dengan hematoksilin-eosin

Potongan spesimen ditempatkan dengan larutan pewarna hematoksilin selama 7 menit. Dibilas dengan akuades mengalir, kemudian direndam dengan larutan eosin dalam etanol 70% selama 30 detik, kemudian didehidrasi dengan etanol bertingkat dari konsentrasi 70% selama 5 menit, dilanjutkan etanol 96% dan absolut, masing-masing sebanyak 2 kali selama 5 menit, dijemihkan dengan 2 kali pergantian xilol, ditetaskan entellan, kemudian ditutup kaca penutup dengan hati-hati untuk menghindari gelembung udara.

3.4.6.3 Pengamatan membran sinovial sendi pergelangan kaki dan penghitungan osteoklas secara histopatologi

Untuk menetapkan diagnosa artritis rematoid dilakukan pengamatan gambaran histopatologis dari membran sinovial sendi pergelangan kaki berupa skor sinovitis dan penghitungan jumlah osteoklas pada tulang *calcaneus* dengan pewarnaan H&E. Berdasarkan penelitian Krenn et al., (2006), gambaran sinovitis pada artritis rematoid berupa pelebaran sel lining lapisan sinovial, kepadatan selular stroma sinovial dan infiltrasi leukosit dievaluasi secara kuantitatif (dari skor 0; tidak ditemukan sampai 3; kuat) secara bertingkat (Lampiran 14). Sel yang terdapat pada stroma sinovial terdiri dari sel menetap/*resident* (fibrosit, fibroblas, sel endothel, makrofag) dan sel yang tidak menetap/*non resident* (limfosit dan plasma sel). Hasilnya didapatkan skor sinovitis dengan interpretasi 0-1: bukan sinovitis, 2-4: sinovitis derajat rendah, 5-9: sinovitis derajat tinggi. Sinovitis derajat tinggi berhubungan kuat dengan diagnosa artritis rematoid (sensitivitas 61,7%, spesifisitas 96,1%) (Krenn et al., 2006). Pengamatan sinovitis kronik dilakukan dengan 2 orang pengamat dengan menggunakan mikroskop (olympus) pembesaran 40 x selanjutnya diperjelas dengan pembesaran 400 x (Lampiran 15).

Perhitungan jumlah osteoklas pada daerah trabekula tulang *calcaneus* dilakukan dengan menggunakan mikroskop (Olympus) dengan perbesaran 200 x dan 400 x. Perhitungan jumlah osteoklas ini dilakukan dengan 2 orang pengamat (Krenn et al., 2006). Dilakukan pengambilan foto dengan kamera optik Optilab. Foto dibuka dengan menggunakan perangkat lunak kemudian osteoklas yang didapatkan dihitung secara manual dan dilakukan pencatatan. Jumlah osteoklas dihitung berdasarkan jumlah total osteoklas per luas pandang (mm^2) yang diukur (Total Noc/Tar) dengan menggunakan pembesaran 200 x dan 400 x (Bolon, 2004).

3.5 Definisi operasional dan variabel penelitian

3.5.1 Definisi operasional

Definisi operasional yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Volume edema kaki adalah volume pembengkakan yang terjadi pada telapak kaki tikus dari jari sampai batas mata kaki, setelah diinduksi dengan CFA (*Complete freund's adjuvant*) kecuali kontrol normal. Volume edema kaki didapatkan dari volume telapak kaki pada hari diperiksa (hari ke-x) dikurangi dengan volume telapak kaki hari ke-1 (sebelum disuntik CFA). Pengukuran volume edema dengan alat pletismometer dilakukan pada tikus pada hari ke-1, dan ditunggu sampai hari ke-28, lalu setelah diberi perlakuan dilakukan pengukuran pada hari ke-29, ke-36, ke-43 dan ke-50. Skala ukur : Rasio (ml).
2. Gambaran histopatologi membran sinovial sendi pergelangan kaki adalah pengamatan histopatologis membran sinovial pada daerah sendi pergelangan kaki tulang tikus secara mikroskopis berupa skor sinovitis (Krenn, et al., 2006) yang dihitung dari jumlah skor lining sel, densitas stroma sinovium dan infiltrasi sel radang, pada kelompok normal, kontrol dan dosis obat pada hari ke-50 setelah induksi CFA. Skala ukur : Ordinal (0-3).
3. Jumlah osteoklas adalah penghitungan jumlah total osteoklas per luas pandang (mm^2) yang diukur (Total Noc/Tar) secara mikroskopis pada tulang *calcaneus* tikus yang terdapat pada kelompok normal, kontrol dan dosis obat pada hari ke-50 setelah induksi CFA. Skala ukur : Rasio (jumlah osteoklas).

4. Ekstrak etanol 70% daun babandotan (*Ageratum conyzoides L.*) adalah ekstrak daun babandotan (*A. conyzoides L.*) yang telah dimaserasi dengan etanol 70 %. Skala ukur : Ordinal (Dosis 40 mg, 80 mg, dan 160 mg / 200 g bb).
5. Berat badan, umur, pakan makanan hewan uji / tikus
 - 5.1 Berat badan adalah berat badan tikus berkisar 150-250 g
 - 5.2 Umur adalah umur tikus yang berkisar 2-3 bulan
 - 5.3 Pakan adalah makanan dan minuman standar yang diberikan kepada tikus.

3.5.2 Variabel penelitian

Variabel dependen dan independen yang digunakan pada penelitian adalah :

- a. Variabel dependen / terikat / yang dipengaruhi pada penelitian ini adalah : volume edema kaki dan gambaran histopatologi membran sinovial (skor sinovitis) sendi pergelangan kaki serta jumlah osteoklas pada tulang *calcaneus* tikus model AR.
- b. Variabel independen / bebas / pengaruh pada penelitian ini adalah : ekstrak etanol 70% daun babandotan (*Ageratum conyzoides L.*)
- c. Variabel pengganggu/ perancu pada penelitian ini adalah : berat badan, umur, pakan tikus.

3.6 Analisis data

Data yang akan diperoleh adalah volume edema kaki dan skoring sinovitis membran sinovial sendi pergelangan kaki serta jumlah osteoklas pada tulang *calcaneus* kaki tikus. Data tersebut diolah dengan menggunakan perangkat lunak *SPSS Statistik 17 for windows*. Pertama-tama data dianalisis secara deskriptif untuk mendapatkan mean, median, nilai maksimum, nilai minimum dan standar deviasi. Selanjutnya data tersebut diuji dengan uji *Saphiro-Wilk* untuk melihat normalitas data dan uji *Lavene* untuk melihat homogenitas variasi data. Selanjutnya dianalisis apakah ada perbedaan bermakna atau tidak dengan analisa varians satu arah (ANAVA) atau Kruskall wallis. Dan untuk melihat adanya perbedaan tiap kelompok perlakuan dilanjutkan dengan melakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) atau uji *Man Whitney* (Dahlan, 2012; Supardi & Surahman, 2014).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Tinjauan umum

Arthritis rematoid (AR) adalah penyakit inflamasi sistemik kronik dan progresif, yang menyerang sendi secara simetris dengan etiologi belum jelas (Schuna, 2005; Wells et al., 2009; Radis, 2012; Rosenbergh, 2013; Ikawati, 2014). Penyakit yang termasuk penyakit autoimun ini ditandai dengan proliferasi fibroblas, infiltrasi sel inflamasi yang menyebabkan peningkatan ekspresi sitokin pro-inflamasi sehingga menyebabkan kerusakan sendi dan tulang. AR dapat menyebabkan morbiditas dan kecacatan, serta menimbulkan pengeluaran biaya kesehatan yang cukup besar sehingga terus diupayakan penanganannya (WHO, 2015; Schuna, 2005; Wells et al., 2009; McInnes & Schett, 2011). Saat ini penggunaan obat alternatif berbahan alam semakin diminati oleh masyarakat di seluruh dunia (Patel & Shah, 2015).

Penelitian ini dilakukan untuk menguji efektivitas bahan alam tanaman babandotan (*Ageratum conyzoides L.*) sebagai anti-arthritis rematoid. Ekstrak etanol daun babandotan (*Ageratum conyzoides L.*) diujikan pada tikus putih yang diinduksi *complete freund's adjuvant* (CFA) (Lampiran 16). Pemilihan model AR pada hewan penting dilakukan meliputi prediksi efektivitas hewan uji, jangka waktu yang diperlukan, dapat menghasilkan data yang baik, dan mempunyai patogenesis yang hampir sama dengan manusia (Bendele, 2001). Tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih galur *Sprague Dawley* jantan karena galur ini merupakan model AR yang telah banyak digunakan di laboratorium dan dapat menghasilkan keberhasilan dalam uji arthritis (Bolon et al., 2011; Bevaart et al., 2010). Digunakan tikus putih jantan untuk mengurangi kerancuan yang disebabkan karena faktor lain seperti hormonal pada tikus betina. Efek anti-arthritis rematoid yang diteliti adalah perubahan volume edema kaki dan perubahan gambaran histopatologi membran sinovial sendi pergelangan kaki berupa sinovitis dan jumlah osteoklas pada tulang *calcaneus* tikus yang diinduksi dengan CFA. CFA digunakan sebagai adjuvant karena dari berbagai penelitian pre klinis yang secara luas

dilakukan, penggunaan CFA berhasil untuk membuat model tikus AR (Bolon et al., 2011; Patel & Shah, 2015). Hasil dari induksi CFA memperlihatkan onset yang cepat, progresitas yang kuat, mudah diperiksa, dapat menyebabkan inflamasi poliartikular, dan resorpsi tulang (Bendele, 2001).

Digunakan daun babandotan karena tanaman ini termasuk tanaman yang sudah sering digunakan oleh masyarakat karena mempunyai berbagai macam manfaat termasuk sebagai anti-inflamasi, namun penelitian sebagai anti-arthritis rematoid di Indonesia belum banyak dilakukan. Selain itu tanaman ini banyak terdapat di Indonesia dan tersebar di berbagai negara yang terutama beriklim tropis dan sub tropis sehingga mudah didapat, bahkan sering disebut sebagai tanaman gulma. Bahan uji yang digunakan pada penelitian ini diberikan dalam bentuk ekstrak etanol 70 %. Diduga senyawa yang paling berefek sebagai anti-arthritis rematoid adalah senyawa golongan flavonoid (terutama kuersetin). (Moura et al., 2005; Hassan et al., 2012; Awad et al., 2013). Digunakan pelarut etanol yang bersifat polar yang dapat menarik senyawa yang juga bersifat polar dalam proses ekstraksi. Selain itu etanol merupakan pelarut yang relatif aman untuk digunakan secara oral pada hewan uji dan merupakan pelarut yang ramah terhadap lingkungan.

Dosis ekstrak daun babandotan yang digunakan adalah dosis bertingkat yang didapatkan dari penelitian Hassan et al., (2012), bahwa dosis yang paling efektif untuk uji arthritis pada tikus dari rentang dosis 200-3200 mg/kg bb/hari adalah sebanyak ekstrak 400 mg/kg bb/hari. Dosis ini selanjutnya digunakan sebagai dosis kedua lalu dibuat dosis pertama dan dosis ketiga sebagai perbandingan untuk menguji keefektifannya. Dari ketiga dosis ini selanjutnya ditentukan jumlah dosis ekstrak daun babandotan yang digunakan dengan menggunakan rendemen yang didapatkan. Rendemen yang didapatkan pada penelitian ini adalah 16,2 %. Penetapan dosis ini digunakan untuk menentukan dosis optimum untuk efek anti-arthritis rematoid yang kemudian dibandingkan pengaruhnya terhadap perubahan volume edema kaki, skor sinovitis pada gambaran histopatologi membran sinovial sendi pergelangan kaki dan jumlah osteoklas pada tulang *calcaneus* kaki tikus.

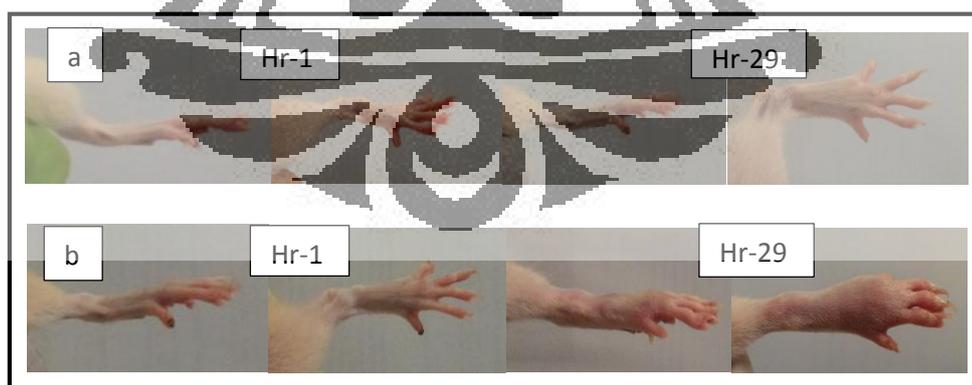
Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah metotreksat dalam dosis rendah dari golongan DMARD yang merupakan *first line therapy* dalam pengobatan arthritis rematoid, yang dapat memperlambat progresitas penyakit

(Schuna, 2005; Wells et al., 2009; Radis, 2012). Faktor ekonomis juga merupakan sebab dimana metotreksat lebih digunakan dibandingkan golongan DMARD lainnya. Obat golongan kortikosteroid dan NSAID tidak dapat mencegah perburukan perjalanan penyakit ini namun hanya menutupi gejala, sehingga tidak digunakan dalam penelitian ini.

4.2 Hasil uji pendahuluan

Pada penelitian ini dilakukan beberapa uji pendahuluan yaitu uji pendahuluan untuk memastikan terbentuknya model AR hewan uji dengan induksi CFA dan uji pendahuluan untuk memastikan berapa lama masa tunggu untuk mendapatkan keadaan tikus sudah dalam keadaan artritis rematoid. Selain itu dilakukan pula uji pendahuluan optimasi penggunaan obat standar dari terapi AR yaitu metotreksat karena adanya efek samping yang bersifat toksik dari obat tersebut.

Uji pendahuluan yang pertama dilakukan adalah untuk memastikan bahwa induksi tunggal CFA dosis 1 mg/ml sebanyak 0,1 ml sudah dapat menyebabkan reaksi inflamasi kronik yang bertujuan untuk membuat hewan model AR. Uji pendahuluan dilakukan dengan menggunakan dua kelompok tikus, yaitu kelompok normal yang diberi induksi normal salin 0,1 ml, dan kelompok artritis yang diberikan induksi CFA 0,1 ml (dosis 1 mg/ml) pada telapak kaki kiri tikus. Gambar 4.1 memperlihatkan hasil pengamatan uji pendahuluan telapak kaki tikus.



Keterangan : (a) Telapak kaki tikus kelompok normal pada hari ke-1 dan hari-29 (diberi NaCl 0,9 %); (b) Telapak kaki tikus kelompok artritis pada hari ke-1 dan hari-29 (induksi CFA 0,1 ml)

Gambar 4.1 Hasil pengamatan telapak kaki tikus uji pendahuluan

Pada Gambar 4.1 terlihat pada kelompok normal (a) yang tidak diinduksi CFA pada hari ke-29, tidak mengalami perubahan volume telapak kaki dibandingkan dengan hari ke-1. Sedangkan pada gambar (b) yang merupakan kelompok artritis yang diinduksi CFA terlihat perbedaan volume telapak kaki, dimana telapak kaki tikus pada hari ke-29 terlihat membengkak/edema dan memerah dibandingkan dengan hari ke-1. Hal ini disebabkan karena induksi CFA mengakibatkan terjadinya inflamasi kronis pada telapak kaki tikus, yang sebagian tandanya adalah membengkak/edema dan memerah. Dilakukan pengukuran volume telapak kaki kiri tikus uji pendahuluan sebelum diinduksi dan setiap minggu setelah diinduksi sampai hari ke-50. Volume edema kaki tikus diperoleh dari pengurangan volume telapak kaki kiri setelah perlakuan, dengan volume telapak kaki hari pertama. Didapatkan hasil adanya kenaikan volume edema rata-rata kaki tikus yang dapat dilihat pada Tabel 4.1 dibawah ini.

Tabel 4.1 Volume edema rata-rata kaki tikus uji pendahuluan

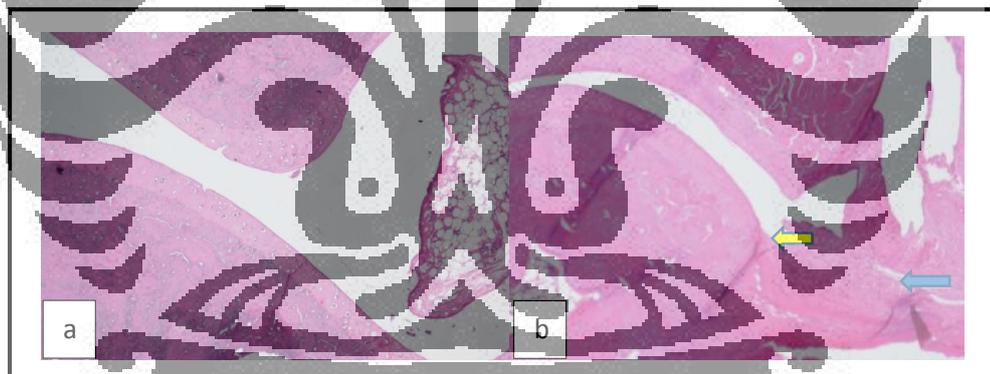
Kelompok	Volume edema rata-rata kaki tikus \pm Sd						
	Hr ke-8	Hr ke-15	Hr ke-22	Hr ke-29	Hr ke-36	Hr ke-43	Hr ke-50
Normal	0,10 \pm 0,08	0,13 \pm 0,10	0,18 \pm 0,13	0,10 \pm 0,10	0,15 \pm 0,07	0,20 \pm 0,00	0,20 \pm 0,00
Artritis I	1,34 \pm 0,05	1,53 \pm 0,52	1,43 \pm 0,38	1,33 \pm 0,35	1,37 \pm 0,38	1,37 \pm 0,29	1,65 \pm 0,35
Artritis II	1,55 \pm 0,75	1,50 \pm 0,33	1,80 \pm 0,50	1,73 \pm 1,01	1,97 \pm 1,05	1,75 \pm 1,06	1,80 \pm 0,57

Keterangan : Kelompok normal = induksi normal saline 0,1 ml; kelompok artritis I dan II = induksi CFA 0,1 ml (1 mg/ml).

Berdasarkan tabel 4.1 diatas terlihat adanya kenaikan volume edema rata-rata kaki tikus pada hari ke-8 sampai hari ke-50 hanya pada kelompok yang diinduksi CFA. Data menunjukkan bahwa inflamasi sudah terjadi pada minggu pertama dan inflamasi tetap terjadi sampai pengamatan hari ke-50 pada kelompok tikus artritis. Sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian induksi CFA dosis 1 mg/ml sebanyak 0,1 ml sudah dapat membuat model tikus AR, berupa edema kaki tikus yang merupakan salah satu tanda inflamasi.

Artritis rematoid merupakan penyakit yang kronis, sehingga untuk mendapatkan kondisi tikus model AR harus dilakukan optimasi masa tunggu

setelah diinduksi oleh adjuvant CFA, namun dari penelusuran literatur beberapa penelitian didapatkan perbedaan waktu masa tunggu (Mulyaningsih & Darmawan, 2006; Almarestani et al., 2011). Maka selanjutnya untuk lebih memastikan masa tunggu terbentuknya model AR, dilakukan pemeriksaan uji pendahuluan dengan menggunakan parameter histopatologi untuk melihat perubahan gambaran histopatologi dari membran sinovial pada sendi pergelangan kaki tikus. Berdasarkan penelitian Almarestani et al., (2011), diketahui bahwa model AR pada tikus sudah jelas terbentuk hari ke-30, maka tikus mulai dikorbankan untuk dilakukan pengamatan pada minggu ke-3, ke-4, dan ke-5 setelah tikus diinduksi CFA. Setelah dikorbankan, sendi pergelangan kaki /sendi *ankle* kaki tikus diisolasi dan dibuat preparat histopatologi lalu dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop. Dari pengamatan didapatkan bahwa pada kelompok induksi di minggu ke-4 sudah didapatkan keadaan sinovitis yang merupakan gambaran histopatologi pada AR bila dibandingkan dengan kelompok normal. Gambaran histopatologi uji pendahuluan dapat dilihat pada Gambar 4.2 berikut.



Keterangan: (a) Histopatologi kelompok normal minggu ke-4 (diberi NaCl 0,9 %); (b) Histopatologi kelompok induksi minggu ke-4 (induksi CFA 0,1 ml); panah biru: memperlihatkan panus; panah kuning : memperlihatkan degradasi kartilago (Pembesaran 100 x; H&E)

Gambar 4.2 Hasil pengamatan histopatologi uji pendahuluan

Dari Gambar 4.2 diatas dapat terlihat dimana kelompok normal (a) membran sinovial sendi pergelangan kaki tikus terlihat normal; dimana tidak terlihat proliferasi sinovial, infiltrasi sel radang, tidak terdapat panus dan tidak terlihat kerusakan pada kartilago tulang *calcaneus*. Sedangkan pada kelompok induksi CFA (b) pada minggu ke-4 sudah terlihat penebalan stroma membran sinovial,

terlihat juga adanya infiltrasi dari sel radang pada stroma membran sinovial, dan didapatkan pula adanya panus yang merupakan jaringan neovaskular invasif dari membran sinovial yang dapat merusak jaringan sekitarnya. Pada kelompok induksi CFA juga didapatkan kerusakan/degradasi dan penipisan kartilago tulang *calcaneus*. Hal ini menunjukkan bahwa telah terjadi proses peradangan atau sinovitis pada membran sinovial sendi pergelangan kaki pada hewan uji pada minggu keempat. Berdasarkan hasil uji pendahuluan ini didapatkan bahwa minggu keempat merupakan waktu yang terbaik untuk melakukan uji anti-arthritis rematoid karena dari hasil pengamatan histopatologis sudah didapatkan hasil gambaran sinovitis kronik yang cukup jelas pada membran sinovial sendi pergelangan kaki tikus (Krenn et al., 2006).

Selanjutnya dilakukan pula uji pendahuluan penggunaan dosis metotreksat / MTX dosis rendah sebagai kontrol positif dari penelitian ini. Metotreksat merupakan obat golongan DMARD yang digunakan sebagai *first line therapy* pengobatan AR, namun mempunyai efek samping yang merugikan seperti gangguan saluran pencernaan, hematologi, pernafasan, dan fungsi hati (hepatotoksik) (Schuna, 2005; anonimous, 2008; Wells et al., 2009; Suarjana, 2009; Cronstein, 2005), sehingga perlu dilakukan uji pendahuluan terlebih dahulu tentang dosis penggunaan yang optimal dan aman dan tidak menyebabkan kematian pada tikus. Dosis oral yang digunakan dalam pengobatan pada manusia yang biasa digunakan adalah 7,5–15 mg /kgbb/minggu (Dehestani et al, 2015) atau 15-17,5 mg/kgbb/ minggu (Cronstein, 2005), dengan mengambil dosis terendahnya yaitu 7,5 mg dan dikonversi ke tikus didapat dosis MTX 0,2 mg/kgbb/hari. Dari penelitian Wang et al., (2012), didapat dosis yang digunakan untuk tikus adalah 0,1-0,5 mg/kgbb/hari. Digunakan tiga tingkatan dosis, yaitu dosis 0,2 mg/200 g bb, 0,1 mg/200 g bb dan 0,05 mg/ 200 g bb. Penurunan volume edema rata-rata kaki dengan pemberian MTX tiap kelompok pada hari ke-29, ke-36, ke-43, dan ke-50 dapat dilihat pada Tabel 4.2 berikut ini.

Tabel 4.2 Penurunan volume edema rata-rata kaki dengan pemberian MTX tiap kelompok pada hari ke-29, ke-36, ke-43, dan ke-50

Dosis MTX	Volume edema rata-rata telapak kaki \pm Sd			
	Hr ke-29	Hr ke-36	Hr ke-43	Hr ke-50
0,2 mg/200 g bb	1,63 \pm 0,61	0,90 \pm 0,18	--	--
0,1 mg/200 g bb	1,57 \pm 0,21	1,07 \pm 0,31	0,70 \pm 0,00	--
0,05 mg/200 g bb	1,50 \pm 0,17	1,17 \pm 0,31	0,87 \pm 0,29	0,77 \pm 0,29

Keterangan : (--) Tikus mengalami kematian

Dari hasil uji pendahuluan didapatkan penggunaan dosis 0,2 mg/200 g bb pada tikus menyebabkan kematian pada 100 % tikus di minggu kedua perlakuan dan pada dosis 0,1 mg/200 g bb menyebabkan kematian pada 100% tikus di minggu ketiga perlakuan, sehingga kedua dosis ini tidak digunakan. Sedangkan dosis 0,05 mg/200 g bb sudah dapat menyebabkan penurunan edema kaki tikus tanpa menyebabkan kematian, sehingga pada penelitian ini digunakan dosis MTX yaitu dosis 0,05 mg/200 g bb .

4.3 Penyiapan bahan uji

Tanaman babandotan yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITTRO) dan dilakukan determinasi di Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Daun babandotan sebagai bahan uji yang digunakan harus terstandarisasi. Standarisasi diperlukan karena sangat mempengaruhi kualitas dari obat herbal dan juga sangat mempengaruhi efek terapi yang dihasilkan. Setelah tanaman babandotan dipanen, diambil daunnya, dicuci dengan air mengalir, ditiriskan dan dikeringkan, sehingga didapat bahan uji berupa simplisia daun babandotan kering.

Simplisia daun babandotan kering digrinding dengan menggunakan ukuran mesh 40 dan selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Pertimbangan dilakukan ekstraksi dengan cara maserasi atau cara dingin yaitu agar metabolit sekunder yang diduga paling berperan dalam anti inflamasi, yaitu flavonoid tidak rusak dan tidak menguap. Hasil maserasi berupa maserat dipekatkan dengan menggunakan *rotary vaccum evaporator* dan hasilnya dikentalkan dengan *waterbath* dengan suhu 40-50⁰C dan

dilanjutkan oven vakum hingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak yang didapat lalu ditimbang dan dimasukkan ke dalam botol kaca gelap bertutup (Margaretha, 2012; Ansel, 2008; Depkes RI, 2011).

Digunakan pelarut etanol 70 % karena senyawa aktif yang terdapat pada daun babandotan dan diduga paling berperan penting dalam mekanisme penghambatan inflamasi yaitu flavonoid bersifat cenderung polar, sehingga dapat tertarik oleh pelarut polar (Awad et al., 2013; Moura et al., 2005).

4.4. Penetapan Randemen

Dalam penelitian ini dilakukan penetapan randemen sebagai parameter standar umum. Randemen didapatkan dengan menghitung jumlah ekstrak yang didapat dibandingkan dengan simplisia yang digunakan. Simplisia yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 1,5 kilogram dan didapatkan ekstrak daun babandotan sebanyak 243 gram, sehingga randemen ekstrak etanol 70% yang didapatkan adalah 16,2 %.

$$\text{Penetapan randemen} = \left(\frac{\text{Jumlah ekstrak yang didapat (g)}}{\text{Simplisia (serbuk kering) (g)}} \right) \times 100 \% \quad (4.1)$$

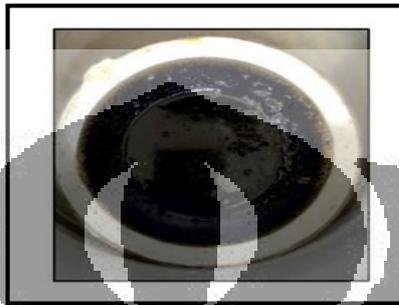
Hasil randemen yang didapatkan digunakan untuk menghitung dosis hewan uji dalam uji artritis. Hasil konversi dari simplisia kering daun babandotan ke dosis ekstrak daun babandotan, yaitu dosis I adalah 40 mg, dosis II adalah 80 mg dan dosis III adalah 160 mg/200 g bb tikus. Dan setelah dikalikan randemen maka tingkatan dosis ekstrak babandotan yang digunakan dalam penelitian ini berturut turut dosis I adalah 6,48 mg, dosis II adalah 12,96 mg dan dosis III adalah 25,92 mg/ 200 g bb tikus (Lampiran 10). Hasil randemen tiap metode ekstraksi tanaman berbeda-beda tergantung pada keefektifan proses ekstraksi. Efektivitas proses ekstraksi dipengaruhi oleh pelarut yang digunakan, ukuran partikel simplisia, metode dan lama ekstraksi.

4.5 Karakterisasi ekstrak etanol daun babandotan

Dalam upaya standarisasi ekstrak, maka dilakukan karakterisasi ekstrak daun babandotan yang meliputi pemeriksaan organoleptik, parameter non spesifik dan parameter spesifik ekstrak etanol daun babandotan.

4.5.1 Hasil pemeriksaan organoleptik ekstrak

Ekstrak etanol yang diperoleh dari hasil ekstraksi kemudian ditentukan organoleptiknya dengan pancaindera untuk mendeskripsikan bentuk warna, bau dan rasa. Hasil ekstrak daun babandotan yang didapatkan berupa ekstrak yang kental, berwarna hijau kehitaman, berbau khas babandotan, berasa sepat dan sedikit pahit. Ekstrak etanol daun babandotan dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Ekstrak etanol daun babandotan

Hasil residu sisa etanol dengan menggunakan Kromatografi gas didapatkan 0 % (positif 0,001%), hal ini menandakan bahwa sisa pelarut sudah dianggap tidak ada lagi dalam ekstrak dan berarti metode ekstraksi yang dilakukan sudah cukup berhasil (Lampiran 17). Berdasarkan parameter ekstrak, kadar hasil residu sisa pelarut juga harus rendah (tidak lebih dari 1,0%) (Depkes RI, 2000; BPOM, 2006).

4.5.2 Hasil parameter non spesifik

Berdasarkan parameter non spesifik maka dilakukan beberapa pengujian kadar ekstrak, seperti kadar air, kadar abu dan kadar abu tidak larut asam. Hal ini dilakukan agar kualitas ekstrak yang dihasilkan terjamin baik sehingga efek terapi sesuai dengan yang diharapkan dari bahan uji. Dari Tabel 4.3 dibawah ini terlihat penetapan kadar air ekstrak etanol 70 % daun babandotan.

Tabel 4.3 Penetapan kadar air ekstrak etanol 70 % daun babandotan

No	Berat ekstrak (g)	Kadar air (mL)	Persentase (% v/b)
1	5	0,5	10
2	5	0,4	8
		Rata-rata	9

Berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia (2011), standar kadar air ekstrak daun babandotan tidak lebih dari 10 %, sedangkan dari penelitian ini didapatkan hasil kadar airnya adalah 9 % (Tabel 4.2). Penentuan kadar air berguna untuk mengetahui ketahanan suatu bahan agar dapat diperkirakan cara penyimpanan terbaik bagi sampel untuk menghindari pengaruh aktivitas pertumbuhan mikroba/jamur. Kandungan air pada penelitian ini memenuhi standar FHI sehingga menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun babandotan dapat disimpan dalam waktu yang relatif cukup lama.

$$\text{Penetapan kadar air} = \left(\frac{\text{Kadar air (mL)}}{\text{Berat ekstrak (g)}} \right) \times 100 \% \quad (4.2)$$

Selanjutnya dilakukan pengujian kadar abu dari ekstrak etanol 70 % daun babandotan. Tabel 4.4 berikut ini memperlihatkan penetapan kadar abu ekstrak etanol 70 % daun babandotan.

Tabel 4.4 Penetapan kadar abu ekstrak etanol 70 % daun babandotan

No	Berat (g)		Sisa residu	Persentase (% b/b)
	Ekstrak	Crus		
1	2,0077	18,9901	0,0197	0,98
2	2,0084	23,4509	0,0193	0,96
3	2,0450	20,2126	0,0196	0,96
			Rata-rata	0,97

Berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia (2011), kadar abu ekstrak daun babandotan tidak lebih dari 1,20 %, sedangkan dari penelitian ini didapatkan hasil kadar abunya adalah 0,97 % atau tidak lebih dari 1,20 %. Hal ini menunjukkan bahwa kadar abu ekstrak daun babandotan yang telah dibuat dan digunakan dalam penelitian ini memenuhi standar pembuatan ekstrak berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia (Depkes RI, 2011). Penetapan kadar abu dari suatu ekstrak penting untuk ditetapkan nilainya, karena hal ini menandakan apakah ada pencemaran dari ekstrak yang dibuat, seperti logam berat dan pencemaran lainnya. Apabila kadar abunya tinggi artinya kemungkinan ada logam berat yang mencemari ekstrak yang mungkin berasal dari tempat tumbuh dari bahan simplisia, hal ini tentunya dapat mempengaruhi efektivitas kerja dari ekstrak.

$$\text{Penetapan kadar abu} = \left(\frac{\text{Sisa residu (g)}}{\text{Berat ekstrak (g)}} \right) \times 100 \% \quad (4.3)$$

Dilakukan pula pengujian kadar abu tidak larut asam dari ekstrak etanol 70 % daun babandotan. Tabel 4.5 berikut ini memperlihatkan penetapan kadar abu tidak larut asam ekstrak etanol 70 % daun babandotan.

Tabel 4.5 Penetapan kadar abu tidak larut asam ekstrak etanol 70 % daun babandotan

No	Berat (g)		Sisa residu	Persentase (% b/b)
	Ekstrak	Crus		
1	2,1420	23,4661	0,0009	0,04
2	2,0104	20,2372	0,0008	0,04
3	2,1838	19,0023	0,0006	0,03
			Rata-rata	0,04

Berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia (2011), kadar abu tidak larut asam ekstrak daun babandotan tidak lebih dari 0,06 %, sedangkan dari penelitian ini didapatkan hasil kadar abu tidak larut asamnya adalah 0,04 % atau tidak lebih dari 0,06 %. Hal ini menandakan bahwa hasil ekstrak daun babandotan ini memenuhi standarisasi dan aman untuk digunakan.

$$\text{Penetapan kadar abu larut asam} = \left(\frac{\text{Sisa residu (g)}}{\text{Berat ekstrak (g)}} \right) \times 100 \% \quad (4.4)$$

4.5.3 Hasil parameter spesifik

4.5.3.1 Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol daun babandotan

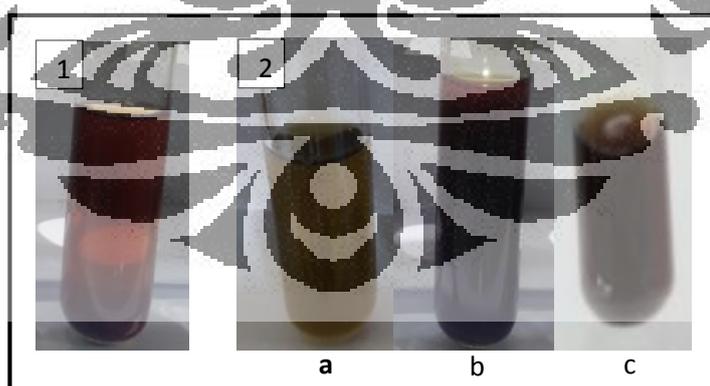
Skrining fitokimia dilakukan pada ekstrak etanol daun babandotan, hal ini dimaksudkan untuk mengetahui senyawa yang terkandung didalamnya. Uji yang dilakukan berupa uji senyawa flavonoid, tanin, alkaloid, terpen-sterol dan saponin. Dari beberapa penelitian sebelumnya didapatkan bahwa metabolit kimia dalam jumlah cukup banyak yang terkandung pada tanaman babandotan adalah flavonoid (Moura et al., 2005; Hassan et al., 2012; Awad et al., 2013). Dari penelitian ini didapatkan bahwa skrining fitokimia ekstrak etanol 70 % daun babandotan mengandung flavonoid, tanin, alkaloid, saponin, terpen-sterol (Tabel 4.6).

Tabel 4.6 Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol 70 % daun babandotan

Senyawa Uji	Hasil Pengamatan	Kesimpulan
Flavonoid	Terbentuk warna kemerahan dengan penambahan Mg dan Zn	+
Tanin	Terbentuk endapan putih+warna keruh dengan pemberian gelatin & gelatin+NaCl dan warna hitam kehijauan dengan AlCl ₃	+
Alkaloid	Terbentuk endapan putih dengan pereaksi <i>Mayer</i> Terbentuk endapan coklat kehitaman dengan pereaksi <i>Bouchardat</i> Terbentuk endapan jingga kecoklatan dengan pereaksi <i>Dragendorff</i>	+
Terpen-Sterol	Terbentuk warna hijau kebiruan	+
Saponin	Terbentuk buih setinggi 2 cm	+

a. Uji flavonoid

Skrining fitokimia metabolit sekunder flavonoid dari ekstrak daun babandotan dibandingkan dengan standar flavonoid. Hasil yang didapatkan bahwa ekstrak daun babandotan dengan penambahan serbuk Mg dan HCl terlihat warna kemerahan, hal ini menandakan ekstrak daun babandotan mengandung flavonoid. Dengan dengan penambahan serbuk Zn dan HCl juga terlihat warna kemerahan yang menandakan bahwa ekstrak daun babandotan mengandung flavonoid. Hasil skrining fitokimia uji flavonoid dapat dilihat pada Gambar 4.4 dibawah ini.



Keterangan : Uji flavonoid; (1) Larutan pembanding (standar kuersetin); (2-a) Larutan ekstrak babandotan; (2-b) Larutan ekstrak babandotan + Mg + HCl; (2-c) Larutan ekstrak babandotan + Zn + HCl

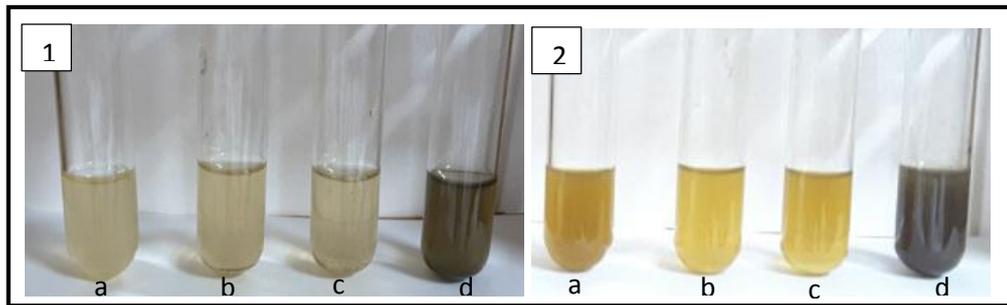
Gambar 4.4 Hasil skrining fitokimia uji flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang menghambat banyak reaksi oksidasi baik secara enzimatis maupun secara non enzimatis. Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai glikosida dan aglikon flavonoid (Elya et al., 2015). Daun babandotan mengandung flavonoid yang berperan penting dalam penelitian anti artritis rematoid.

Dalam Hassan et al., (2012), disebutkan bahwa ekstrak etanol daun babandotan yang mengandung kadar total flavonoid sebesar 281,88 mg/g, setara dengan kuersetin mempunyai efek anti-inflamasi. Sedangkan pada pemeriksaan kadar total flavonoid ekstrak etanol daun babandotan ini didapatkan sebanyak 2,31 % (Lampiran 18). Flavonoid berperan dalam menekan mekanisme inflamasi yang merupakan dasar perjalanan penyakit pada AR, terutama melalui penghambatan faktor transkripsi seperti NF-kB, penghambatan produksi dan aktivasi sitokin pro-inflamasi dan penghambatan metabolisme asam arakidonat melalui COX-2 (Bellik et al., 2013; Hasan et al., 2012; Awad et al., 2013).

b. Uji tanin

Skrining fitokimia metabolit sekunder tanin dari ekstrak daun babandotan dibandingkan dengan ekstrak daun jambu. Dari ekstrak kental yang diencerkan dengan air suling, dengan penambahan larutan gelatin 10 % didapatkan hasil tampak keruh dan terbentuk adanya endapan putih. Dengan penambahan NaCl + gelatin, juga hasilnya tampak keruh dan terbentuk endapan putih pada ekstrak daun babandotan. Kedua hal ini menunjukkan bahwa dalam ekstrak daun babandotan terdapat tanin. Pada penambahan larutan FeCl_3 3% juga didapatkan perubahan warna, yaitu dari warna kecoklatan menjadi warna hitam kehijauan seperti pada larutan pembanding ekstrak daun jambu, yang artinya terdeteksi tanin dengan penambahan FeCl_3 3%. Hasil ini menandakan bahwa dalam ekstrak daun babandotan terdapat tanin yang dapat terdeteksi dengan pemberian larutan gelatin, NaCl + gelatin dan FeCl_3 %. Hasil skrining fitokimia uji tanin dapat dilihat pada Gambar 4.5 dibawah ini.



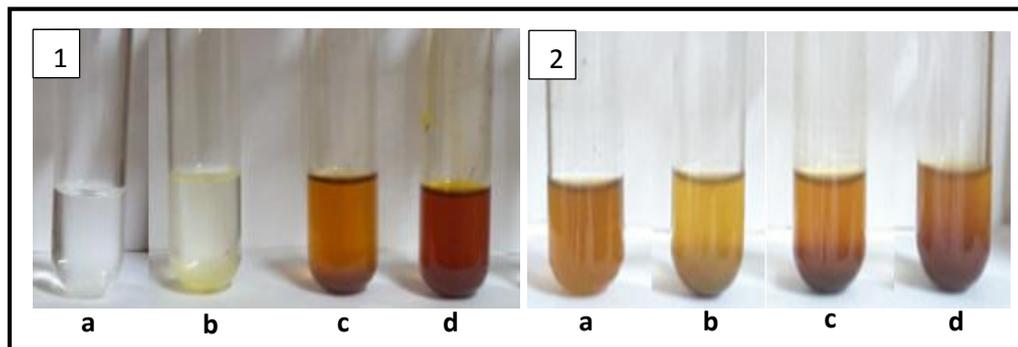
Keterangan : Uji Tanin; (1-a) Larutan pembanding (ekstrak daun jambu), (1-b) Larutan pembanding + Gelatin; (1-c) Larutan pembanding + NaCl + Gelatin; (1-d) Larutan pembanding + FeCl₃; (2-a) Larutan ekstrak babandotan; (2-b) Larutan ekstrak babandotan + Gelatin; (2-c) Larutan ekstrak babandotan + NaCl + Gelatin; (2-d) Larutan ekstrak babandotan + FeCl₃

Gambar 4.5 Hasil skrining fitokimia uji tanin

Tanin merupakan senyawa yang memiliki gugus fenol, rasa sepat dan kemampuan menyamak kulit. Tanin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer yang mantap yang tidak larut air. Dalam Hassan et al., (2012), disebutkan bahwa ekstrak etanol daun babandotan mengandung kadar total tanin sebesar 86,47 mg/g yang setara dengan asam galat. Daun babandotan yang mengandung tanin diduga juga dapat berperan pada mekanisme anti-inflamasi (Hassan et al., 2012).

c. Uji alkaloid

Skrining fitokimia metabolit sekunder alkaloid dari ekstrak daun babandotan dilakukan dengan memberikan pereaksi *Bouchardat*, *Meyer* dan *Dragendorff* pada ekstrak dan dibandingkan dengan larutan pembanding yaitu larutan standar piperin. Awalnya ekstrak kental daun babandotan yang ditambahkan HCl dan air (1:9) dipanaskan dan filtratnya dibagi 3 untuk ditempatkan pada tabung reaksi. Dengan pemberian pereaksi *Meyer* terbentuk endapan menggumpal putih kekuningan yang menandakan alkaloid positif. Dengan pemberian pereaksi *Bouchardat* terbentuk endapan coklat/hitam yang menandakan alkaloid positif. Dan dengan pemberian pereaksi *Dragendorff* terbentuk endapan jingga kecoklatan yang menandakan alkaloid positif. Dari ketiga pereaksi tersebut didapatkan hasil bahwa terdapat alkaloid pada ekstrak daun babandotan dan pada ekstrak piperin. Hasil skrining fitokimia alkaloid daun bandotan dapat dilihat pada Gambar 4.6.



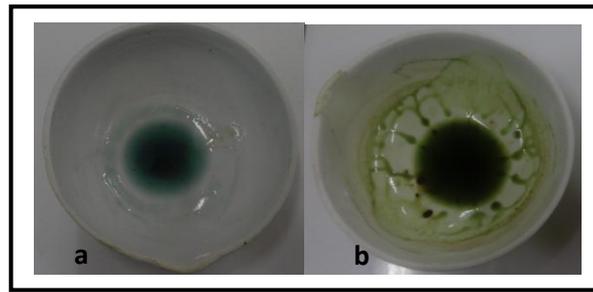
Keterangan : Uji Alkaloid; (1-a) Larutan pembanding (standar piperin), (1-b) Larutan pembanding + Pereaksi *Meyer*; (1-c) Larutan pembanding + Pereaksi *Bouchardat*; (1-d) Larutan pembanding + Pereaksi *Dragendorff*; (2-a) Ekstrak daun babandotan; (2-b) Ekstrak daun babandotan + Pereaksi *Meyer*; (2-c) Ekstrak daun babandotan + Pereaksi *Bouchardat*; (2-d) Ekstrak daun babandotan + Pereaksi *Dragendorff*

Gambar 4.6 Hasil skrining fitokimia uji alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa metabolit yang bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen yang berbentuk siklik. Pada isolasi tanaman babandotan, alkaloid *pyrrolizidin* ditemukan dalam bentuk licopsamin, dihidrolicopsamin dan asetil-licopsamin (Bosi et al., 2013), echinatine dan sesamin (Singh, et al., 2013). Bentuk alkaloid *pyrrolizidin* dari tanaman babandotan dapat bersifat toksik bagi tanaman lain sehingga dapat digunakan sebagai herbisida sedangkan pada hewan ternak dan manusia diduga dalam jumlah yang besar dapat menyebabkan gangguan seperti kerusakan hati dan tumor (Bosi et al., 2013).

d. Uji Terpen-Sterol

Skrining fitokimia metabolit sekunder terpen-sterol dari ekstrak daun babandotan dilakukan dengan memberikan pereaksi *Lieberman-Bouchard* (campuran asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (2:1). Pemberian pereaksi *Lieberman-Bouchard* pada larutan pembanding yaitu larutan standar β -sitosterol memberikan hasil kebiruan yang artinya sterol positif. Sedangkan pemberian pereaksi tersebut pada ekstrak daun babandotan memperlihatkan perubahan warna, dimana awalnya terbentuk warna biru dan akhirnya menjadi warna biru kehijauan yang berarti sterol positif. Hasil skrining fitokimia terpen-sterol daun bandotan dapat dilihat pada Gambar 4.7.



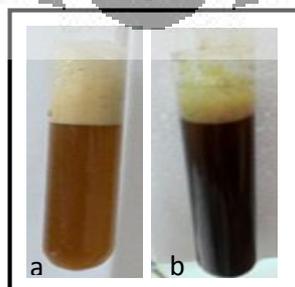
Keterangan : Uji Terpen-Sterol; (a) Larutan pembanding (standar β -sitosterol) + *Liebermann-Bouchard*; b) Ekstrak daun babandotan+ *Liebermann-Bouchard*

Gambar 4.7 Hasil skrining fitokimia uji terpen-sterol

Terpen adalah suatu senyawa yang tersusun atas isopren dan kerangka karbonnya dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan isopren. Terpen terdiri atas beberapa macam senyawa seperti monoterpen dan seskuioterpen yang mudah menguap, diterpen yang sukar menguap dan yang tidak menguap berupa triterpen dan sterol (Elya et al., 2015). Dari penelitian Kamboj & Sauja (2011), didapatkan hasil bahwa pada ekstrak petroleum eter tanaman babandotan mengandung senyawa sterol berupa β -sitosterol dan stigmasterol.

e. Uji saponin

Skrining fitokimia metabolit sekunder saponin dari ekstrak daun babandotan dibandingkan dengan larutan pembanding yaitu ekstrak pare, dilakukan dengan menambahkan air panas pada ekstrak kental lalu dikocok kuat selama 5 detik dan ditunggu sampai terbentuk buih yang mantap. Hasil dari skrining fitokimia ini didapatkan buih yang mantap setinggi 2 cm dan dengan penambahan HCl, buih tidak menghilang, yang artinya hasilnya daun babandotan positif mengandung saponin. Hasil skrining fitokimia saponin terlihat pada Gambar 4.8.



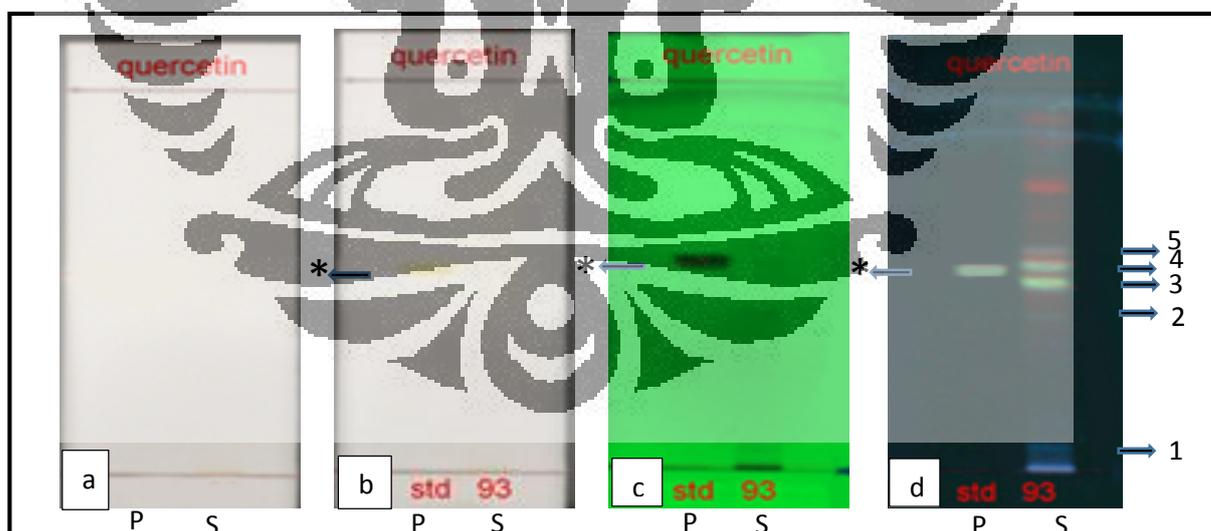
Keterangan : Uji Saponin; (a) Larutan pembanding (ekstrak pare) + air panas + HCl; (b) Ekstrak daun babandotan + air panas + HCl

Gambar 4.8 Hasil skrining fitokimia uji Saponin

Saponin merupakan glikosida triterpen yang sifatnya menyerupai sabun, yang merupakan senyawa aktif permukaan dan dapat menimbulkan busa apabila dikocok dengan air karena dapat menurunkan tegangan permukaan dan dapat menyebabkan hemolisis pada sel darah merah pada konsentrasi rendah (Elya et al., 2015).

4.5.3.2 Hasil karakterisasi dengan KLT (Kromatografi lapis tipis)

Pada penelitian ini dilakukan karakterisasi ekstrak etanol daun babandotan menggunakan KLT dengan fase diam berupa lempeng silika F₂₅₄. Setelah dilakukan optimasi eluen, hasil terbaik gambaran bercak pada KLT didapatkan dengan menggunakan fase gerak/eluen berupa toluen : etil asetat : asam format dengan perbandingan 58:33:9 dan sebagai pembanding adalah kuersetin dengan volume penotolan masing-masing 10 μ L. Pemilihan pelarut dilakukan dengan mempertimbangkan derajat kepolaran. Digunakan kuersetin sebagai pembanding untuk melihat keberadaan metabolit sekunder flavonoid yang didapatkan pada skrining fitokimia. Hasil kromatogram ekstrak daun babandotan dengan KLT dapat dilihat pada Gambar 4.9 dibawah ini.



Keterangan : (a) Sinar biasa/putih ; (b) Sinar biasa/putih setelah diberi AlCl₃; (c) Cahaya 254 nm; (d) Cahaya 366 nm; P = Pembanding kuersetin; S = Ekstrak daun babandotan; Tanda (*) Rf = pembanding kuersetin 0,52; (3) Rf 3= 0,49; (4) Rf 4= 0,53

Gambar 4.9. Hasil kromatogram ekstrak daun babandotan

Dari hasil KLT dengan menggunakan alat linomat 5 (Camag) didapatkan bercak yang terlihat pada lempeng silika sudah terpisah dengan cukup baik dan tidak terdapat tail (ekor). Nilai Rf diperoleh dengan mengukur jarak rambat senyawa dari titik awal hingga pusat bercak dibagi dengan jarak rambat fase gerak hingga garis depan (Hanani, 2016). Didapatkan lokasi Rf yang hampir sama antara bercak ekstrak daun babadotan dengan bercak pembanding kuersetin. Dari Gambar 4.9 diatas didapatkan Rf pada standar kuersetin adalah 0,52. Pada sampel terlihat dua pita yang berpendar terang berwarna kuning seperti standar, yaitu pada Rf (0,53) pada no. 3 dan Rf (0,49) pada no.4, dari kedua pita ini diambil Rf no.4 yang mendekati standar kuersetin yaitu 0,53. Hasil KLT ini menandakan bahwa flavonoid yang merupakan senyawa diduga berperan penting dalam proses inflamasi khususnya anti-arthritis rematoid dapat terdeteksi dengan baik menggunakan KLT. Flavonoid merupakan senyawa yang mengandung sistem aromatik yang kuat sehingga dapat menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum UV dan spektrum tampak (Elya et al., 2015).

Flavonoid merupakan metabolit sekunder yang mempunyai sifat anti inflamasi, dan mempunyai anti-arthritis rematoid (Hasan et al., 2012). Flavonoid dapat menghambat TNF- α dengan cara penghambatan regulasi ICAM-1 yang diperlukan saat migrasi leukosit dan aktivasi sel T pada proses inflamasi (Chen et al., 2004). Flavonoid berupa kuersetin juga dapat menghambat produksi dan ekspresi sitokin pro-inflamasi TNF- α pada sel mononuklear darah tepi manusia (PBMC) melalui modulasi sistem NF-kB (Nair et al., 2006). NF-kB merupakan faktor penting dalam meregulasi transkripsi gen dan berperan dalam regulasi ekspresi gen pada sitokin inflamasi secara luas. Transkripsi dan ekspresi sitokin pro-inflamasi TNF- α dan IL-1 juga diregulasi oleh NF-kB sehingga dengan kemampuan kuersetin menghambat NF-kB maka produksi dan ekspresi sitokin TNF- α dan IL-1 juga akan berkurang (Ji et al., 2013; Ansari et al., 2014).

4.6 Hasil uji anti-arthritis rematoid pada parameter volume edema kaki tikus

Kelompok yang diuji pada penelitian ini berjumlah 6 kelompok, terdiri dari kelompok kontrol normal, kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan ekstrak daun bandotan dosis I, dosis II dan dosis III. Pada hari pertama semua telapak kaki

tikus bagian kiri disuntikkan dengan CFA (*Complete freund's adjuvant*) dosis 1 mg/ml sebanyak 0,1 ml secara subkutan, kecuali tikus kontrol. Tikus kelompok kontrol disuntikkan dengan normal salin, yaitu natrium klorida 0,9 % sebanyak 0,1 ml. Setelah tikus diinduksi selanjutnya diberikan perlakuan pemberian ekstrak selama 21 hari, yaitu dari hari ke-29 sampai hari ke-49.

Pada penelitian ini dilakukan penyuntikan CFA sebagai adjuvant yang berisi *Mycobacterium tuberculosis* pada telapak kaki kiri tikus dan tidak dilakukan *booster* penyuntikan CFA untuk menghindari terjadinya efek sistemik artritis (ARAC, 2013). Dari hasil uji pendahuluan, CFA cukup efektif untuk menyebabkan inflamasi hewan uji, hal ini dapat dilihat terutama pada tempat penyuntikan dimana terjadi proses inflamasi berupa edema telapak kaki yang berasal dari masuknya leukosit ke dalam jaringan dan interaksinya dengan antigen. Pemeriksaan edema telapak kaki merupakan pemeriksaan awal yang mudah, sederhana, sensitif dan cepat untuk mengevaluasi derajat inflamasi dan perkembangan efek terapi obat. Dilakukan pengamatan pada telapak kaki tikus tiap kelompok. Gambar 4.10 dibawah ini memperlihatkan gambaran telapak kaki tikus pada hari ke-29.



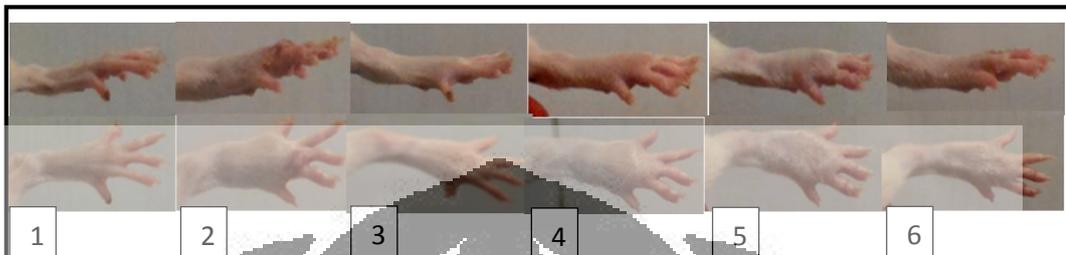
Keterangan : (1) Kontrol normal; (2) kontrol negatif; (3) kontrol positif; (4) dosis I; (5) dosis II; (6) dosis III

Gambar 4.10 Gambaran telapak kaki tikus dilihat dari sisi mendatar kaki dan permukaan telapak kaki pada hari ke-29

Pada Gambar 4.10 dapat dilihat gejala artritis berupa bengkak dan warna telapak kaki kiri tikus yang berwarna kemerahan pada hari ke-29. Dari gambar tersebut dapat dilihat kelompok normal menunjukkan penampakan edema terkecil dibandingkan kelompok yang lain, karena tidak mendapat induksi CFA. Dan terlihat penampakan edema untuk kelompok hewan uji baik kelompok dosis

maupun kontrol negatif dan positif namun tidak dapat dibedakan dengan baik jika diamati secara langsung.

Selanjutnya dilakukan pula pengamatan telapak kaki tikus pada hari ke 50. Gambar 4.11 dibawah menunjukkan gambaran telapak kaki tikus pada hari ke-50.



Keterangan : (1) Kontrol normal; (2) kontrol negatif; (3) kontrol positif; (4) dosis I; (5) dosis II; (6) dosis III

Gambar 4.11. Gambaran telapak kaki tikus dilihat dari sisi mendatar kaki dan permukaan telapak kaki pada hari ke-50

Terlihat dari Gambar 4.11 diatas terlihat pada hari ke-50, setelah pemberian perlakuan, kelompok kontrol normal memperlihatkan gambaran edema terkecil dibandingkan kelompok lain, sedangkan telapak kaki kelompok kontrol negatif menunjukkan gambaran edema yang paling besar, disertai adanya luka dan kesan perubahan bentuk jari. Diantara kelompok perlakuan, pemberian obat metotrexat pada kelompok positif memperlihatkan gambaran edema terkecil dibandingkan dengan kelompok dosis. Dan pemberian dosis I, II memperlihatkan gambaran edema yang hampir sama sehingga tidak dapat dibedakan dengan baik jika diamati secara langsung, sedangkan dosis III gambaran edema terlihat lebih kecil dari dosis I dan II.

Dari data gambaran edema diatas maka dapat diambil kesimpulan bahwa kelompok kontrol negatif pada hari ke-50 sudah menunjukkan adanya luka dan perubahan bentuk jari secara minimal. Hal ini dikarenakan karena kelompok kontrol negatif tidak diberi pengobatan, sehingga inflamasi terus berjalan dan mulai merusak jaringan disekitar daerah kaki tikus. Sedangkan pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan tidak terdapat perubahan bentuk jari dan terdapat penurunan edema kaki. Hal ini disebabkan karena dengan pemberian obat dan suspensi ekstrak daun babandotan, terjadi mekanisme anti-inflamasi di dalam tubuh dengan menghambat gejala inflamasi. Untuk mengetahui perbedaan

besarnya volume edema/pembengkakan kaki yang terjadi maka dilakukan pengukuran volume telapak kaki tikus.

Dilakukan pengukuran volume telapak kaki tikus pada hari ke-1 sebelum disuntikkan CFA, selanjutnya dilakukan pengamatan dan pengukuran volume edema (setelah disuntik CFA) setiap minggunya untuk mengamati perubahan edema kaki akibat inflamasi. Pengukuran volume telapak kaki tikus tersebut dilakukan dengan menggunakan pletismometer dengan cara mengukur volume air raksa yang tergantikan (Woode et al., 2008). Volume telapak kaki tikus rata-rata masing-masing kelompok pada hari ke-1, 29, 36, 43 dan 50 dapat dilihat pada Tabel 4.7 dibawah ini.

Tabel 4.7 Volume telapak kaki tikus rata-rata pada hari ke 1, 29, 36, 43 dan 50 setelah diinduksi CFA pada semua kelompok perlakuan kecuali kelompok kontrol normal.

Volume telapak kaki rata-rata (ml) ± Standar Deviasi					
	Hr-1	Hr-29	Hr-36	Hr-43	Hr-50
N	1.98±0.20	2.08±0.16	2.10±0.23	2.10±0.20	2.08±0.22
KN	2.00±0.19	3.94±0.32	3.90±0.29	3.90±0.29	3.88±0.31
KP	1.92±0.30	3.68±0.59	3.42±0.56	2.96±0.38	2.80±0.35
Dosis I	2.14±0.18	3.88±0.08	3.78±0.13	3.52±0.24	3.38±0.29
Dosis II	2.04±0.11	3.84±0.17	3.68±0.20	3.42±0.29	3.26±0.27
Dosis III	2.16±0.17	3.84±0.21	3.66±0.15	3.50±0.10	3.26±0.11

Keterangan : *) = sebelum induksi; N=kontrol normal (CMC 0,5 %); KN=kontrol negatif (CMC 0,5 %); KP=kontrol positif (metotreksat 0,05 mg/200 g-BB); Dosis I = bahan uji ekstrak daun babandotan 40 mg/200 g BB; Dosis II = bahan uji ekstrak daun babandotan 80 mg/200 g BB; Dosis III = bahan uji ekstrak daun babandotan 160 mg/200 g BB.

Selanjutnya dibuat perhitungan data volume rata-rata edema kaki tikus tiap kelompok perlakuan. Pengukuran volume edema kaki tikus didapatkan dari pengurangan volume telapak kaki pada hari-x dikurangi dengan volume telapak kaki hari ke-1 (Lampiran 19). Hasil volume edema kaki tikus setelah diberi perlakuan dibuat rata-ratanya tiap kelompok, terlihat pada Tabel 4.8 dibawah ini.

Tabel 4.8 Volume edema rata-rata kaki tikus dan persentase penghambatan edema rata-rata pada hari ke 1, 29, 36, 43, dan 50 setelah diinduksi CFA pada semua kelompok perlakuan kecuali kelompok kontrol normal.

	Volume edema rata-rata kaki tikus (ml) ± Standar Deviasi (Persentase penghambatan edema rata-rata)				
	Hr-1	Hr-29	Hr-36	Hr-43	Hr-50
Kontrol Normal	0,00 ±0,00	0,10 ±0,07	0,12 ±0,04	0,12 ±0,08	0,10 ±0,10
Kontrol Negatif	0,00 ±0,00	1,94 ±0,24	1,90 ±0,22	1,90 ±0,25	1,88 ±0,29
Kontrol Positif	0,00 ±0,00	1,76 ±0,42 (9,28%)	1,50 ±0,38 (21,05%)	1,04 ±0,47[#] (45,26%)	0,88 ±0,53[#] (53,19%)
Dosis I (40 mg)	0,00 ±0,00	1,74 ±0,15 (10,31%)	1,64 ±0,13 (13,68%)	1,38 ±0,18[#] (27,37%)	1,24 ±0,31[#] (34,04%)
Dosis II (80 mg)	0,00 ±0,00	1,80 ±0,19 (7,22%)	1,64 ±0,19 (13,68%)	1,38 ±0,27[#] (27,37%)	1,22 ±0,27[#] (35,10%)
Dosis III (160 mg)	0,00 ±0,00	1,68 ±0,28 (13,40%)	1,50 ±0,16 (21,05%)	1,34 ±0,13[#] (29,47%)	1,10 ±0,12[#] (41,49%)

Keterangan : Kontrol normal = CMC 0,5 %; Kontrol negatif = CMC 0,5 %; Kontrol positif = Metotreksat 0,05 mg/200 g bb; Dosis I = bahan uji ekstrak daun babandotan 40 mg/200 g bb; Dosis II = bahan uji ekstrak daun babandotan 80 mg/200 g bb; Dosis III = bahan uji ekstrak daun babandotan 160 mg/200 g bb; (#) Berbeda bermakna dengan kelompok kontrol negatif (p<0,05)

Berdasarkan Tabel 4.8 diatas, didapatkan data bahwa dengan penyuntikan 0,1 ml CFA pada hari ke-1 dapat menyebabkan peningkatan volume edema rata-rata kaki tikus sampai hari ke-28 sedangkan pada hari ke-29 setelah perlakuan kontrol positif (metotreksat) dan pemberian suspensi ekstrak daun babandotan terjadi penurunan volume edema rata-rata kaki tikus yang cukup berarti pada hari ke-50. Kelompok dosis III dapat menurunkan volume edema rata-rata kaki tikus lebih tinggi daripada kelompok dosis II lalu diikuti dosis I, dan kelompok kontrol positif menurunkan volume edema rata-rata paling tinggi daripada kelompok dosis. Pada kelompok normal yang tidak disuntik CFA terlihat tidak terdapat peningkatan volume edema rata-rata kaki tikus secara berarti sampai hari ke-28 dan relatif bertahan sampai akhir perlakuan (hari-50). Pada kelompok negatif terdapat peningkatan volume edema rata-rata kaki tikus dan relatif bertahan sampai akhir perlakuan (hari ke-50).

Penyuntikan CFA pada kaki tikus yang berisi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dapat berfungsi sebagai antigen yang merangsang pembentukan reaksi inflamasi. Pada saat inflamasi terjadi proses pertahanan tubuh dari sel radang PMN, reaksi dimulai dengan proses perlekatan / adesi sel radang seperti neutrofil pada sel endotel dinding pembuluh darah yang dibantu dengan ICAM selanjutnya terjadi peningkatan permeabilitas pembuluh darah yang memungkinkan sel radang dapat keluar dari intravaskuler menuju ekstraseluler yang dibantu oleh mediator kimia seperti prostaglandin dan histamin. Peningkatan permeabilitas vaskuler ini diikuti oleh keluarnya juga protein plasma dan cairan plasma sehingga terjadi ekstrasvasi cairan di ekstra seluler yang menimbulkan pembengkakan telapak kaki tikus. Selanjutnya terjadi proses kemotaktik dimana sel radang bergerak menuju tempat terjadinya inflamasi dan selanjutnya bersama mediator kimia memanggil sel radang lain untuk menuju ke tempat terjadinya inflamasi, hal ini akan menambah pembengkakan/ edema kaki tikus. Proses inflamasi yang terjadi pada tikus berupa pembengkakan/ edema, memerah/ rubor, rasa sakit/ dolor, dan berkurangnya fungsi kaki tikus, pada penelitian ini yang diamati berupa pembengkakan/edema kaki tikus (Radji, 2015; Bratawijaya & Rengganis, 2012; Rosenbergh, 2013).

Pada hari ke-29, dilakukan pemberian perlakuan pada semua tikus sesuai kelompoknya, dimana kelompok tikus normal dan kontrol negatif diberikan CMC 0,5 %, kelompok positif diberi obat metotreksat dan kelompok uji diberikan ekstrak etanol daun babandotan dalam variasi dosis. Pemeriksaan yang dilakukan pada hari ke-29 belum didapatkan perubahan pada kaki tikus. Pada hari ke-36 dan 43 sudah didapatkan penurunan volume edema kaki tikus pada kelompok kontrol positif dan variasi dosis uji. Hal ini disebabkan obat metotreksat dan kandungan metabolit yang terdapat pada bahan uji sudah mulai bereaksi. Mekanisme metotreksat dalam menurunkan volume edema kaki tikus diduga dari pelepasan adenosin dalam jumlah besar yang dapat menekan proses inflamasi, terutama menghambat proses NF-kB sehingga produksi dan ekspresi berbagai mediator kimia terutama TNF- α dan IL-1 yang sangat berperan dalam proses inflamasi dihambat, sehingga volume edema kaki tikus perlahan menurun (Sinaga, 2012; Tian et al., 2007; Cronstein, 2005; Cutolo at al., 2001). MTX sebagai obat anti-

arthritis rematoid, berperan sebagai *inhibitor dihidrofolat reduktase*, mengurangi kadar folat intraseluler, menghambat produksi sitokin, menghambat biosintesis purin, menghambat mekanisme NF-kB dan meningkatkan apoptosis dari sel T (Tian et al., 2007; Wells et al., 2009; Wang & Chiang, 2012).

Secara umum, persentase penghambatan edema rata-rata tikus bervariasi pada tiap kelompok bila dibandingkan dengan keadaan tidak diberi terapi obat atau ekstrak babandotan (kelompok kontrol negatif) setelah diinduksi di hari ke-1. Cara perhitungan persentase penghambatan edema rata-rata tikus dapat dilihat pada Lampiran 12. Pada kelompok kontrol positif terjadi peningkatan persentase penghambatan edema rata-rata dari hari ke-29 (9,28 %), ke hari 36 (21,05 %), ke hari 43 (45,26 %) dan di akhir perlakuan hari ke-50 (53,19 %). Pada kelompok dosis I terjadi peningkatan persentase penghambatan edema rata-rata dari hari ke-29 (10,31 %), ke hari 36 (13,68 %), ke hari 43 (27,37 %) dan di akhir perlakuan hari ke-50 (34,04 %). Pada kelompok dosis II terjadi peningkatan persentase penghambatan edema rata-rata dari hari ke-29 (7,22 %), ke hari 36 (13,68 %), ke hari 43 (27,35 %) dan di akhir perlakuan hari ke-50 (35,10 %). Sedangkan pada kelompok dosis III terjadi peningkatan persentase penghambatan edema rata-rata dari hari ke-29 (13,40 %), ke hari 36 (21,05 %), ke hari 43 (29,47 %) dan di akhir perlakuan hari ke-50 (41,49 %).

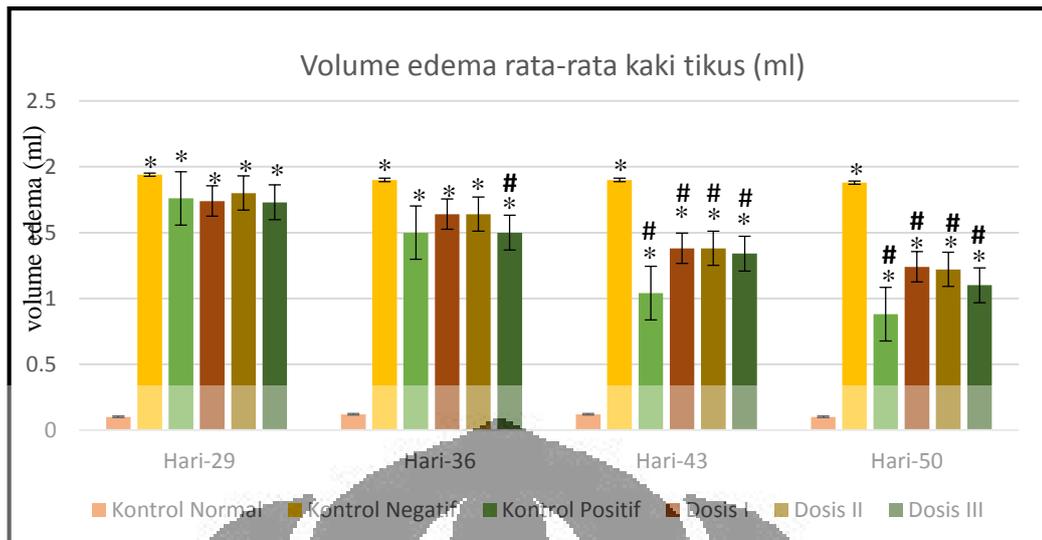
Terlihat pada Tabel 4.8 bahwa persentase penghambatan edema rata-rata tertinggi pada hari ke-29, berturut-turut adalah dosis III lalu dosis I, kontrol positif dan terakhir dosis II. Untuk hari ke-36, persentase penghambatan edema rata-rata tertinggi terjadi pada kelompok kontrol positif dan dosis III, lalu dosis II dan dosis I. Pada hari ke-43, persentase penghambatan edema rata-rata tertinggi terjadi pada kelompok kontrol positif lalu dosis III dan selanjutnya dosis I dan II. Dan pada hari ke-50, persentase penghambatan edema rata-rata tertinggi terjadi pada kelompok kontrol positif lalu dosis III, selanjutnya dosis II dan terakhir dosis I. Semakin tinggi persentase penghambatan edema maka makin rendah volume edema kaki tikus.

Dari data diatas terlihat aktivitas penghambatan edema MTX lebih cepat terjadi daripada ekstrak babandotan, hal ini terlihat dari aktivitas penghambatan edema MTX sudah terjadi pada minggu ke 2 (hari ke-43) perlakuan dan semakin

meningkat di minggu ke 3 (hari ke-50), karena MTX mulai dapat bekerja sejak pemberian terapi awal sekitar 2-3 minggu (Schuna, 2005). Sedangkan perlakuan variasi dosis terutama dosis III mencapai aktivitas maksimal memerlukan waktu lebih lama yaitu baru di minggu ke 3. Efek anti-arthritis rematoid maksimum pada akhir perlakuan dicapai oleh kelompok kontrol positif yang merupakan *first line therapy* dan termasuk obat DMARD yang dipakai untuk pengobatan anti-arthritis rematoid pada manusia saat ini. Penggunaan ekstrak daun babandotan dengan dosis III (160 mg/200 g bb/hari) pada hari ke-50, dapat menghasilkan penghambatan edema rata-rata yang paling tinggi dibandingkan dengan dosis I dan II sebagai anti-arthritis rematoid.

Aktivitas anti-arthritis rematoid daun babandotan yang mengandung metabolit sekunder terutama flavonoid (kuersetin) dapat menghambat proses inflamasi kronik sehingga volume kaki tikus perlahan berkurang. Kuersetin dapat menghambat pengeluaran dan ekspresi mediator pro-inflamasi terutama TNF- α dan IL-1, sehingga sangat berperan dalam mekanisme anti-inflamasi dengan cara menginhibisi kerja NF-kB (Nair et al., 2006; Chen et al., 2004), ditambah flavonoid dapat menginhibisi metabolisme konversi asam arakidonat menjadi prostaglandin sehingga permeabilitas vaskuler menurun (Bellik et al., 2013). Sitokin TNF- α dan IL-1 sebagai mediator radang dan respon imun, dapat menstimulasi ekspresi molekul adesi pada sel endotel, meningkatkan dan mengerahkan lekosit, meningkatkan produksi sitokin lain dan eikosanoik. IL-1 dapat mengaktifkan fibroblas, dan meningkatkan proliferasi dan produksi ekstraselular matrik (Rosenbergh, 2013). Pada penelitian Al-Rekabi et al., (2014), didapatkan kuersetin berperan dalam imunomodulator dengan menurunkan jumlah IL-6 dan ICAM-1 (*Interceluller adhesion molecule-1*) serta dapat meningkatkan IL-10. Penurunan volume edema kaki terjadi sesuai tingkatan dosis, dimana dosis ekstrak daun babandotan yang terbesar dapat menurunkan volume edema kaki tikus paling tinggi.

Berdasarkan analisa statistik volume edema rata-rata kaki tikus, didapatkan bahwa pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dosis I, II dan III terdapat perbedaan bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Grafik volume edema rata-rata kaki terlihat pada Gambar 4.12.



Keterangan: K = Kontrol normal (NS hr ke-1 dan CMC 0,5 % hr ke-29 - 49); KN = kontrol negatif (CFA hr ke-1 dan CMC 0,5 % hr ke-29 - 49); KP = kontrol positif (CFA hr ke-1 dan MTX 0,05 mg/200 g bb hr ke-29 - 49); DO I = kel. dosis I (CFA hr ke-1 dan bahan uji 40 mg/200 g bb hr ke-29 - 49); DO II = kel. dosis II (CFA hr ke-1 dan bahan uji 80 mg/200 g bb hr ke-29 - 49); DO III = kel. dosis III (CFA hr ke-1 dan bahan uji 160 mg/200 g bb hr ke-29 - 49); (*) Berbeda bermakna dengan kontrol normal; (#) Berbeda bermakna dengan kontrol negatif

Gambar 4.12 Grafik Perbandingan volume edema rata-rata kaki tikus pada hari ke-29, 36, 43, dan 50 setelah diinduksi CFA pada semua kelompok perlakuan kecuali kelompok kontrol normal.

Dari data diatas terlihat pada kelompok kontrol positif tidak terdapat perbedaan yang bermakna dengan kelompok perlakuan dosis I, II dan III di hari ke-43 dan ke-50. Sehingga artinya kelompok kontrol positif (MTX) dan kelompok dosis I, II dan III (ekstrak daun babandotan) pada hari ke-43 dan ke-50 dapat menurunkan volume edema kaki tikus uji artritis rematoid secara signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (Lampiran 19).

4.7 Hasil uji anti-artritis rematoid pada parameter gambaran histopatologi

4.7.1 Hasil gambaran membran sinovial (sinovitis) pada sendi pergelangan kaki tikus

Pada hari ke-50, semua tikus dikorbankan dan dilakukan isolasi sendi pergelangan kaki/ sendi *ankle* lalu dibuat preparat histopatologi. Pembuatan preparat meliputi fiksasi, dekalsifikasi, dehidrasi, penjernihan, embedding/parafinasi, pemotongan, deparafinasi dan pewarnaan dengan H&E. Selanjutnya

dilakukan pengamatan pada preparat histopatologi yang telah dibuat dengan mikroskop. Preparat dibuat dengan ketebalan 3-5 μm dan diberi pewarnaan hematoksilin-eosin sebagai pewarnaan standar tulang. Gambaran histopatologis membran sinovial berupa sinovitis pada sendi pergelangan kaki kiri tikus di semua kelompok dapat dilihat pada Gambar 4.13 berikut.



Keterangan : Gambaran histopatologi membran sinovial sendi pergelangan kaki pembesaran 40x. (a) Kelompok normal; (b) Kelompok kontrol negatif; (c) Kelompok kontrol positif; (d) Kelompok Dosis I; (e) Kelompok Dosis II; (f) Kelompok Dosis III; Ta = Tulang talus; Cal = Tulang calcaneus; Sin = Membran sinovial (sinovium).

Gambar 4.13 Gambaran histopatologi membran sinovial sendi pergelangan kaki pada semua kelompok tikus

Dari pengamatan Gambar 4.13 diatas didapatkan bahwa membran sinovial sendi pergelangan kaki kelompok normal terlihat tidak terjadi sinovitis, dengan jumlah lapisan penyusun lining sel tipis terdiri dari 1-2 lapis sel, densitas stroma sinovium yang masih longgar (tidak padat), dan tidak didapatkan infiltrasi sel radang dan tidak ditemukan panus. Pada kartilago tulang *calcaneus* tidak terlihat kerusakan kartilago.

Pada kelompok kontrol negatif didapatkan keadaan sinovitis, dengan membran sinovial pada sendi pergelangan kaki terlihat sangat menebal, jumlah lapisan penyusun lining sel tebal yang terdiri dari 3-5 lapis sel, densitas stroma sinovium yang padat dan disertai banyak neovaskularisasi, dan didapatkan infiltrasi sel radang terutama limfosit dan plasma sel yang banyak sampai terbentuk folikel-folikel radang dan ditemukan panus di beberapa tempat. Terlihat kerusakan kartilago tulang *calcaneus* sampai kehilangan integritas tulang, terutama karena adanya panus yang mendesak sampai ke dalam tulang *calcaneus*.

Pada kelompok kontrol positif didapatkan keadaan sinovitis dengan membran sinovial pada sendi pergelangan kaki terlihat menebal, jumlah lapisan penyusun lining sel tipis terdiri dari 2-3 lapis sel, densitas stroma sinovium yang tidak padat dan masih terdapat sedikit neovaskularisasi dan didapatkan infiltrasi sel radang terutama limfosit dan plasma sel yang tidak terlalu banyak dan masih ditemukan panus di beberapa tempat. Terlihat kerusakan minimal dari kartilago tulang *calcaneus* dimana tidak terjadi kehilangan integritas tulang.

Pada kelompok pemberian ekstrak babandotan dosis I didapatkan keadaan sinovitis dengan membran sinovial pada sendi pergelangan kaki terlihat menebal, jumlah lapisan penyusun lining sel terdiri dari 2-5 lapis sel, densitas stroma sinovium yang padat dan disertai banyak neovaskularisasi dan didapatkan infiltrasi sel radang terutama limfosit dan plasma sel yang cukup banyak dan didapatkan gambaran folikel-folikel radang serta ditemukan panus di beberapa tempat. Terlihat kerusakan kartilago tulang *calcaneus* sampai kehilangan integritas tulang.

Pada kelompok pemberian ekstrak babandotan dosis II didapatkan keadaan sinovitis dengan membran sinovial pada sendi pergelangan kaki terlihat tidak menebal, jumlah lapisan penyusun lining sel terdiri dari 2-3 lapis sel, densitas stroma sinovium yang padat dan masih disertai neovaskularisasi dan didapatkan

infiltrasi sel radang terutama limfosit dan plasma sel yang cukup banyak dan didapatkan gambaran folikel-folikel radang namun secara umum terlihat lebih baik daripada dosis 1 serta ditemukan panus di beberapa tempat. Terlihat kerusakan kartilago tulang *calcaneus* namun tidak sampai terjadi kehilangan integritas tulang.

Pada kelompok pemberian ekstrak babandotan dosis III didapatkan keadaan sinovitis dengan membran sinovial pada sendi pergelangan kaki terlihat tidak menebal, jumlah lapisan penyusun lining sel terdiri dari 2-3 lapis sel, densitas stroma sinovium yang tidak terlalu padat dan masih disertai sedikit neovaskularisasi dan didapatkan infiltrasi sel radang terutama limfosit dan plasma sel yang tidak terlalu banyak dan didapatkan gambaran folikel-folikel radang namun secara umum terlihat lebih baik daripada dosis I dan II serta ditemukan panus di beberapa tempat namun aktivitas panus terlihat masih rendah dibandingkan dengan dosis I dan II. Terlihat kerusakan kartilago tulang *calcaneus* namun tidak sampai terjadi kehilangan integritas tulang.

Dari hasil pengamatan gambaran histopatologi membran sinovial pada sendi pergelangan kaki tikus secara umum terlihat bahwa terdapat perbedaan dari kelompok normal dengan kelompok perlakuan (disuntik CFA). Pada kelompok normal membran sinovial terlihat tidak terjadi sinovitis yang digambarkan dengan tidak ada penebalan sel pelapis (*lining cell layer*), densitas stroma sinovium yang tidak padat, dan tidak didapatkan infiltrasi sel radang. Sedangkan pada kelompok perlakuan dengan induksi CFA terjadi penebalan sel pelapis, densitas stroma sinovium menjadi padat, dan didapatkan infiltrasi sel radang sampai terbentuk neovaskularisasi dan panus. Hal ini disebabkan karena penyuntikan CFA yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* dapat menyebabkan terjadinya inflamasi dan kerusakan sendi, panus dapat merusak tulang rawan, subkondral tulang, dan artikular kapsul pada kaki tikus. Sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian induksi suntikan CFA dapat menyebabkan sinovitis yang ditandai dengan peningkatan penebalan lining sel sinovium, peningkatan densitas stroma sinovium sampai timbul panus, dan infiltrasi sel radang yang dapat menyebabkan kerusakan/degradasi kartilago (Wells et al., 2009).

Panus merupakan suatu keadaan inflamasi kronik dari jaringan sinovial sehingga terjadi proliferasi sel sinovial (stroma) disertai terbentuknya pembuluh

darah baru, dan adanya infiltrasi sel inflamasi yang bersifat invasif dan berkembang terus sampai merusak kartilago dan tulang (Schuna, 2005). Dengan bantuan VEGF (*vascular endothelial growth factor*) dapat meningkatkan permeabilitas vaskular dan memperkuat penetrasi dari panus, meningkatkan proliferasi dan migrasi sel endotel pembuluh darah dan membuat pembuluh darah baru. VEGF juga dapat meningkatkan proliferasi bFGF (*basic fibroblas growth factor*) yang berperan dalam meningkatkan pembelahan sel sinoviosit dan juga dapat meningkatkan proliferasi dan migrasi sel endotel pembuluh darah, sehingga meningkatkan proliferasi sel sinoviosit dan pembentukan panus (Ji et al., 2013).

Pemberian ekstrak daun babandotan pada kelompok perlakuan variasi dosis yang mengandung flavonoid (kuersetin) dapat menghambat sekresi VEGF di sel endotel, sehingga penurunan kadar VEGF dapat menghambat pembentukan dan perkembangan panus. Dan kuersetin juga dapat menghambat aktivitas bFGF dalam membantu pembentukan panus (Ji et al., 2013).

Didapatkan perbedaan yang cukup jelas dari kelompok kontrol negatif dan dosis I bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan dosis II dan III. Pada kelompok kontrol negatif dan dosis I didapatkan infiltrasi sel radang yang banyak sampai terbentuk folikel-folikel radang sehingga stroma membran sinovium menjadi padat, terlihat juga sel pelapis membran sinovial yang lebih tebal dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan dosis II dan III. Lapisan sinoviosit ini dapat meningkatkan aktivitas sitokin pro-inflamasi untuk menimbulkan peradangan yang lebih kuat. Sedangkan diantara kelompok kontrol positif dengan kelompok dosis II dan III tidak terlihat perbedaan yang jelas. Namun secara umum terlihat bahwa pemberian variasi dosis ekstrak daun babandotan terutama dosis kedua dan ketiga, yang mengandung flavonoid (kuersetin) dapat memberikan gambaran histopatologi yang lebih baik dari pada kontrol negatif.

Selanjutnya dilakukan pengamatan histopatologi berupa penghitungan skor sinovitis yang dilakukan dengan 2 orang pengamat (Lampiran 20). Tabel 4.9 menunjukkan hasil pengamatan skor sinovitis berdasarkan skoring dari Krenn et al., (2006). Didapatkan bahwa kelompok normal yang tidak disuntik CFA memberikan total skor sinovitis <1 dari pemeriksaan pengamat, yang artinya tidak terjadi sinovitis. Sedangkan kelompok negatif, positif dan variasi dosis ekstrak daun

babandotan yang disuntik CFA memberikan total skor sinovitis 5-9 dari pemeriksaan pengamat, yang artinya terjadi sinovitis berat yang setara dengan artritis rematoid. Hasil pengamatan gambaran histopatologi AR berdasarkan skor sinovitis dapat dilihat pada Tabel 4.9.

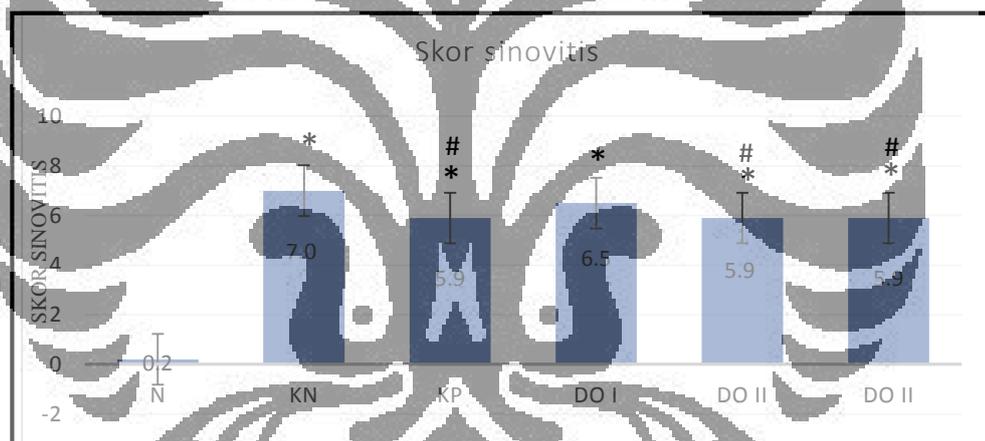
Tabel 4.9 Hasil pengamatan gambaran histopatologi AR berdasarkan skor sinovitis

Kelp	Pengamat 1				Pengamat 2				Skor sinovitis (Krenn)
	Lining sel	Stroma	Sel Radang	Jml	Lining sel	Stroma	Sel Radang	Jml	
N	0.4	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2
KN	1.6	3.0	2.6	7.2	2.0	3.0	1.8	6.8	7.0 (*)
KP	1.0	3.0	1.8	5.8	1.0	3.0	2.0	6.0	5.9 (*#)
DO I	1.2	3.0	2.4	6.6	1.4	3.0	2.0	6.4	6.5 (*)
DO II	1.0	3.0	2.0	6.0	1.0	3.0	1.8	5.8	5.9 (*#)
DO III	1.0	3.0	2.0	6.0	1.0	3.0	1.8	5.8	5.9 (*#)

Keterangan : N = kontrol normal (CMC 0,5 %); KN = kontrol negatif (CMC 0,5 %); KP = kontrol positif (metotreksat 0,05 mg/200 g bb); DO I = dosis I (bahan uji ekstrak daun babandotan 40 mg/200 g bb); DO II = dosis II (bahan uji ekstrak daun babandotan 80 mg/200 g bb); DO III = dosis III (bahan uji ekstrak daun babandotan 160 mg/200 g bb); (*) Berbeda bermakna dengan kontrol normal; (#) Berbeda bermakna dengan kontrol negatif

Tabel 4.9 diatas menjelaskan bahwa skor artritis pada tikus dapat diturunkan dengan pemberian ekstrak daun babandotan terutama dengan dosis II dan III, bila dibandingkan dengan kontrol negatif, dan setara dengan pemberian metotreksat. Diduga flavonoid pada pemberian ekstrak daun babandotan di kelompok dosis, dapat menghambat proliferasi membran sinovial melalui peningkatan apoptosis sinoviosit/FLS pada tikus model AR melalui jalur anti inflamasi dan penghambatan COX-2 (jalur NF-kB, TNF- α , IL-1, dan IL-6). Dimana ketika terjadi sinovitis, makrofag di membran sinovial teraktivasi, terjadi *over* ekspresi dari sitokin inflamasi (termasuk TNF- α dan IL-1), kemokin (IL-8) dan MMP. TNF- α merangsang sel endotel untuk meningkatkan ekspresi molekul adesi dan memudahkan lekosit menempel pada endotel dan infiltrasinya sehingga menyebabkan inflamasi lokal pada sendi yang selanjutnya dapat terjadi AR. MMP

yang disekresi oleh kondrosit juga dapat merusak kartilago tulang rawan ditambah aktivitas dari panus dapat menambah kerusakan sampai ke daerah tulang. Tujuan dari terapi anti-arthritis rematoid adalah menghambat proliferasi membran sinovial khususnya sinoviosit yang disebabkan proses inflamasi dan merangsang terjadinya apoptosis membran sinovial. *Fibroblas-like sinoviosit* (FLS) merupakan sel yang diduga dapat menyebabkan aktivasi hiperplasia fibroblas dan menyebabkan terjadinya panus pada membran sinovial penderita arthritis (Wang et al., 2014; Capitanescu et al, 2011). Hal ini dibuktikan dengan penelitian ini dimana semakin tebal lapisan pelapis/*lining cell layer*/FLS, maka semakin aktif perusakan jaringan kartilago oleh panus dan semakin banyak infiltrasi sel radang pada membran sinovial. Selama masa aktif AR, hiperplasia jaringan sinovial dan panus secara langsung merusak jaringan kartilago dan tulang (Jia & He, 2015). Grafik hasil skor sinovitis dapat dilihat pada Gambar 4.14 dibawah ini.



Keterangan: N = kontrol normal (CMC 0,5 %); KN = kontrol negatif (CMC 0,5 %); KP = kontrol positif (metotreksat 0,05 mg/200 g bb); DO I = dosis I (bahan uji ekstrak daun babandotan 40 mg/200 g bb); DO II = dosis II (bahan uji ekstrak daun babandotan 80 mg/200 g bb); DO III = dosis III (bahan uji ekstrak daun babandotan 160 mg/200 g bb); (*) Berbeda bermakna dengan kontrol normal; (#) Berbeda bermakna dengan kontrol negatif

Gambar 4.14 Grafik Perbandingan skor sinovitis pada semua kelompok perlakuan

Dari grafik diatas dapat terlihat bahwa ekstrak daun babandotan pada dosis II dan III secara signifikan ($p < 0,05$) dapat mengurangi keadaan sinovitis berat atau AR dan mencegah progresitas perburukan pada AR yang setara dengan penggunaan obat metotreksat. Pemberian metotreksat dan ekstrak daun babandotan pada kelompok induksi CFA menunjukkan penurunan hiperplasia membran sinovial

yang signifikan dibandingkan untuk kelompok kontrol sehingga menunjukkan efek perlindungan terhadap kartilago tulang. Penghambatan pembentukan panus dan degradasi kartilago terkait dengan penghambatan infiltrasi neutrofil. Pemberian obat metotreksat dan ekstrak daun babandotan dapat mengurangi keadaan sinovitis karena keduanya dapat menghambat kerja NF- κ B sehingga menghambat aktivitas dan produksi sitokin pro-inflamasi terutama TNF- α dan IL-1.

4.7.2 Hasil penghitungan jumlah osteoklas pada tulang *calcaneus* tikus

Osteoklas merupakan sel berukuran besar yang merupakan gabungan dari banyak monosit. Sel ini melepaskan enzim lisosom dan asam yang dapat mencerna protein dan komponen mineral pada matriks tulang yang mengakibatkan resorpsi pada tulang (Tortora & Derrickson, 2012). Aktifitas yang berlebihan pada osteoklas dapat mengakibatkan erosi tulang. Morfologi osteoklas dapat dilihat pada Gambar 4.15 dibawah ini.

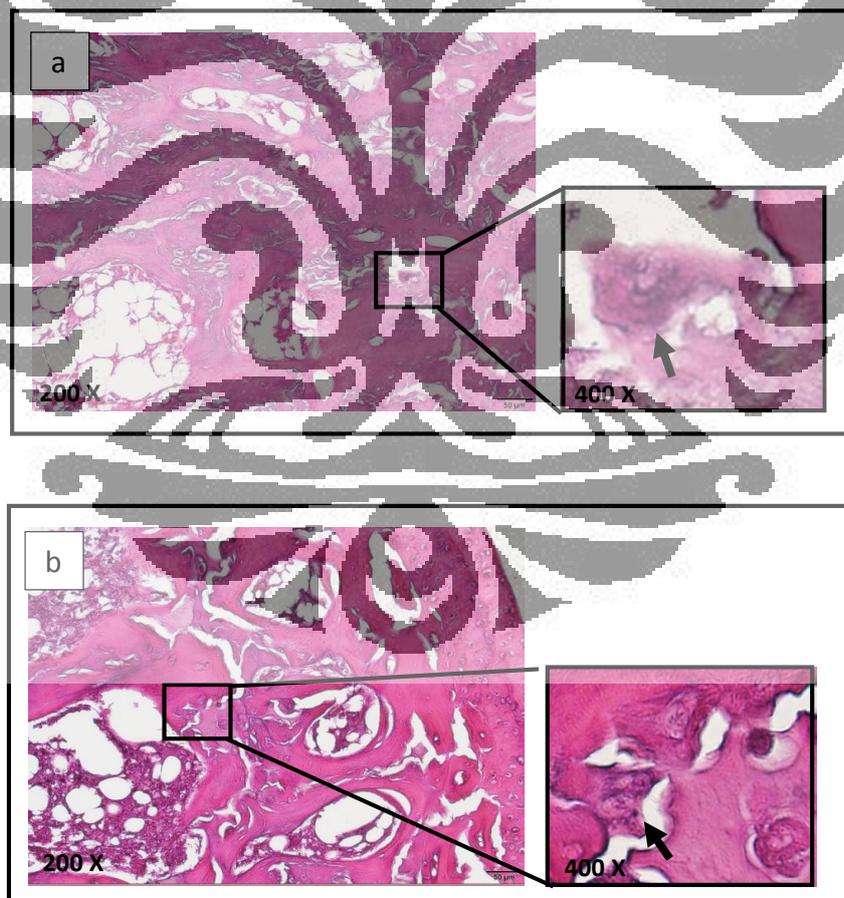


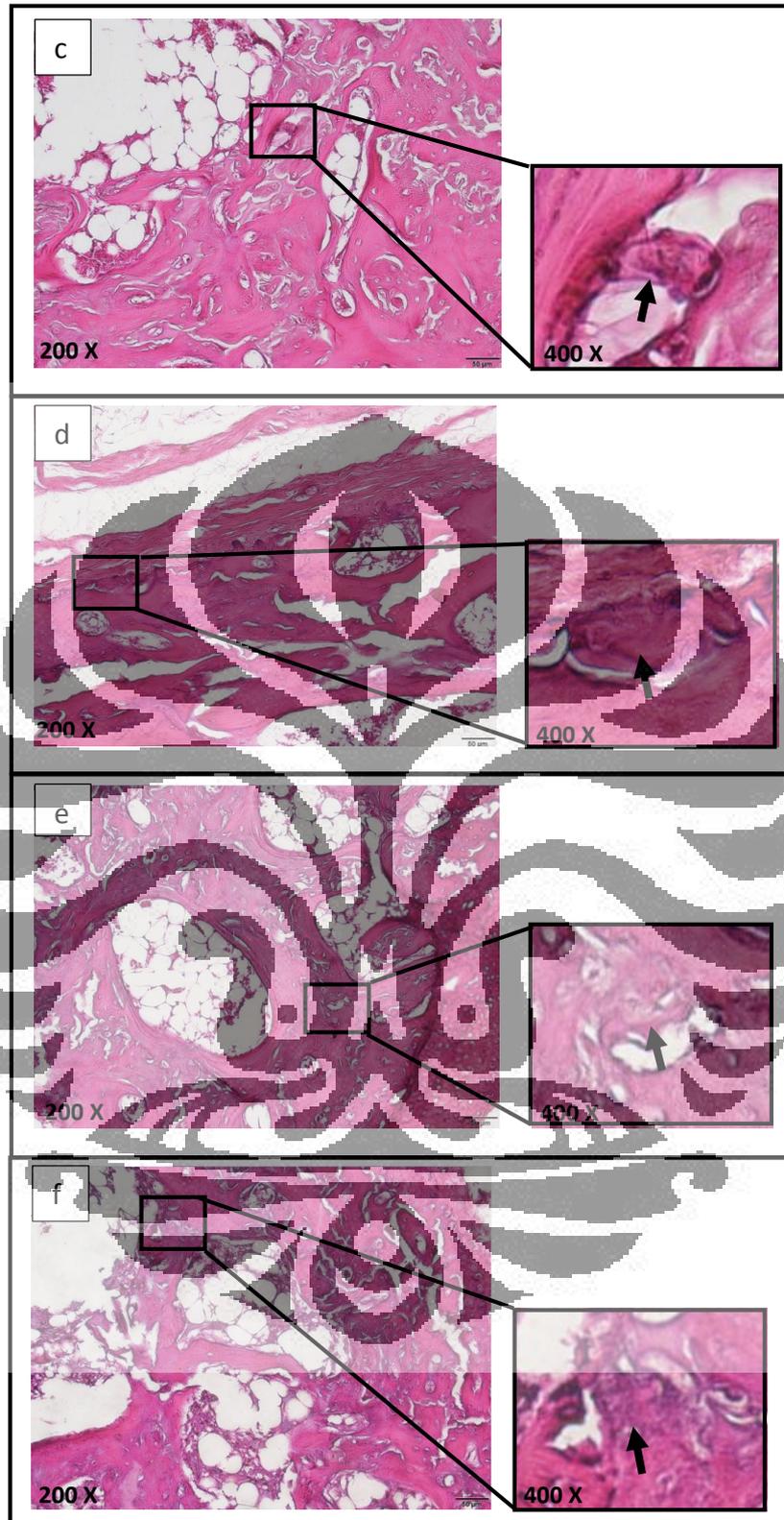
Keterangan : tanda panah menunjukkan osteoklas (Sumber : Foto Pribadi)

Gambar 4.15 Osteoklas

AR pada tikus menyebabkan osteoklas yang berada pada tulang *calcaneus* tikus menjadi aktif dan jumlahnya bertambah, hal ini disebabkan karena inflamasi akibat dari induksi CFA membuat sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α dan IL-1 meningkat. Sitokin pro-inflamasi dapat mengaktifkan ikatan RANKL dan RANK yang bersama dengan M-CSF dapat meningkatkan pembentukan osteoklas. Aktivitas RANKL dapat dihentikan oleh reseptor TNF lainnya, yaitu osteoprotegerin (OPG). RANKL diekspresikan oleh osteoblas dan rangsangan pada RANK oleh RANKL menyebabkan pengaktifan faktor transkripsi NF- κ B

yang mendorong ekspresi gen untuk merangsang pembentukan, fusi, diferensiasi, fungsi dan kelangsungan hidup osteoklas (Rosenbergh, 2013). Sehingga peningkatan jumlah osteoklas pada AR akibat induksi CFA dapat meningkatkan resorpsi tulang *calcaneus* tikus. Dari hasil pemeriksaan histopatologi tulang *calcaneus* di kelompok tikus yang diinduksi oleh CFA menunjukkan peningkatan jumlah osteoklas dibandingkan dengan kelompok tikus normal. Gambaran histopatologis osteoklas pada tulang *calcaneus* kaki tikus pada hari ke-50 di semua kelompok diperiksa dengan menggunakan mikroskop olympus pembesaran 200 x (luas pandang 702,24 μm x 527,56 μm) dan selanjutnya diperbesar dengan pembesaran 400 x (luas pandang 350,90 μm x 263,56 μm). Hasil gambaran histopatologi osteoklas tulang *calcaneus* kaki tikus semua kelompok dapat dilihat pada Gambar 4.16 berikut ini.





Keterangan : Gambaran histopatologi osteoklas tulang *calcaneus* kaki tikus (a) Kel. Normal; (b) Kel. Kontrol negatif; (c) Kel. Kontrol positif; (d) Kel. Dosis I; (e) Kel. Dosis II; (f) Kel. Dosis III; (1) pembesaran 200x dan 400x; panah pendek hitam : osteoklas.

Gambar 4.16 Gambaran histopatologi osteoklas tulang *calcaneus* kaki tikus semua kelompok

Dari Gambar 4.16 diatas terlihat osteoklas banyak ditemukan di daerah lempeng epifise dimana terlihat di sekeliling osteoklas terdapat daerah kosong yang merupakan hasil resorpsi tulang. Osteoklas akan melakukan resorpsi tulang sehingga meninggalkan rongga yang disebut lakuna *Howship* pada tulang trabekular atau rongga kerucut (*cutting cone*) pada tulang kortikal (Setiyohadi, 2009). Untuk mengetahui efek anti-arthritis rematoid ekstrak daun babandotan maka dilakukan penghitungan jumlah rata-rata osteoklas pada tiap kelompok setelah diberi perlakuan pada hari ke-50 yang dilakukan oleh 2 pengamat (Lampiran 21). Jumlah rata-rata osteoklas pada tiap kelompok setelah diberi perlakuan pada hari ke-50 tersebut hasilnya dapat dilihat pada Tabel 4.10 dibawah ini.

Tabel 4.10 Jumlah osteoklas rata-rata per lapang pandang dan per mm² untuk semua kelompok perlakuan pada hari ke-50

Kelompok	Rata-rata jumlah osteoklas /lapang pandang (370473,7 µm ²)	Rata-rata jumlah Osteoklas/mm ²	Rata-rata jumlah osteoklas /lapang pandang (92483,2 µm ²)	Rata-rata jumlah Osteoklas /mm ²
	200x		400x	
N	1,90 ± 0,96	5,12 ± 2,58	1,62 ± 0,79	17,52 ± 8,49
KN	7,50 ± 1,15	20,30 ± 3,10 (*)	7,56 ± 0,91	81,74 ± 9,84 (*)
KP	3,80 ± 0,53	10,27 ± 1,44 (*#)	4,20 ± 0,24	45,41 ± 2,65 (*#)
DO I	7,26 ± 0,32	19,59 ± 0,87 (*)	7,32 ± 0,56	79,15 ± 6,04 (*)
DO II	6,69 ± 0,31	18,06 ± 0,83 (*)	6,88 ± 1,25	74,39 ± 13,47 (*)
DO III	5,18 ± 0,69	13,99 ± 1,87 (*#)	5,30 ± 0,46	57,31 ± 5,01 (*#)

Keterangan : N = kontrol normal (CMC 0,5 %); KN = kontrol negatif (CMC 0,5 %); KP = kontrol positif (metotreksat 0,05 mg/200 g bb); DO I = dosis I (bahan uji ekstrak daun babandotan 40 mg/200 g bb); DO II = dosis II (bahan uji ekstrak daun babandotan 80 mg/200 g bb); DO III = dosis III (bahan uji ekstrak daun babandotan 160 mg/200 g bb); Pembesaran 200x (lap. pandang = 702,24 µm x 527,56 µm); Pembesaran 400x (lap. pandang = 350,90 µm x 263,56 µm); (*) Berbeda bermakna dengan kelompok kontrol normal (p<0,05); (#) Berbeda bermakna dengan kelompok kontrol negatif (p<0,05)

Dari Tabel tersebut dapat diketahui jumlah osteoklas rata-rata dengan pembesaran 200 x pada semua kelompok pada hari ke-50, dimana bahwa pada kelompok kontrol negatif terdapat jumlah osteoklas rata-rata per lapang pandang paling banyak daripada kelompok perlakuan lainnya (7,50). Selanjutnya dengan

pemberian obat metotreksat dan variasi dosis ekstrak daun babandotan terjadi penurunan jumlah osteoklas rata-rata per lapang pandang di daerah tulang *calcaneus*. Pemberian dosis ekstrak daun babandotan memberikan hasil penurunan jumlah osteoklas yang tertinggi pada dosis III (5,18), selanjutnya dosis II (6,69) dan terakhir dosis I (7,26). Demikian pula pada pemeriksaan mikroskop dengan pembesaran 400 x, dimana semakin tinggi dosis ekstrak daun babandotan yang diberikan maka semakin menurunkan jumlah osteoklas rata-rata per lapang pandang di daerah tulang *calcaneus* tikus. Grafik perbandingan jumlah total osteoklas per mm² pada tulang *calcaneus* tikus dengan pembesaran 200 x dan 400 x dapat dilihat pada Gambar 4.17 berikut.



Keterangan: N = kontrol normal (CMC 0,5 %); KN = kontrol negatif (CMC 0,5 %); KP = kontrol positif (metotreksat 0,05 mg/200 g bb); DO I = dosis I (bahan uji ekstrak daun babandotan 40 mg/200 g bb); DO II = dosis II (bahan uji ekstrak daun babandotan 80 mg/200 g bb); DO III = dosis III (bahan uji ekstrak daun babandotan 160 mg/200 g bb); Pembesaran 200x dan 400x; (*) Berbeda bermakna dengan kontrol normal ($p < 0,05$); (#) Berbeda bermakna dengan kontrol negatif ($p < 0,05$)

Gambar 4.17 Grafik Perbandingan jumlah osteoklas rata-rata per mm² pada tulang *calcaneus* tikus dengan pembesaran 200 x dan 400 x

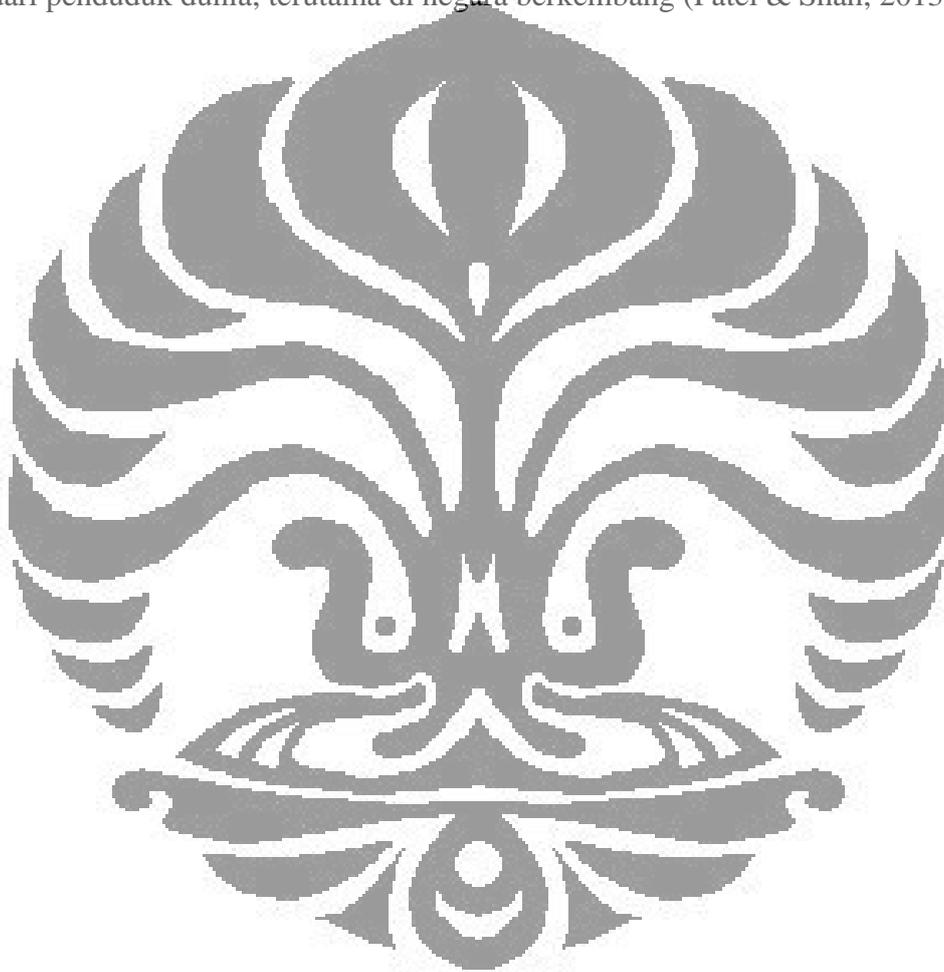
Dari jumlah osteoklas rata-rata per lapang pandang 370473,7 μm^2 (pembesaran 200x) dan 92483,2 μm^2 (pembesaran 400x) selanjutnya dikonversi kedalam jumlah osteoklas rata-rata per mm². Didapatkan hasil bahwa jumlah osteoklas rata-rata per mm² pada pembesaran 200 x di kelompok kontrol negatif

menunjukkan jumlah osteoklas yang terbesar (20,23) dibandingkan kelompok perlakuan lainnya, yaitu kelompok positif (10,27), dan variasi dosis I (19,59), dosis II (18,06) dan dosis III (13,99). Dan didapatkan hasil bahwa jumlah osteoklas rata-rata per mm² pada pembesaran 400x di kelompok kontrol negatif menunjukkan jumlah yang terbesar (81,74) dibandingkan kelompok perlakuan lainnya, yaitu kelompok positif (45,41), dan variasi dosis I (79,15), dosis II (74,39) dan dosis III (57,31).

Pada Gambar 4.17 terlihat bahwa pemberian ekstrak daun babandotan dosis III dapat menurunkan jumlah osteoklas secara signifikan ($p < 0,05$) pada pembesaran 200 x dan 400 x (Lampiran 21). Hal ini menunjukkan bahwa metabolit sekunder seperti flavonoid yang terkandung dalam ekstrak daun babandotan penggunaan berperan dalam menekan jumlah total osteoklas rata-rata per mm² di tulang *calcaneus* pada tikus model AR. Flavonoid dapat menekan produksi dan aktivitas sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α dan IL-1 (Nair et al., 2006; Chen et al., 2004) yang dapat mengaktifkan ikatan RANK-RANKL. Osteoklas berasal dari monosit sebagai prekursor, dimana pembentukannya memerlukan *receptor activator of nuclear factor κ B ligand* (RANKL) dan *macrophag colony-stimulating factor* (M-CSF). RANKL akan mengikat RANK di permukaan lalu memicu diferensiasi sel menjadi osteoklas (Stolina et al., 2005; Aeschlimann & Evan, 2004). RANKL dipicu oleh sinovial fibroblas dan limfosit T yang teraktivasi (Stolina et al., 2005) serta sitokin dan sel-sel makrofag diantaranya IL1 dan TNF- α (Theofilopoulos & Bona., 2002; Ikawati., 2014). Osteoklas mempunyai enzim yang bersifat asam yang dapat menyebabkan demineralisasi daerah kartilago dan prekondral sehingga terbentuk celah absorpsi sehingga menyebabkan degenerasi kartilago dan erosi tulang pada AR (McInnes & Scheet, 2011; Karmakar et al., 2010). Dengan berkurangnya pembentukan dan aktivitas osteoklas dalam meresorpsi tulang membuktikan bahwa pemberian ekstrak daun babandotan dapat berperan dalam mekanisme anti-arthritis rematoid pada hewan model AR.

Hasil penelitian uji-arthritis rematoid pada tikus ini dapat menjelaskan bahwa ekstrak etanol daun babandotan dapat menurunkan volume edema kaki tikus dan dapat menurunkan derajat sinovitis dan jumlah osteoklas pada tulang

calcaneus tikus, dimana dosis terbesar (160 mg) paling tinggi menurunkan parameter uji anti-arthritis rematoid dibanding dosis kedua (80 mg) dan dosis pertama (40 mg). Hasil data dari penelitian ini didapatkan bahwa ekstrak daun babandotan dapat digunakan sebagai obat alternatif anti-arthritis rematoid secara *invivo*. Sehingga obat berbahan alam merupakan sumber obat baru yang cukup poten, dimana memberikan kontribusi pada obat-obatan baru yang ditemukan. Obat herbal terus membantu memberikan perbaikan kesehatan bagi lebih dari 80% dari penduduk dunia, terutama di negara berkembang (Patel & Shah, 2013).



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

- a. Karakterisasi ekstrak etanol 70 % daun babandotan yang dilakukan telah memenuhi persyaratan Farmakope Herbal Indonesia. Ekstrak etanol daun babandotan mengandung flavonoid yang berpotensi sebagai anti-arthritis rematoid pada tikus model AR.
- b. Ekstrak etanol 70 % daun babandotan dapat menurunkan volume edema kaki tikus model AR, namun belum sebaik hasil yang didapat dengan obat perbandingan metotreksat.
- c. Ekstrak etanol 70% daun babandotan dapat menurunkan skor sinovitis pada gambaran histopatologi membran sinovial sendi pergelangan kaki tikus model AR yang setara dengan hasil yang didapat dengan obat perbandingan metotreksat.
- d. Ekstrak etanol 70% daun babandotan dapat menurunkan jumlah osteoklas pada tulang *calcaneus* model tikus AR, namun belum sebaik hasil yang didapat dengan obat perbandingan metotreksat.

5.2 SARAN

- a. Perlu dilakukan penelitian uji anti-arthritis rematoid dengan waktu perlakuan yang lebih lama, sehingga hasil yang didapat menjadi lebih maksimal
- b. Perlu dilakukan pemeriksaan toksisitas lebih lanjut pada hewan coba untuk mengetahui efek samping ekstrak etanol daun babandotan
- c. Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut dengan menggunakan fraksi senyawa aktif daun babandotan pada uji anti-arthritis rematoid
- d. Perlu dilakukan pewarnaan spesifik untuk pemeriksaan osteoklas pada uji anti-arthritis rematoid agar hasilnya lebih maksimal

DAFTAR PUSTAKA

- Aeschlimann, D., & Evans, B.A. (2004). The vital osteoclast: How is it Regulated ? *Cell Death and Differentiation*. 11:S5-S7
- Afrianti, R., Yenti, R., & Monica, H. (2014). Pengamatan serabut kolagen pada proses penyembuhan luka dalam sediaan krim ekstrak daun babandotan (*Ageratum conyzoides L.*). *Prosiding Seminar Nasional dan Workshop "Perkembangan Terkini Sains dan Klinik IV"*. 1:110-118
- Almarestani, L., Fitzcharles, M.A., Bennet, G.J & Silva, A.R. (2011). Imaging studies in CFA model of regional polyarthritis, a model suitable for the study of pain mechanism, in the rat. *Arthritis & Rheumatism*. Vol. 63 (6): 1573-1581
- Al Rekabi, M.D., Ali, S.H., Al Basaisi, H., Hashim, F., Hussein, A.H & Abbas, H.K. (2014). Immunomodulatory effect of Quarsetin in patient with Active Rheumathoid arthritis. *JAMR*. 4 (2): 1-11
- Anonimous. (2008). DBL[®] Methotrexate Injection and Tablets. Data sheet. New Zealand : Hospira NZ Limited
- Ansel, H.C. (2008) *Pengantar bentuk sediaan farmasi*. Edisi keempat. Penerbit Universitas Indonesia UI-Press, Jakarta
- ARAC. (2013). *Guidelines for the use of adjuvant in research special emphasis on Freund's Adjuvant*. Office of Animal Care and House. Available online : <http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/Adjuvant.pdf>.
- Ansari, M.M., Neha, & Khan, H.A. (2014). Quersetin alleviate oxidative stress and inflammation trough up regulation of antioxidant machinery and down-regulation of COX2 and NF-kB expression in collagen induced rheumatoid arthritis. *International Journal. Drug Dev. & Res*. 6 (1) : 231-238
- Awad, N.E., Kassem, H.A., Elkhayat, Z.A., El-Feky, A.M., & Mailoub, A.A. (2013). Chemical composition and anti-inflammatory evaluation of *Ageratum conyzoides L.* leaves. *Journal Applied Sciences Research*. 9 (3):2126-2134
- Badan POM Republik Indonesia. (2006). *Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia*. Volume 2. Jakarta
- Badan POM Republik Indonesia. (2008). Direktorat Obat Asli Indonesia. p.5.
- Bagalkotkar, G., Sagineedu, S. R., Saad, M.S., & Stanslas, J. (2006). Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties : A review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 58:1559-1570.
- Bahtiar, A., Nakamura, T., Kishida, K., Katsura, J., Nitta, M. (2011). The L-Ser analog #290 promotes bone recovery in OP and RA mice. *Pharmacological Research* . 64. 203-209.
- Baratawidjaya, K. G., & Rengganis, I. (2012). *Imunologi Dasar*. Edisi ke-10. Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta
- Bellik, Y., Boukraa, L., Alzahrani, H.A., Bakhotmah, B.A., Abdellah. F., Hammoudi, S.M. et al. (2013). Molecular mechanism underlying Anti inflamantory and Anti allergic activity of phytochemicals:an Uptade. *Molecules*. 18 (1): 322-353

- Bendele, A.M. (2001). Animal model of rheumatoid arthritis. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal interaction* . I (4) : 377-385
- Bevaart, L., Vervoordeldonk, M.J., & Tak, P.P. (2010). Review : Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis How does it relate to rheumatoid arthritis?. *Arthritis & Rheumatism*. 62 (8):2192-2205
- Blits, M., Jansen, G., Assaraf, Y.G., Wiel, M. A., Lems, W. F., Nurmohamed, M. T., et al. (2013). Methotrexate normalizes up-regulated folate pathway genes in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. Vol 65 (11) : 2791-2802.
- Bolon, B., Morony, S., Cheng, Y., Hu, Y.L., & Feige, U. (2004). Osteoclast number in lewis rats with adjuvant-induced arthritis: Identification of preferred sites and parameters for rapid quantitative analysis. *Vet Pathol*. 41:30-36
- Bolon, B., Stolina, M., King, C., Middleton, S., Gasser, J., Zack, D., et al. (2011). Rodent preclinical models for developing novel antiarthritic molecules: Comparative biology and preferred methods for evaluating efficacy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Hindawi Publishing Corporation.
- Bosi, C.F., Rosa, D.W., Grougnet, R., Lemonakis, N., Harebolaki, N., Skaltsounis, A.L., et al., (2013). Pyrrolizidine alkaloids in medicinal tea of *ageratum conyzoides*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 23(3):425-432
- Braun, T., & Zwerina, J. (2011). Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 13:235
- Candon, S.K., Combe, B., Vincent, R., Clot, J., Piret, V., & Eliaou, J.F. (2001). HLA-DRB1 gene transcripts in Rheumatoid Arthritis. *Clin. Exp. Immunol*. 124 (1) :142-149
- Corwin, E.J. (2001). *Buku saku patofisiologi* (pp.307-309). Jakarta: EGC
- Capitanescu, B., Simionescu, C., Margaritescu, S., Stepan, A., & Ciurea, R. (2011). Clinical and morfological aspects of sinovitis in early rheumatoid arthritis. *Current Health Science Journal*. Vol. 37. No.1.
- Carter, M.A (2006). *Patofisiologi konsep klinis proses-proses penyakit: Artritis rematoid* (Pendit, B., Hartanto, H., Wulansari, P., Mahanani, D., Penerjemah). Dalam Price, S. A., & Wilson, L. M. (ed.). 2 (6):1385-1390). Jakarta : EGC
- Chen, C.C., Chow, M.P., Huang, W.C., Lin, Y.C., & Chang, Y.J. (2004). Flavonoids inhibit tumor necrosis factor- α -induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein1 and nuclear factor-kB: Structure-Activity relationships. *Molecular Pharmacology*. Vol.66 (3):683-693
- Cronstein, B.N. (2005). Low dose methotrexate : A mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacological reviews*. 57 (2): 163-172
- Cutolo, M., Sulli, A., Pizzorni, C., & Seriolo, B. (2001). Anti inflammatory mechanism of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Disease*. 60:729-735
- Dahlan, S.M. (2012). *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan. Deskriptif, Bivariat, dan Multivariat dilengkapi aplikasi dengan menggunakan SPSS*. Jakarta : Penerbit Salemba Medika.

- Dehestani, V., Shariati-sharabi, Z., Mohiti, S., Akhlaghi, S. (2015). Liver toxicity in rheumatoid arthritis patient treated with methotrexate. *Asian Pac J. Med Toxicol.* 4:102-105
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1989). *Materia Medika Indonesia*. Jilid V. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia. p. 10-19
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Materia Medika Indonesia*. Jilid VI. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia. p. 333-337
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia. p. 541
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter Standart Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. Jakarta: Bakti Husada. Hal 10.31
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2011). *Farmakope Herbal Indonesia*. Suplemen II. (ed.1). Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 174-175
- Diallo, A., Gadegkeku, K. E., Agbonon, A., Aklikokou, K., Creppy, E.C., & Gbeassor, M. (2010). Acute and sub-chronic (28 day) oral toxicity studies of hidroalcohol leaf extract of *ageratum conyzoides L.* (Asteraceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. Vol 9 (5) :463-467
- Dudek, R. W. (2001). *High Yield Histology. Intisari Histologi*. (Tambayong, Penerjemah). Jakarta : Hipocrates
- Durga, M., Nathiya, S., Devasena, T. (2014). Immunomodulatory and antioxidant actions of dietary flavonoids. *Int Journal Pharm Pharm Sci*. Vol 6, Issue 2; 50-56.
- Elya, B., Rissyelly., Mauldina, M.G & Puspitasari, N (2015). *Buku Penuntun Praktikum Fitokimia*. Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.
- Federer, W.T. (1963). *Experimental design. theory and application*. New York: Mac Millan
- Hanani, E. (2016). *Analisis Fitokimia*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC .
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fitokimia*. Departemen Farmasi FMIPA. Universitas Indonesia. Jakarta : Percetakan Cipta Kreasi Bersama.
- Hassan, Md. M., Shahid-ud-Daula, A.F.M., Jahan, I.A., Nimmi, I., Adnan, T., Mansur, A.A., et al. (2012). Anti inflamantory activity. total flavonoid and tannin content from the ethanolic extract of *Ageratum conyzoides Linn.* leaf. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*. 1 (5) : 234-241
- Ikawati, Z. (2014). *Farmakologi molekuler target aksi organ dan mekanisme molekularnya*. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press 139-149
- Isbagio, H. (2009). *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam :Struktur dan metabolisme tulang Dalam Sudoyo, dkk., (editor)*. Jilid III. Edisi V. pp 2382-384. Jakarta : Interna Publishing.

- ITIS. (2015). The Integrated Taxonomi Information System. <http://www.itis.gov/index.html>. Diunduh tanggal 30 November 2015
- Ji, J.J., Lian, Y., Huang, S., Zhang, H.J., Diao, Y.P & Li, K. (2013). Quersetin : a potential nature drug for adjuvant treatment of rheumatoid arthritis. *Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med.* 10(3):418-421
- Jia, Z., & He, J. (2015). Paeoniflorin ameliorates rheumatoid arthritis in rat models through oxidative stress, inflammation and cyclooxygenase 2. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 11:655-659
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (1992). *Histologi Dasar.* (Edisi 3). Jakarta: EGC
- Kamboj, A., & Saluja, A.K. (2011). Isolation of stigmasterol and B-sitosterol from petroleum ether extract of aeral parts of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae). *Int. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 3 (1) : 94-96
- Kamboj, A., & Saluja, A.K. (2013). HPTLC estimation of stigmasterol from petroleum ether extract of dried leaf, stem and flower of *Ageratum conyzoides*. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 19 (2): 60-65
- Karmakar, S., Kay, J., & Gravalles, E. (2010). Bone damage in rheumatoid arthritis-Mechanistic insight and approaches to prevention. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 36(2):385-404.
- Klareskog, L., Catrina, A.I., & Paget, S. (2009). Rheumatoid arthritis. *The Lancet.* Vol. 373 (9664) :659-672.
- Komatsu, N., & Takanayagi, H. (2012). Inflammation and Bone Destruction in Arthritis : Synergistic activity of Immune and Mesenchymal cells in Joint. *Frontier in Immunology.* 3.77:1-11
- Krenn, V., Morawietz, L., Buemester, G.R., Kinne, R.W., Mueller-Ladner, U., Muller, B., et al. (2006). Synovitis score:discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. *Histopathology.* 49 (4): 358-364
- Laste, G., Souza, I.C.C., Santos, V.S., Caumo, W., & Torres, I.L. (2014). Histopathological changes in three variation of Wistar rat adjuvant-induced arthritis model. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars (IJPRS).* Vol-3. 1-2.
- Lipsky, P. E. (2007). Why Does Rheumatoid arthritis involve the joints?. *The New England Journal of Medicine.* 356 (23) : 2419-2420.
- Malemud. C.J. (2013). Intracellular signaling pathways in Rheumatoid arthritis. *Journal Clin Cell Immunology.* 4:160.
- Margaretha, S.M.U. (2012). *Efek ekstrak etanol 70% rumput mutiara (Hedyotis corymbosa (L.) Lamk.) terhadap penurunan jumlah osteoklas tulang calcaneus tikus model arthritis rheumatoid.* Skripsi. FMIPA. Prodi Farmasi. Universitas Indonesia
- McInnes, I. B., & Schett, G. (2011). Mechanism of disease the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England Journal of Medicine.* 365(23): 2205-2219.

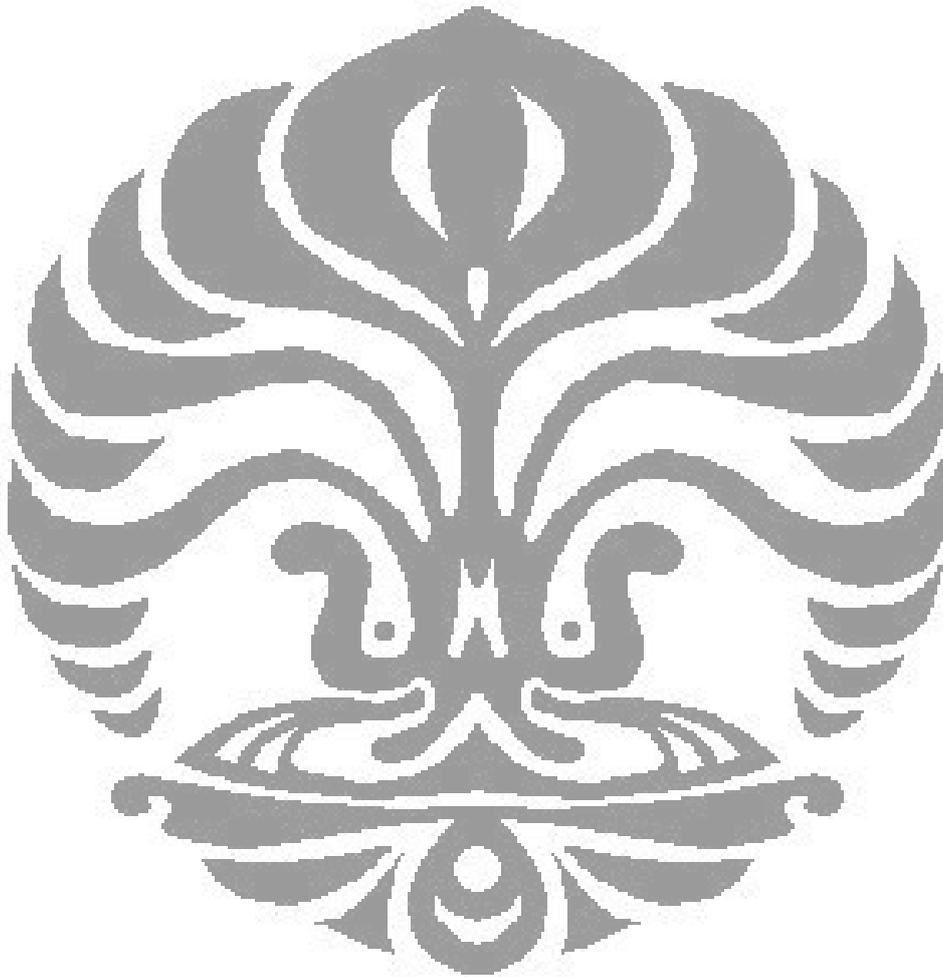
- Miyamoto, T., & Suda, T. (2003). Differentiation and function of osteoclast. *Keio J. Med.* 52 (1):1-7
- Mohammed. F.F., Smookler. D.S., Khokha. R. (2003). Metalloproteinases. inflammation. and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 62:43-47
Downloaded from <http://ard.bmj.com/> on October 10, 2015. Published by group.bmj.com.
- Moura, A. C., Silva, E. L., Fraga, M.C., Wanderley, A. G., Afiatpour, P., Maia, M. B. (2005). Anti inflamantory chronic toxicity study of the leaves of *Ageratum conyzoides L.* in rats. *Phytomedicine.* 12 (1-2):138-42
- Mourad, J., & Monem, F. (2013). HLA-DRB1 allele association with RA susceptibility and severity in Syria. *Rev. Bras. Reumatol.* 53 (1):47-56
- Mulyaningsih, S., & Darmawan, E. (2006). Efek anti arthritis pisang ambon (*Musa paradisiacal sapientum L.*) dan lidah buaya (*Aloe vera L.*) terhadap adjuvant-Induced Artritic pada tikus. *Biodeversitas.* vol.7 (3):273-277
- Mun'im, A., & Hanani, E. (2011). *Fitoterapi dasar*. Jakarta : Dian Rakyat 2-22.
- Nair, M.P., Mahajan, S., Reynolds, J.L., Aalinkeel, R., Nair, H., Schwartz, S.A., & Kandaswami, C. (2006). The flavonoid quersetin inhibits proinflammatory cytokine (Tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF-kB sistem. *Clinical and vaccine immunology.* Vol 13(3):319-328
- Niewold, T.B., Harison, M.J., Paget, S.A. (2007). Anti-CCP antibodies a diagnostic and prognostic tool in rheumatoid arthritis. *Pub Med. gov. US Nasional Institute of Health.* 100 (4) : 193-201. Diunduh 22 April 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17434910>
- Okunade, A.L. (2002). Review *Ageratum conyzoides L.* (Asteraceae). *Fitoterapia* 73 (1):1-16
- Patel, S.S., & Shah, P.V. (2013). Evaluation of anti inflammatory potential of the multidrug herbomineral formulation in male Wistar rats against rheumatoid arthritis. Original research article-Experimental. *Journal of Ayurveda & Integrated Medicine.* 4 (2) : 86-93
- Puspita, M.D.A (2009). *Pengoptimuman fase gerak KLT menggunakan desain campuran untuk pemisahan komponen-ekstrak meniran (Phyllanthus niruri)*. Skripsi. FMIPA. Departemen Kimia. Institut Pertanian Bogor.
- Radis, C.D.O (2012). Rheumatoid arthritis : Diagnosis and treatment with a particular emphasis on South Sudan. *SSMJ- Sudan South Medical Journal.* 5(4):85-88
- Radji, M. (2015). *Imunologi dan Virologi*. Jakarta: ISFI Penerbitan
- Rahman, Md.A., Akter, N., Rashid, M.H., Ahmed, N.U., Uddin, M.N., Islam, S. Md. (2012). Analgesic and anti-inflamantory effect of whole *Ageratum conyzoides* and *Emilia sonchifolia* alcoholic extracts in animal models. *African journal of pharmacy and pharmacology.* Vol 6 (20) :1469-1476

- Ridwan, E. (2013). Etika pemanfaatan hewan percobaan dalam penelitian Kesehatan. Artikel pengembangan Pendidikan Keprofesional Berkelanjutan (P2KB). *J Indon Med Assoc.* 63 (3) : 112-116
- Riskesdas. (2013). Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan
- Raji, Y., Udoh, U., Oluwadar, O., Akinsomisoye, O., Awobajo, O., Adeshoga, K. (2002). Anti-inflammatory and analgesic properties of the Rhizome extract of *Zingiber officinale*. *African Journal of Biomedical Research.* 5: 121-124
- Rosenbergh, A. E. (2013). *Buku Ajar Patologi Robbin: Tulang, sendi dan tumor jaringan lunak.* (Gumay, S, Penerjemah). Dalam Kumar, V., Abbas, A.K., & Aster, J.C. (Editor). Edisi kesembilan. 753-783. Singapore:Elsevier Saunders
- Scally, S.W., Petersen, J., Law, S.C., Dudek, N.L., Nei, H.J., Loh, K.L., et al. (2013). A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus. citrullination. and rheumatoid arthritis. *Journal Exp. Med.* Vol 210 (12):2569-82
- Schuna, A.A. (2005). *Pharmacotherapy, A pathophysiologic approach : Rheumatoid arthritis.* In Dipiro, J.T., Talbert, R.L., Yees, G.C., Matzke, G.R., Wells, B.G & Posey, L.M. (Ed). Sixth edition. Mc Graw-Hill company. 1670-1682
- Sen, M. (2005). Wnt signaling in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 44(6): 708-713. Downloaded from <http://rheumatology.oxfordjournals.org/> by guest on October 10, 2015.
- Setiawan, A.A., Padaga, M.C., & Aulanni'am. (2012). *Pengaruh pemberian ekstrak air buah kesemek (Diospyros kaki L.f.) terhadap kadar interleukin 8 (IL-8) dan Gambaran Histopatologi jaringan Sendi Tikus (Rattus novergicus) Arthritis.* Program Studi Pendidikan Dokter Hewan. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya.
- Setiyohadi, B. (2009). *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam : Struktur dan metabolisme tulang.* Dalam Sudoyo, dkk., (editor). Jilid III. Edisi V. pp 2385-2401. Jakarta : Interna Publising.
- Sherwood, L. (2010). *Fundamentals of Physiology.* (4 editions). eBook. USA : Cengage Learning. pp 297-344
- Sinaga, E. (2012). *Biokimia Dasar.* Jakarta: PT. ISFI Penerbitan. pp. 331-350
- Singh, S.B., Devi, W.R., Marina., Devi, W.I., Swapana, N., & Singh, C.B. (2013). Ethnobotany. phytochemistry and pharmacology of *Ageratum conyzoides* Linn (Asteraceae). *Journal of Medical Plants Research.* Vol. 7(8) : 371-385.
- Smith, M. (2011). The normal synovium. *The Open Rheumatology Journal.* 5:100-106 (Suppl 1:M2)
- So, A., Chamot, M., Peclat, V., Gerster, J.C. (1999). Serum MMP-3 in rheumatoid arthritis: Correlation with systemic inflammation but not with erosive status. *Rheumatology.* 38 (5): 407-410

- Spitalnik, P.F. (2014). *Histology laboratory manual 2015-2016*. Collage of Physicians and Surgeons Columbia University. pp 92-98.
- Stevenson, C.S., Marshal, L.A., and Morgan, D.W. (2006). *In Vivo Models of Inflammation*. 2th edition. Vol. 1. Berlin : Birkhauser verleg.
- Stolina, M., Adamu, S., Ominsky, M., Dwyer, D., Asuncion, F., Geng, Z., et al. (2005). RANKL is a marker and mediator of local n systemic bone loss in two rat models of inflammatory arthritis. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol 20 (10) : 1756-65
- Suarjana, I. N. (2009). *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam:Artritis reumatoid*. Dalam Sudoyo. dkk., (editor). Jilid III. Edisi V. pp 2495-2513. Jakarta : Interna Publising.
- Supardi, S., dan Surahmah. (2014). *Metodologi penelitian untuk mahasiswa farmasi*. Jakarta : Trans Info Media. pp 55-59
- Suzuki, Y., Tsutsumi, Y., Nakagawa, M., Suzuki, H., Matsushita, K., Beppu, M., et al. (2001). Osteoclast-like cells in an vitro model of bone destruction by rheumatoid synovium. *Rheumatology*. 40:673-682
- Theofilopoulos, A.N., & Bona, C.A. (2002). *Rheumatoid arthritis in The Molecular Pathology of Autoimmune Disease*. (Second edition). New York: Taylor – Francis
- Tian, H., & Cronstein, B. N. (2007). Understanding the mechanisms of action of methotrexate. Implication for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*. 65 (3):168-73
- Tortora, G.J., & Derrickson, B. (2012). *Principles of anatomy & physiology*. 13 edition. New York : John Wiley & Sons. Inc.
- Udagawa, N., Kotake, S., Kamatani, N., Takahashi, N., & Suda, T. (2002). The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 4 (5) :281-289
- Wang, M., Zhu, S., Peng, W., Li, Q., Luo, M., Feng, X., et al. (2014). Sonic Hedgehog Signaling Drives Proliferation of Sinoviocytes in RA : A Possible Novel Theurapeutic Target. *Journal of Immunology Research*. Hindawi Publising Cooperation
- Wang.,Y.C., and Chiang, E.P. (2012). Low- Dose Methotrexate inhibit Methionine S-Adenosyl transferase in vitro and in vivo. *Molecular Medicine* 18(3) :423-432
- Wells, B.G., Dipiro, J.T., Schwinghammer, T.L., & Dipiro, C.V. (2009). *Pharmacotherapy Handbook*. .Seventh edition. 31-41. Mc Graw Hill Medical.

Woode, E., Ainooson, G.K., Gyasi, E.B., Ansah, C., Obiri, D.D., Koffour, G.A., et al. (2008). Anti-arthritic and antioxidant properties of the ethanolic stem bark extract of *Newboldia laevis* (P. Beauv.) Seaman ex Bureau (Bignoniaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*. Vol.2 (8): 180-188

World Health Organization. (2015). *Chronic rheumatic condition*. Departement of Chronic Disease and Health Promotion Chronic Respiratory Disease and Arthritis. Diunduh 21 April 2015. [http : // www.who.int/chp/topics/rheumatic/en](http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en)



LAMPIRAN



Lampiran 1. Sertifikat Determinasi Daun Babadotan (*Ageratum conyzoides* L.)



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(RESEARCH CENTER FOR BIOLOGY)
Cibinong Science Center, Jl. Raya Jakarta - Bogor KM. 46 Cibinong 16911
Telp. (+62 21) 87907636 - 87907604, Fax. 87907612
Website: www.biologi.lipi.go.id



Cibinong, 28 Januari 2016

Nomor : 206/IPH.1.01/H.07/I/2016
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(t). **Riri Nulul Suci**
 Mhs. Univ. Indonesia

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Datin Babadotan	<i>Ageratum conyzoides</i> (L.) L.	Compositae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

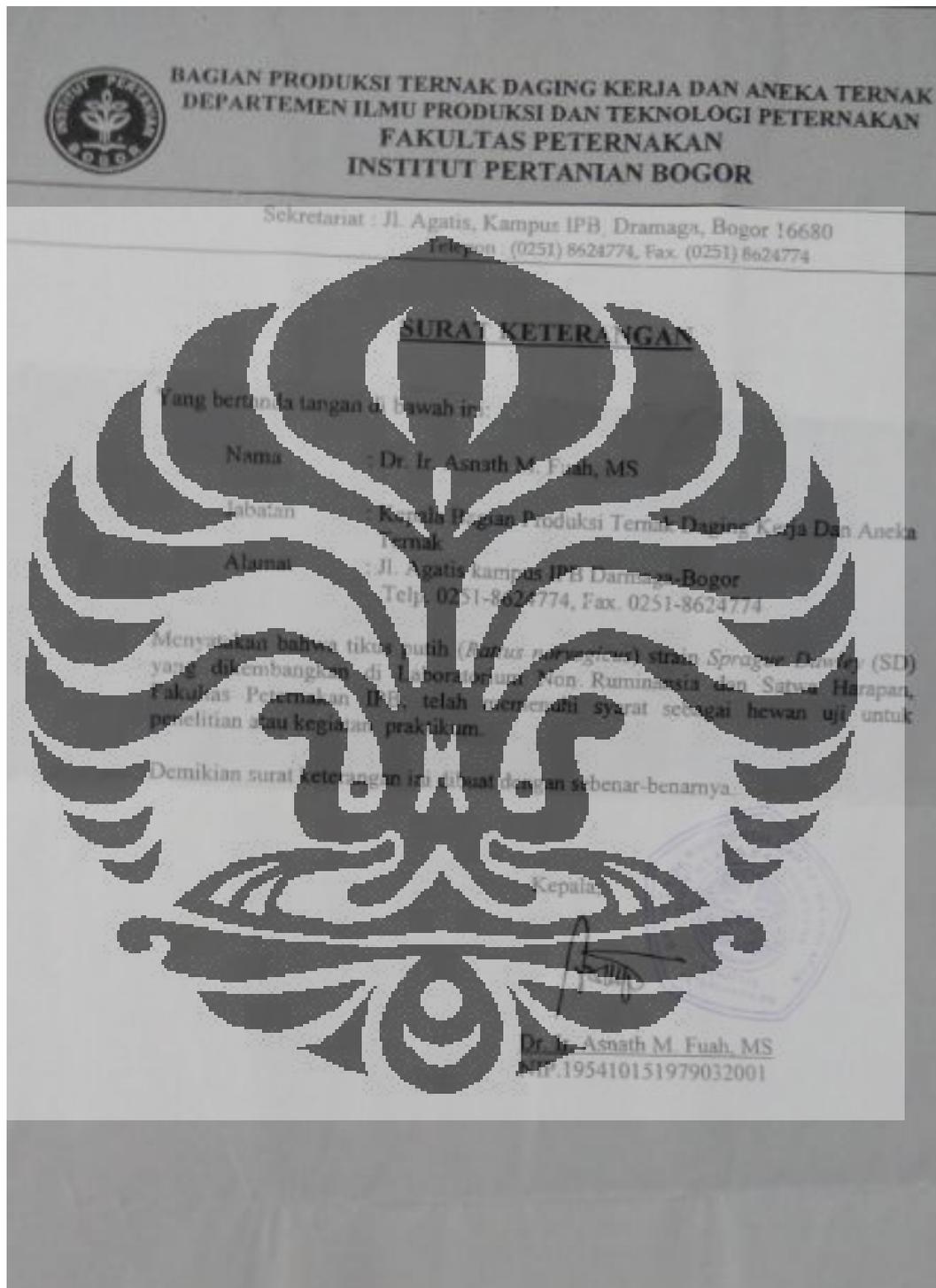


Kepala Bidang Botani
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,
 Dr. Joeni Setijo Rahajoe
 NIP. 196706241993032004

D:\Ident 2016\Riri Nulul Suci.doc\Deni-Dg

Page 1 of 1

Lampiran 2. Sertifikat Hewan uji (Tikus)

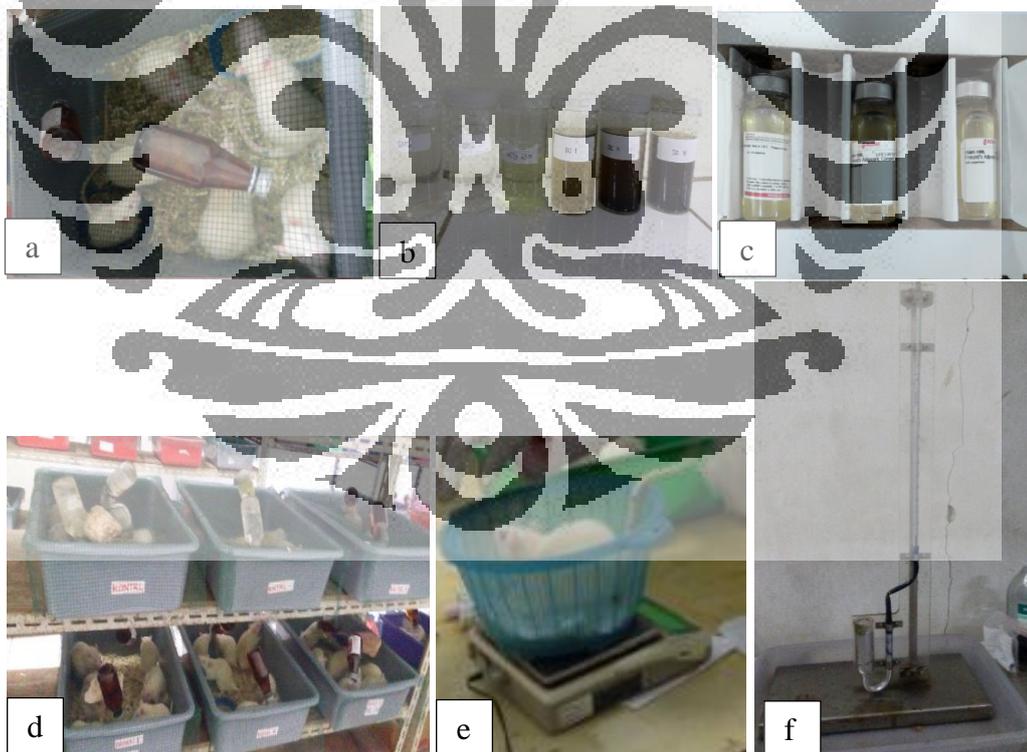


Lampiran 3. Komposisi pakan *Rattus norvegicus*

Pakan CP 512. Produksi PT. Charden Pokphand Indonesia. Jl Raya Serang Km.30 Desa Cangkudu Kecamatan Balaraja Kabupaten Tangerang Barat.

Analisis Pakan tikus	Persentase per 100 gr (%)
Kadar air	Max 13.0
Protein	19 – 21
Lemak	5.0
Serat	5.0
Abu	7.0
Calcium	0.9
Phosphor	0.6
Met. Energi	3000 – 3100 Kkal /kg

Lampiran 4. Hewan uji dan alat yang digunakan dalam penelitian



Keterangan : (a) Hewan uji (Tikus); (b) Bahan uji Perlakuan; (c) CFA (*Complete Freund's adjuvant*); (d) Kandang Tikus ; (e) Timbangan tikus; (f) Plestimometer

Lampiran 5. Surat Lolos Kaji Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Gedung Fakultas Kedokteran UI
Jl. Salemba Raya No.6, Jakarta 10430
PO.Box 1358
T. 62.21.3912477, 31930371, 31930373,
3922977, 3927360, 3153236,
F 62 21 3912477, 31930372, 3157288,
E. humas@fk.ui.ac.id, office@fk.ui.ac.id
fk.ui.ac.id

 UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Nomor: 75 /UN2.F1/ETIK/2016

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research protocol entitled:

"Uji Efektivitas Anti-Artritis Reumatoid Ekstrak Etanol Daun Babandotan (*Ageratum conyzoides L.*) pada Tikus Putih yang Diinduksi Complete Freund's Adjuvant".

Peneliti Utama : dr. Erna Harfiani
Principal Investigator

Nama Institusi : Fakultas Farmasi Universitas Indonesia
Name of the Institution

dan telah menyetujui protokol tersebut di atas.
And approved the above-mentioned protocol.

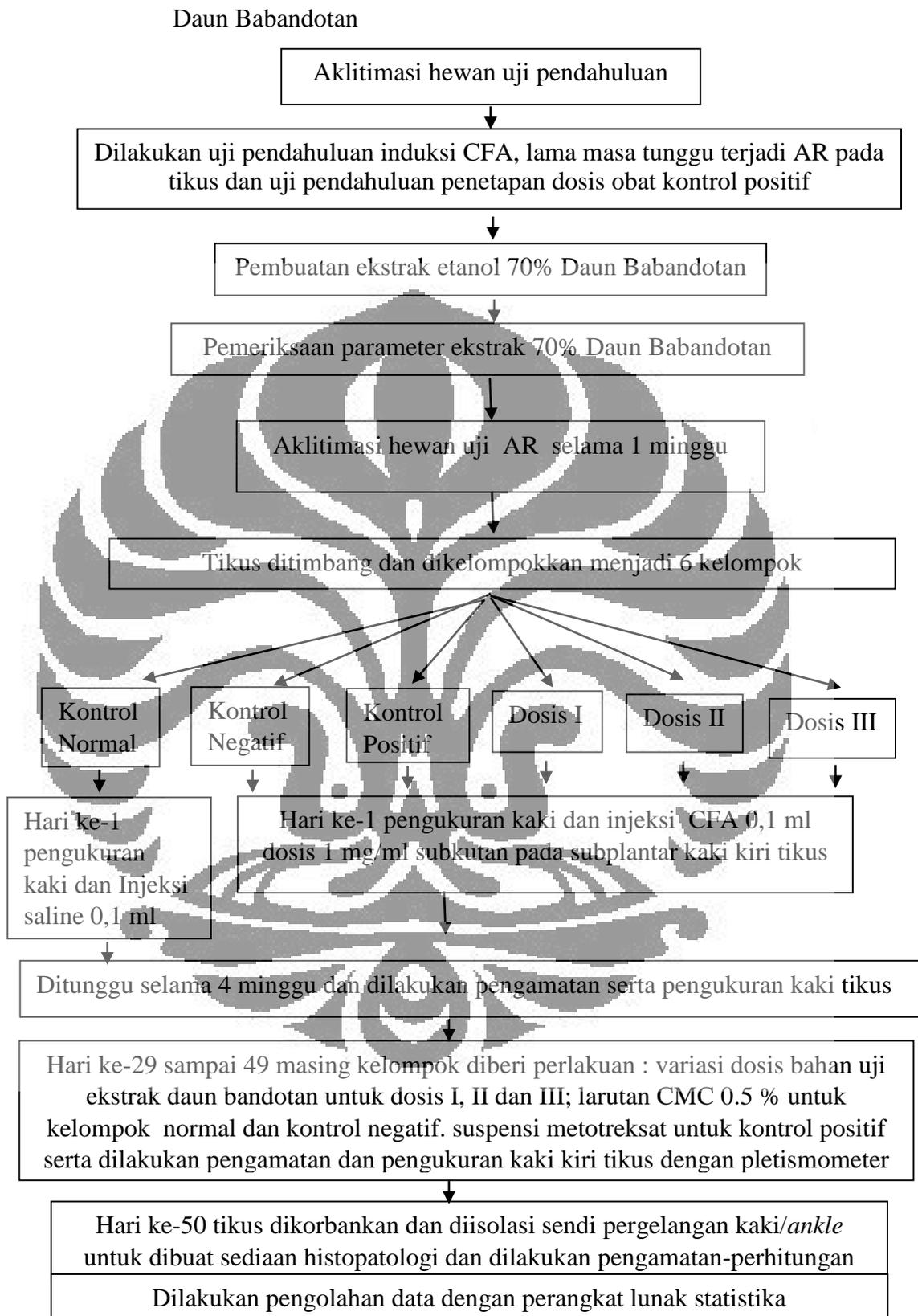

Ketua
Keputusan
Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy, SpFK

**Ethical approval berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan*
***Peneliti berkewajiban*

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian
2. Memberitahukan status penelitian apabila
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical clearance* harus diperpanjang
 - b. Penelitian berhenti di tengah jalan
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*)
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*

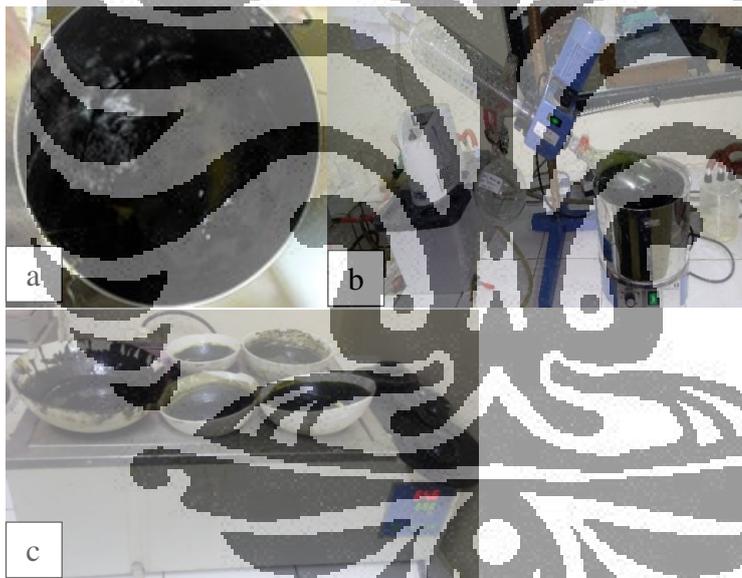
Semua prosedur persetujuan dilakukan sesuai dengan standar ICH-GCP.
All procedures of Ethical Approval are performed in accordance with ICH-GCP standard procedure.

Lampiran 6. Alur skema penelitian anti-arthritis rematoid ekstrak etanol 70%
Daun Babandotan



Lampiran 7. Tanaman Babandotan (*Ageratum conyzoides* L.)

Keterangan : (a) Simplisia kering tanaman babandotan; dan (b) Simplisia kering daun babandotan;
(c) Serbuk kering daun babandotan

Lampiran 8. Alat yang digunakan dalam ekstraksi daun babandotan

Keterangan : (a) Panci maserasi; (b) Rotary evaporator; (c) waterbath

Lampiran 9. Sertifikat Analisis etanol 70%

 **PT. BRATACO**

HASIL PEMERIKSAAN

Nama Bahan : Alcohol Antiseptic 70%
 No Batch : 870151102
 Ex : Brataco
 E.D : 11/2018
 No Reg : PKD 20501900236

<u>Jenis Pemeriksaan</u>	<u>Syarat FI IV</u>	<u>Hasil</u>
Pemerian	Cairan jernih, mudah menguap, tidak berwarna, bau khas, mudah terbakar	sesuai
Kelarutan	Bercampur dengan air dan hampir bercampur dengan semua pelarut organik	sesuai
Indeks bias	1.36 – 1.365	1.361
Berat Jenis	0.8787 – 0.886	0.87922 g/ml
Kadar	69.9 – 72%	71.75 %
Mengandung BKC 80%	± 0.05 %	0.05 %

Kesimpulan Memenuhi syarat

Cikarang, 10 – 11 – 2015

Pemeriksa 
 Charisman, S. Far, Apt.

Penanggung Jawab 
 Dita Mardani
 Labker

STPA 19560421/STPA/ITB/1664/20192

HEAD OFFICE : J. Cidang Barat No. 78, Jakarta Pusat 10150, Telp. (021) 35227281, Faks. (021) 754-4011, 35227234, E-mail : brataco@brataco.com
 BRANCH OFFICE :
 • JAKARTA : J. Mangga Besar V No.5, Jakarta 10190 Telp. (021) 62901157, Faks. (021) 62924444
 • BANDUNG : J. Suryawati Raya No. 22, Telp. No. 6, Jakarta 10140 Telp. (021) 45848992-64 Fax. (021) 4232016
 • BANDUNG : Jl. Cihangsih No. 8, Bandung Telp. (022) 6078229-6030608 Fax. (022) 6031979
 • BANDUNG : Jl. Hutan Jakarta No. 77G, Bandung Telp. (022) 7105277, 7210308-306 Fax. (022) 7210310
 • SEMARANG : Jl. B. Gajah Mada No. 14 Telp. (024) 646272, 645999 Fax. (024) 6414990
 • YOGYAKARTA : Jl. Brawijaya No. 45, Yogyakarta (0274) 643440, 643440 Fax. (0274) 643449
 • SURABAYA : Jl. Tidar No. 88, Surabaya Telp. (031) 5322097, 5325507 Fax. (031) 5310485
 • MEDAN : Jl. Iskandar Muda No. 40 B, Medan Telp. (061) 4144272-4231159 Fax. (061) 4525698
 SUB BRANCH OFFICE : TANGERANG, BOGOR, CIKARANG, CIREBON, TASIKMALAYA, SOLO, PURWOREJO, TEGAL, MALANG, SIDOARJO, DENPASAR, PALEMBANG, MAKASSAR

The National Chemical and Ingredients Distributor

Lampiran 10. Penghitungan dosis dan pembuatan suspensi ekstrak daun Babandotan

2.1 Penghitungan dosis harian ekstrak daun babandotan per 200 g bb tikus:

- a. Dosis I : $200 \text{ mg /kg bb} \times 200 \text{ g/1000 g} = 40 \text{ mg}$
 b. Dosis II : $400 \text{ mg /kg bb} \times 200 \text{ g/1000 g} = 80 \text{ mg}$
 c. Dosis III : $800 \text{ mg /kg bb} \times 200 \text{ g/1000 g} = 160 \text{ mg}$

Randemen pada penelitian ini adalah 16,2 % dan variasi dosis ekstrak daun babandotan akan diberikan secara peroral pada tikus dengan menggunakan sonde sebanyak 2 mL

1. Dosis I

Berat dosis I yang ditimbang = $40 \text{ mg} \times 16,2/100 = 6,48 \text{ mg}$

Volume pemberian ekstrak babandotan adalah 2 mL, maka $6,48 \text{ mg}/2 \text{ mL} = 3,24 \text{ mg/mL}$. Volume yang dibuat sebanyak 20 mL, maka berat ekstrak yang ditimbang $20 \text{ mL} \times 3,24 \text{ mg/mL} = 64,8 \text{ mg}$. Maka 64,8 mg ekstrak disuspensi dalam larutan CMC 0,5 % hingga 20 mL.

2. Dosis II

Berat dosis II yang ditimbang = $80 \text{ mg} \times 16,2/100 = 12,96 \text{ mg}$

Volume pemberian untuk ekstrak babandotan adalah 2 mL, maka $12,96 \text{ mg}/2 \text{ mL} = 6,48 \text{ mg/mL}$. Volume yang dibuat sebanyak 20 mL, maka berat ekstrak yang ditimbang $20 \text{ mL} \times 6,48 \text{ mg/mL} = 129,6 \text{ mg}$. Maka 129,6 mg ekstrak disuspensi dalam larutan CMC 0,5 % hingga 20 mL.

3. Dosis III

Berat dosis yang ditimbang = $160 \text{ mg} \times 16,2/100 = 25,92 \text{ mg}$

Volume pemberian untuk ekstrak babandotan adalah 2 mL, maka $25,92 \text{ mg}/2 \text{ mL} = 12,96 \text{ mg/mL}$. Volume yang akan dibuat sebanyak 20 mL, maka berat ekstrak yang ditimbang $20 \text{ mL} \times 12,96 \text{ mg/mL} = 259,2 \text{ mg}$. Maka 259,2 mg ekstrak disuspensi dalam larutan CMC 0,5 % hingga 20 mL.

2.2 Cara pembuatan suspensi ekstrak babandotan dalam 20 mL adalah sebagai berikut :

- Timbang serbuk CMC 0,1 g
- Disiapkan akuades hangat
- Disiapkan ekstrak yang ditimbang sesuai perhitungan dosis
- Akuades panas dituangkan sedikit (5 mL) pada lumpang pengaduk lalu CMC disebar dan dibiarkan sampai mengembang.(sekitar 10 menit) lalu diaduk sampai CMC homogen
- Ekstrak babandotan dimasukkan ke lumpang yang berisi CMC dan diaduk sambil ditambahkan akuades sampai homogen
- Hasil suspensi dimasukkan ke breaker glass dan di-add akuades sampai 20 mL.

Lampiran 11. Pembuatan larutan Metotreksat

Dosis yang dipergunakan dalam penelitian adalah 0,05 mg/200 g bb per sonde dan diberikan dalam 2 ml. Larutan metotreksat yang dibuat sebanyak 20 mL perhari. Dalam sediaan pertablet metotreksat mengandung 2,5 mg larutan NaCl 0,9% (FI, 1995).

Maka untuk tiap kali pemberian metotreksat dibutuhkan adalah :

$$\left(\frac{\text{Dosis metotreksat perkali pemberian}}{\text{Kandungan metotreksat dalam 1 tablet}} \right) \times \text{bobot 1 tablet metotreksat}$$

$$= \frac{0,05 \text{ mg}}{2,5 \text{ mg}} \times 120 \text{ mg} = 2,4 \text{ mg. Jadi didapatkan } 0,05 \text{ mg metotreksat dalam } 2,4 \text{ mg.}$$

Volume untuk 1 tikus adalah 2 ml sehingga jika membuat larutan metotreksat sebanyak 20 ml (untuk 6 tikus) maka : $\frac{2,4 \text{ mg}}{2 \text{ mL}} \times 20 \text{ mL} = 24 \text{ mg}$

Jadi metotreksat yang ditimbang untuk dosis 0,05 mg adalah 24 mg yang dilarutkan sampai homogen dalam 20 ml larutan normal salin.

Lampiran 12. Cara penghitungan volume edema dan % Penghambatan udem rata-rata pada kaki tikus

Cara penghitungan volume edema pada kaki tikus :

Volume edema kaki hari ke-x = volume telapak kaki (hari ke-x-hari ke-1) x 0,1 mL

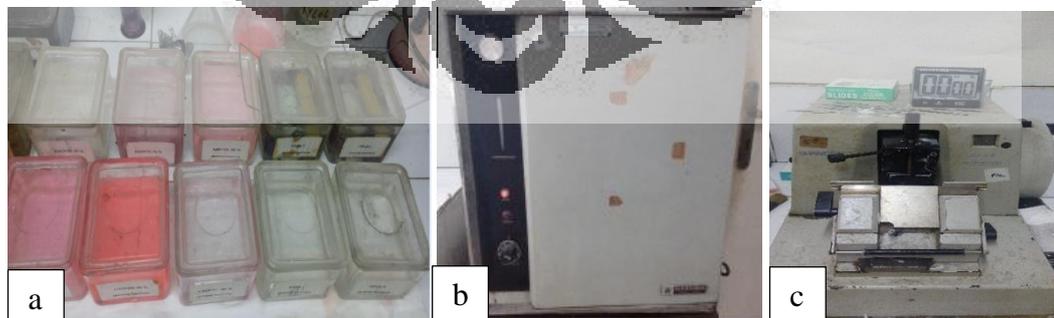
Cara penghitungan % Penghambatan udem rata-rata pada kaki tikus (awad et al., 2013) :

$$\% \text{ Penghambatan udem rata-rata} = 100 \times \left\{ 1 - \left(\frac{a-x}{b-y} \right) \right\}$$

Keterangan :

- a adalah volume rata-rata telapak kaki tikus setelah diinduksi pada kelompok tikus yang diberi obat
- x adalah volume rata-rata telapak kaki tikus sebelum diinduksi pada kelompok tikus yang diberi obat
- b adalah volume rata-rata telapak kaki tikus setelah diinduksi pada kelompok tikus yang tidak diberi obat (kontrol negatif)
- y adalah volume rata-rata telapak kaki tikus sebelum diinduksi pada kelompok tikus yang tidak diberi obat (kontrol negatif)

Lampiran 13. Alat yang digunakan saat pembuatan sediaan Histopatologi

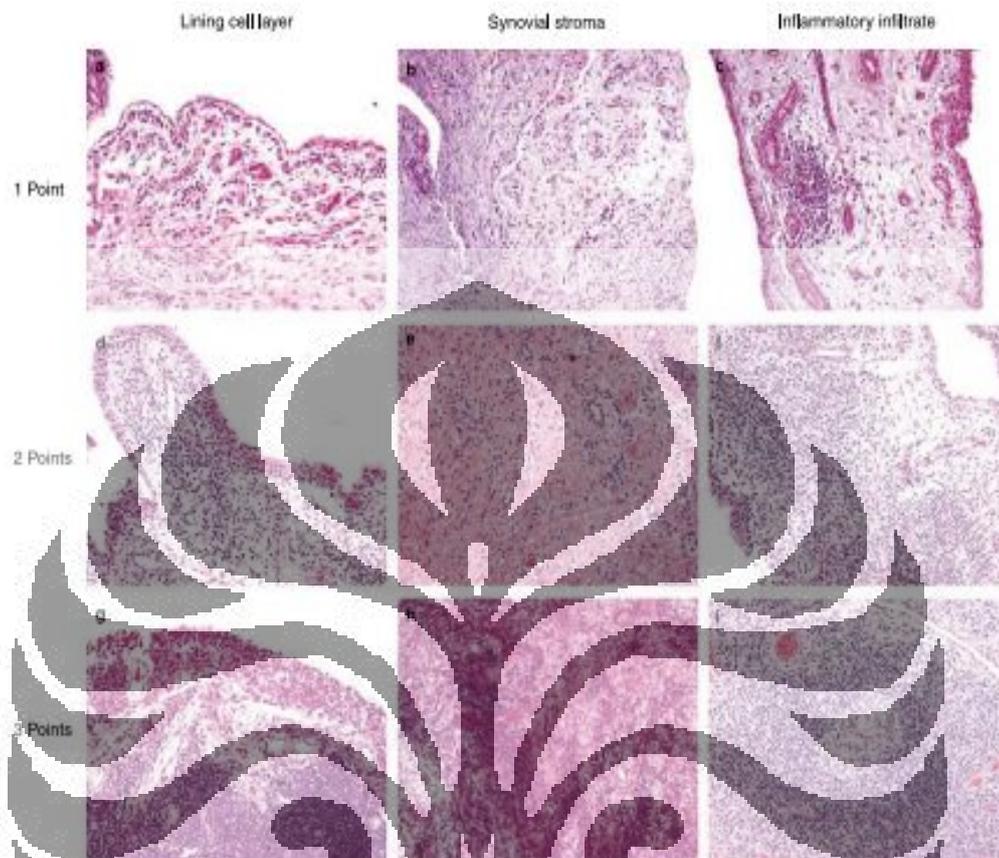


Keterangan : (a) Bak pembuatan dan pewarnaan preparat; (b) Oven; (c) Mikrotom putar

Lampiran 14. Tabel skoring gambaran histopatologis sinovitis kronik
(Krenn et al., 2006)

1. Pelebaran sel lining lapisan sinovial		
Skor 0	Sel lining membentuk 1 lapisan	
Skor 1	Sel lining membentuk 2-3 lapisan	
Skor 2	Sel lining membentuk 4-5 lapisan. dapat ditemukan beberapa sel <i>multinucleated</i>	
Skor 3	Sel lining membentuk > 5 lapisan. dapat dengan ulserasi. dapat ditemukan sel <i>multinucleated</i>	
2. Kepadatan sel menetap (<i>resident cells</i>)		
Skor 0	Kepadatan sel di stroma sinovial normal	
Skor 1	Kepadatan sel di stroma sinovial meningkat sedikit	
Skor 2	Kepadatan sel di stroma sinovial meningkat sedang. dapat ditemukan beberapa sel <i>multinucleated</i>	
Skor 3	Kepadatan sel di stroma sinovial meningkat banyak. dapat ditemukan sel <i>giant multinucleated</i> . formasi pannus. reumatoid granuloma dapat ditemukan	
3. <i>Inflammatory infiltrate</i>		
Skor 0	Tidak ada <i>Inflammatory infiltrate</i>	
Skor 1	Terdapat sedikit limfosit dan sel plasma	
Skor 2	Terdapat banyak limfosit dan sel plasma. kadang membentuk <i>follicle-like aggregates</i>	
Skor 3	<i>Dense band-like inflammatory infiltrate</i> . atau membentuk <i>follicle-like aggregates</i> yang besar	
Jumlah	Total 0-1	Bukan sinovitis
	Total 2-4	Sinovitis derajat rendah
	Total 5-9	Sinovitis derajat tinggi (Arthritis reumatoid)

Gambaran histopatologi membran sinovial berdasarkan skor sinovitis yang meliputi lapisan lining sel, stroma sinovial dan infiltrasi sel radang (Krenn et al., 2006).



Lampiran 15. Alat pemeriksaan Sediaan histopatologi



Keterangan : Mikroskop olympus (IX 73 Inverted Microscope)

Lampiran 16. Sertifikat Analisis CFA (*Complete Freund's adjuvant*)

SIGMA-ALDRICH sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Website: www.sigmaaldrich.com
 Email USA: techserv@sial.com
 Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name: Freund's Adjuvant, Complete - cell suspension

Product Number: F5881

MDL: MFCD00131105

Storage Temperature: 2 - 8 °C

TEST	Specification
Appearance (Color)	Light Yellow to Yellow
Appearance (Form) with particulates	Liquid
Appearance (Turbidity)	Clear to Slightly Hazy
Emulsification	Pass
Forms emulsion with 0.85% NaCl	

Note: Each mL contains 1 mg *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, ATCC 25177, heat-killed and dried, 0.85 mL paraffin oil and 0.15 mL mannide monooleate.

Specification: FFD.1.ZCS.10000016267

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

1 of 1

Lampiran 17. Hasil pengujian sisa residu pestisida dari LPPM UI


Laboratorium Pengujian mutu Obat, Makanan dan Kosmetik
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS INDONESIA
 Kampus UI Depok, Telp. 021-7270031 ext. 303, Fax. 021-78849004
 E-mail: ppm@farmasi.ui.ac.id

KETERANGAN HASIL PEMERIKSAAN
No. Pemeriksaan : 294/LF/V/2016

Nama contoh	: Ekstrak Daun Bandotan 70% Etanol
Produksi	: -
Nomor Kode/Batch	: -
Wadah	: -
Bentuk	: Vial
Asal Contoh	: Cairan
Jenis Pemeriksaan	: Ibu. Erna Harfiani
Hasil Pemeriksaan	: Uji Etanol
Pemerian	: Cairan berwarna kecoklatan
Uji Etanol	: Negatif (metode: GC)

Depok, 19 Mei 2016
 Kepala Laboratorium PPMOMK

 Prof. Dr. Hamita, Apt.
 NIP. 195107211979031003

Sampling diluar tanggung jawab kami
 Surat Keterangan Hasil Pemeriksaan ini tidak boleh disalin atau di gandakan,
 tanpa persetujuan dari Laboratorium Mutu FF-UI

Lampiran 18. Hasil Skrining fitokimia Biofarmaka Bogor



LABORATORIUM PUSAT STUDI BIOFARMAKA

LPPM - INSTITUT PERTANIAN BOGOR
 Jl. Taman Kencana No. 03 Bogor 16151
 Telp/Fax: +62-251-8373561/ +62-251-8347525;
 website: www.biofarmaka.or.id; Email: bfarmaka.lub@gmail.com

LAPORAN HASIL UJI

No. (sertifikat) 405.025/LPSB IPB/V/16

No Order : 031/V
 Nama / Instansi : Erna Harfiani / Universitas Indonesia
 Alamat : Depok
 Jenis analisis : Fitokimia, Flavonoid dan Kadar Tanin
 Tanggal Terima : 20 Mei 2016
 Tanggal pengujian : 26 Mei 2016

Nama Sampel	Identitas & keadaan sampel	Parameter	Hasil	Satuan	Teknik Analisis	
Ekstrak Etanol Daun Babandotan	Ekstrak - Padatan	Fitokimia:				Visualisasi Warna
		Flavonoid	positif	-	Spektrofotometri	
		Alkaloid	positif	-		
		Wagner	positif	-		
		Mayer	positif	-		
		Tanin	positif	-	Titrimetri	
		Dragendorff	positif	-		
		Saponin	positif	-	Spektrofotometri	
		Quinon	negatif	-		
		Steroid	positif	-	Titrimetri	
Triterpenoid	negatif	-				
Flavonoid	2.31	% (b/b)	Spektrofotometri			
Tanin	0.32	%				

Keterangan:

Bogor, 13 Juni 2016

Manajer Teknis

PUSAT STUDI
 BIOFARMAKA
 LPPM IPB

Rudi Heryanto, MSi

NIP. 19760428 200501 1002

Hasil pengukuran /pengujian hanya berhubungan dengan barang yang diuji
 Dilarang memperbayak Laporan hasil uji tanpa persetujuan tertulis dari Laboratorium Pusat Studi Biofarmaka, LPPM IPB

LPSB IPB-IV.25.2

Lampiran 19. Tabel volume telapak kaki tikus pada hari ke-1 (sebelum induksi), 29, 35, 46, dan 50 setelah diinduksi oleh 0,1 ml CFA pada semua kelompok perlakuan kecuali kontrol normal.

Kelompok	Tikus Nomor	Volume telapak kaki (ml) Hari ke-				
		1	29	36	43	50
Kontrol Normal	1	2.20	2.30	2.30	2.20	2.20
	2	1.80	2.00	1.90	2.00	2.00
	3	1.90	2.00	2.00	2.00	1.90
	4	1.80	1.90	1.90	1.90	1.90
	5	2.20	2.20	2.40	2.40	2.40
	Rata	1.98	2.08	2.10	2.10	2.08
	Sd	0.20	0.16	0.23	0.20	0.22
Kontrol Negatif	1	2.20	4.40	4.40	4.40	4.40
	2	2.20	3.90	3.80	3.70	3.60
	3	1.90	4.10	3.90	3.90	3.90
	4	1.80	3.60	3.70	3.70	3.70
	5	1.90	3.70	3.70	3.80	3.80
	Rata	2.00	3.94	3.90	3.90	3.88
	Sd	0.19	0.32	0.29	0.29	0.31
Kontrol Positif	1	2.20	4.60	4.30	3.40	3.00
	2	2.00	3.90	3.60	3.20	3.10
	3	1.60	3.20	2.90	2.90	2.90
	4	2.20	3.50	3.30	2.40	2.20
	5	1.60	3.20	3.00	2.90	2.80
	Rata	1.92	3.68	3.42	2.96	2.80
	Sd	0.30	0.59	0.56	0.38	0.35
Dosis I	1	2.30	4.00	4.00	3.90	3.80
	2	2.20	3.80	3.70	3.60	3.50
	3	2.30	3.90	3.80	3.40	3.00
	4	2.00	3.90	3.70	3.40	3.30
	5	1.90	3.80	3.70	3.30	3.30
	Rata	2.14	3.88	3.78	3.52	3.38
	Sd	0.18	0.08	0.13	0.24	0.29
Dosis II	1	2.20	3.80	3.70	3.40	3.20
	2	2.10	4.10	4.00	3.90	3.70
	3	1.90	3.90	3.70	3.40	3.30
	4	2.00	3.70	3.50	3.20	3.10
	5	2.00	3.70	3.50	3.20	3.00

(Lanjutan)

	Rata	2.04	3.84	3.68	3.42	3.26
	Ss	0.11	0.17	0.20	0.29	0.27
Dosis III	1	2.20	4.00	3.80	3.60	3.30
	2	2.40	3.90	3.80	3.60	3.40
	3	2.00	4.00	3.70	3.50	3.30
	4	2.20	3.50	3.50	3.40	3.20
	5	2.00	3.80	3.50	3.40	3.10
	Rata	2.16	3.84	3.66	3.50	3.26
	SD	0.17	0.21	0.15	0.10	0.11

Keterangan :N= kontrol normal = CMC 0.5 %; KN=kontrol negatif = CMC 0.5 %; KP=kontrol positif = metotrexat 0.05 mg/200 g bb; Dosis I = bahan uji ekstrak daun babandotan 40 mg/200 g bb; Dosis II = bahan uji ekstrak daun babandotan 80 mg/200 g bb; Dosis III = bahan uji ekstrak daun babandotan 160 mg/200 g bb.

Tabel volume edema kaki tikus pada hari ke-1 (sebelum induksi), 29, 35, 46, dan 50 setelah diinduksi oleh 0,1 ml CFA pada semua kelompok perlakuan kecuali kontrol normal.

Kelompok	Ulangan	Volume Edema Kaki (ml)			
		Hari-29	Hari-36	Hari-43	Hari-50
N	1	0.10	0.10	0.00	0.00
	2	0.20	0.10	0.20	0.20
	3	0.10	0.10	0.10	0.00
	4	0.10	0.10	0.10	0.10
	5	0.00	0.20	0.20	0.20
	Rata	0.10	0.12	0.12	0.10
	Sd	0.07	0.04	0.08	0.10
KN	1	2.20	2.20	2.20	2.20
	2	1.70	1.60	1.50	1.40
	3	2.20	2.00	2.00	2.00
	4	1.80	1.90	1.90	1.90
	5	1.80	1.80	1.90	1.90
	Rata	1.94	1.90	1.90	1.88
	Sd	0.24	0.22	0.25	0.29
KP	1	2.40	2.10	1.20	0.80
	2	1.90	1.60	1.20	1.10
	3	1.60	1.30	1.30	1.30
	4	1.30	1.10	0.20	0.00
	5	1.60	1.40	1.30	1.20

Universitas Indonesia

(Lanjutan)

	Rata	1.76	1.50	1.04	0.88
	Sd	0.42	0.38	0.47	0.53
Dosis I	1	1.70	1.70	1.60	1.50
	2	1.60	1.50	1.40	1.30
	3	1.60	1.50	1.10	0.70
	4	1.90	1.70	1.40	1.30
	5	1.90	1.80	1.40	1.40
	Rata	1.74	1.64	1.38	1.24
	Sd	0.15	0.13	0.18	0.31
Dosis II	1	1.60	1.50	1.20	1.00
	2	2.00	1.90	1.80	1.60
	3	2.00	1.80	1.50	1.40
	4	1.70	1.50	1.20	1.10
	5	1.70	1.50	1.20	1.00
	Rata	1.80	1.64	1.38	1.22
	Sd	0.19	0.19	0.27	0.27
Dosis III	1	1.80	1.60	1.40	1.10
	2	1.50	1.40	1.20	1.00
	3	2.00	1.70	1.50	1.30
	4	1.30	1.30	1.20	1.00
	5	1.80	1.50	1.40	1.10
	Rata	1.68	1.50	1.34	1.10
	Sd	0.28	0.16	0.13	0.12

Keterangan : N=Kontrol normal = CMC 0.5 %; KN=kontrol negatif = CMC 0.5 %; KP=kontrol positif = metotreksat 0.05 mg/200 g bb; Dosis I = bahan uji ekstrak daun babandotan 40 mg/200 g bb; Dosis II = bahan uji ekstrak daun babandotan 80 mg/200 g bb; Dosis III = bahan uji ekstrak daun babandotan 160 mg/200 g bb.

Tabel Perbandingan ada tidaknya perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan menurut hasil uji statistik berdasarkan volume edema kaki tikus

Kelompok	Kelompok	Hari-29	Hari-36	Hari-43	Hari-50
Kontrol Normal	Kontrol negatif	+	+	+	+
	Kontrol positif	+	+	+	+
	Dosis I	+	+	+	+
	Dosis II	+	+	+	+
	Dosis III	+	+	+	+
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	-	-	+	+
	Dosis I	-	-	+	+
	Dosis II	-	-	+	+
	Dosis III	-	+	+	+
Kontrol Positif	Dosis I	-	-	-	-
	Dosis II	-	-	-	-
	Dosis III	-	-	-	-
Antar Kelompok Dosis	Dosis I << Dosis II	-	-	-	-
	Dosis I << Dosis III	-	-	-	-
	Dosis II << Dosis III	-	-	-	-

Keterangan: (+) = Terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$); (-) : Tidak ada perbedaan bermakna

1. Uji statistik volume edema kaki tikus seluruh kelompok uji pada hari ke-29
 - 1.1 Uji Normalitas (Uji Saphiro-Wilk) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-29
 - a. Tujuan : mengetahui kenormalan data sebagai syarat untuk uji ANAVA
 - b. Hipotesis : H_0 = Data volume edema kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi normal
 H_a = Data volume edema kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi normal
 - c. Kriteria uji : Sig < 0.05 berarti H_0 ditolak dan bila Sig > 0.05 berarti H_0 diterima
 - d. Hasil

	Kelompok	Sig.	Shapiro-Wilk	
			Hipotesis	Kesimpulan
Hari ke - 29	Kontrol Normal	0.325	Ho Diterima	Terdistribusi Normal
	Kontrol Negatif	0.071	Ho Diterima	Terdistribusi Normal
	Kontrol Positif	0.617	Ho Diterima	Terdistribusi Normal
	Dosis I	0.086	Ho Diterima	Terdistribusi Normal
	Dosis II	0.111	Ho Diterima	Terdistribusi Normal
	Dosis III	0.656	Ho Diterima	Terdistribusi Normal

- a. Kesimpulan : Sig > 0.05 sehingga **Ho diterima**. berarti data volume edema kaki tikus terdistribusi **normal**

(Lanjutan)

1.2 Uji Homogenitas (Uji Levene) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-29

- Tujuan: Untuk mengetahui homogenitas sebagai syarat untuk uji ANAVA
- Hipotesis : H_0 = Data volume edema kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi homogen
 H_a = Data volume edema kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi homogen
- Kriteria uji : $Sig < 0.05$ berarti H_0 ditolak dan $Sig > 0.05$ berarti H_0 diterima
- Hasil

Hari Ke-29	Sig.	Hipotesis	Kesimpulan
	0.021	H_0 ditolak	Tidak terdistribusi homogen

- Kesimpulan : $Sig < 0.05$ sehingga **H_0 ditolak**, berarti data volume edema kaki tikus **tidak terdistribusi homogen**

1.3 Uji Analisis Kruskal wallis terhadap seluruh kelompok uji pada hari-29

- Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari volume edema kaki tikus pada tiap perlakuan
- Hipotesis : H_0 = Tidak terdapat perbedaan bermakna terhadap volume edema kaki tikus tiap kelompok
 H_a = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume edema kaki tikus tiap kelompok
- Kriteria uji : $Sig < 0.05$ berarti H_0 ditolak dan $Sig > 0.05$ berarti H_0 diterima
- Hasil :

Hari Ke-29	Sig.	Hipotesis	Kesimpulan
	0.015	H_0 Ditolak	Ada perbedaan bermakna

- Kesimpulan : $Sig < 0.05$ sehingga **H_0 ditolak**, berarti **ada perbedaan yang bermakna** antar perlakuan pada hari ke-29

1.4 Uji Mann Whitney terhadap seluruh kelompok uji pada hari-29

- Tujuan : Untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari volume edema kaki tikus antara lima kelompok perlakuan
- Hipotesis : H_0 = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume edema kaki tikus diantara lima kelompok perlakuan
 H_a = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume edema kaki tikus diantara lima kelompok perlakuan
- Kriteria uji : $Sig < 0.05$ berarti H_0 ditolak dan $Sig > 0.05$ berarti H_0 diterima
- Hasil :

Kelompok	Kelompok	Sig	Hipotesis	Kesimpulan
Normal	Negatif	0.000*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Positif	0.000*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do I	0.000*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do II	0.000*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do III	0.000*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
Negatif	Normal	0.000*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Positif	0.427	H_0 Diterima	Tidak berbeda bermakna
	Do I	0.155	H_0 Diterima	Tidak berbeda bermakna
	Do II	0.355	H_0 Diterima	Tidak berbeda bermakna

Universitas Indonesia

Positif	Do III	0.152	Ho Diterima	Tidak berbeda bermakna
	Normal	0.000*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
	Negatif	0.427	Ho Diterima	Tidak berbeda bermakna
	Do I	0.922	Ho Diterima	Tidak berbeda bermakna
	Do II	0.849	Ho Diterima	Tidak berbeda bermakna
Do I	Do III	0.730	Ho Diterima	Tidak berbeda bermakna
	Do II	0.593	Ho Diterima	Tidak berbeda bermakna
	Do III	0.683	Ho Diterima	Tidak berbeda bermakna
Do II	Do III	0.446	Ho Diterima	Tidak berbeda bermakna

- e. Kesimpulan : sig < 0.05 artinya **Ho ditolak** pada perbandingan antara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya. Hal ini berarti pada hari ke-29 terdapat **perbedaan bermakna** diantara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya.

2 Uji Statistik volume edema kaki tikus seluruh kelompok uji pada hari ke-36

2.1 Uji Normalitas (Uji Saphiro-Wilk) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-36

- Tujuan : mengetahui kenormalan data sebagai syarat untuk uji ANAVA
- Hipotesis : Ho = Data volume edema kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi normal
Ha = Data volume edema kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi normal
- Kriteria uji : Sig < 0.05 berarti Ho ditolak dan Sig > 0.05 berarti Ho diterima
- Hasil

Kelompok	Sig.	Shapiro-Wilk		
		Hipotesis	Kesimpulan	
Hari ke - 36	Kontrol Normal	0.000	Ho Ditolak	Terdistribusi Tidak Normal
	Kontrol Negatif	1.000	Ho Diterima	Terdistribusi Normal
	Kontrol Positif	0.642	Ho Diterima	Terdistribusi Normal
	Dosis I	0.201	Ho Diterima	Terdistribusi Normal
	Dosis II	0.032	Ho Ditolak	Terdistribusi Tidak Normal
	Dosis III	0.967	Ho Diterima	Terdistribusi Normal

- e. Kesimpulan : Sig < 0.05 sehingga **Ho ditolak**, berarti data volume edema kaki tikus terdistribusi **tidak normal**

2.2 Uji Homogenitas (Uji Levene) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-36

- Tujuan: Untuk mengetahui homogenitas sebagai syarat untuk uji ANAVA
- Hipotesis : Ho = Data volume edema kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi homogen
Ha = Data volume edema kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi homogen
- Kriteria uji : Sig < 0.05 berarti Ho ditolak dan Sig > 0.05 berarti Ho diterima
- Hasil

Hari ke-36	Sig.	Hipotesis	Kesimpulan
	0.053	Ho Diterima	Terdistribusi Homogen

- e. Kesimpulan : Sig > 0.05 sehingga **Ho diterima**, berarti data volume edema kaki tikus terdistribusi **homogen**

(Lanjutan)

2.3 Uji Analisis Kruskal wallis terhadap seluruh kelompok uji pada hari-36

- Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari volume edema kaki tikus pada tiap perlakuan
- Hipotesis : H_0 = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume edema kaki tikus tiap kelompok perlakuan
 H_a = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume edema kaki tikus tiap kelompok perlakuan
- Kriteria uji : $Sig < 0.05$ berarti H_0 ditolak dan $Sig > 0.05$ berarti H_0 diterima
- Hasil :

Hari ke-36	Sig.	Hipotesis	Kesimpulan
	0.003	H_0 Ditolak	Ada perbedaan bermakna

- Kesimpulan : $Sig < 0.05$ sehingga **H_0 ditolak**, berarti **ada perbedaan yang bermakna** antar perlakuan pada hari ke-36

2.4 Uji Mann Whitney terhadap seluruh kelompok uji pada hari-36

- Tujuan : Untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari volume edema kaki tikus antara tiap kelompok perlakuan
- Hipotesis : H_0 = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume edema kaki tikus diantara tiap kelompok perlakuan
 H_a = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume edema kaki tikus diantara tiap kelompok perlakuan
- Kriteria uji : $Sig < 0.05$ berarti H_0 ditolak dan $Sig > 0.05$ berarti H_0 diterima
- Hasil :

Kelompok	Kelompok	Sig	Hipotesis	Kesimpulan
Normal	Negatif	0.007*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Positif	0.007*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do I	0.007*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do II	0.006*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do III	0.007*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
Negatif	Positif	0.094	H_0 Diterima	Tidak Berbeda Bermakna
	Do I	0.058	H_0 Diterima	Tidak Berbeda Bermakna
	Do II	0.070	H_0 Diterima	Tidak Berbeda Bermakna
	Do III	0.021*	H_0 Ditolak	Berbeda Bermakna
Positif	Do I	0.248	H_0 Diterima	Tidak Berbeda Bermakna
	Do II	0.341	H_0 Diterima	Tidak Berbeda Bermakna
	Do III	0.673	H_0 Diterima	Tidak Berbeda Bermakna
Do I	Do II	1.000	H_0 Diterima	Tidak Berbeda Bermakna
	Do III	0.164	H_0 Diterima	Tidak Berbeda Bermakna
Do II	Do III	0.2811	H_0 Diterima	Tidak Berbeda Bermakna

- Kesimpulan : $Sig < 0.05$ artinya **H_0 ditolak** pada perbandingan antara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya. Hal ini berarti pada hari ke-36 terdapat **perbedaan bermakna** diantara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya dan berbeda bermakna antara kontrol negatif dengan dosis III.

(Lanjutan)

- 3 Uji Statistik volume edema kaki tikus seluruh kelompok uji pada hari ke-43
- 3.1 Uji Normalitas (Uji Saphiro-Wilk) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-43
- Tujuan : mengetahui kenormalan data sebagai syarat untuk uji ANAVA
 - Hipotesis : H_0 = Data volume edema kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi normal
 H_a = Data volume edema kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi normal
 - Kriteria uji : $Sig < 0.05$ berarti H_0 ditolak dan $Sig > 0.05$ berarti H_0 diterima
 - Hasil

		Shapiro-Wilk		
	Kelompok	Sig.	Hipotesis	Kesimpulan
Hari ke - 43	Kontrol Negatif	0.537	H_0 Diterima	Terdistribusi Normal
	Kontrol Positif	0.002	H_0 Ditolak	Terdistribusi Tidak Normal
	Kontrol Positif	0.002	H_0 Ditolak	Terdistribusi Tidak Normal
	Dosis I	0.238	H_0 Diterima	Terdistribusi Normal
	Dosis II	0.046	H_0 Ditolak	Terdistribusi Tidak Normal
	Dosis III	0.201	H_0 Diterima	Terdistribusi Normal

- e. Kesimpulan : $Sig < 0.05$ sehingga **H_0 ditolak**, berarti data volume telapak kaki tikus terdistribusi **Tidak Normal**

- 3.2 Uji-Homogenitas (Uji Levene) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-43
- Tujuan: Untuk mengetahui homogenitas sebagai syarat untuk uji ANAVA
 - Hipotesis : H_0 = Data volume edema kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi homogen
 H_a = Data volume edema kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi homoge
 - Kriteria uji : $Sig < 0.05$ berarti H_0 ditolak dan $Sig > 0.05$ berarti H_0 diterima
 - Hasil

Hari ke-43	Sig.	Hipotesis	Kesimpulan
	0.128	H_0 Diterima	Terdistribusi Homogen

- e. Kesimpulan : $Sig > 0.05$ sehingga **H_0 diterima**, berarti data volume edema kaki tikus terdistribusi **homogen**

- 3.3 Uji Analisis Kruskal Wallis terhadap seluruh kelompok uji pada hari-43
- Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari volume edema kaki tikus pada tiap perlakuan
 - Hipotesis : H_0 = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume edema kaki tikus tiap kelompok perlakuan
 H_a = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume edema kaki tikus tiap kelompok perlakuan
 - Kriteria uji : $Sig < 0.05$ berarti H_0 ditolak dan $Sig > 0.05$ berarti H_0 diterima
 - Hasil :

Hari ke-43	Sig.	Hipotesis	Kesimpulan
	0.001	H_0 Ditolak	Ada perbedaan bermakna

- e. Kesimpulan : $Sig < 0,05$ sehingga **H_0 ditolak** berarti **ada perbedaan bermakna**

(Lanjutan)

3.4 Uji Mann Whitney terhadap seluruh kelompok uji pada hari-43

- a. Tujuan : Untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari volume edema kaki tikus antara tiap kelompok perlakuan
- b. Hipotesis : H_0 = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume edema kaki tikus diantara tiap kelompok perlakuan
 H_a = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume edema kaki tikus diantara tiap kelompok perlakuan
- c. Kriteria uji : $Sig < 0.05$ berarti H_0 ditolak dan $Sig > 0.05$ berarti H_0 diterima
- d. Hasil :

Kelompok	Kelompok	Sig	Hipotesis	Kesimpulan
Normal	Negatif	0.008*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Positif	0.014*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do I	0.008*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do II	0.008*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do III	0.008*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
Negatif	Positif	0.008*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do I	0.015*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do II	0.019*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do III	0.011*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
Positif	Do I	0.070	H_0 Diterima	Tidak berbeda bermakna
	Do II	0.434	H_0 Diterima	Tidak berbeda bermakna
	Do III	0.159	H_0 Diterima	Tidak Berbeda bermakna
Do I	Do II	0.915	H_0 Diterima	Tidak berbeda bermakna
	Do III	0.737	H_0 Diterima	Tidak berbeda bermakna
Do II	Do III	1.000	H_0 Diterima	Tidak berbeda bermakna

- e. Kesimpulan : $Sig < 0.05$ sehingga **H_0 ditolak**, berarti **ada perbedaan yang bermakna** antar perlakuan pada hari ke-43. H_0 ditolak pada perbandingan antara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya. Hal ini berarti pada hari ke-43 terdapat perbedaan bermakna diantara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya. Dan terdapat perbedaan bermakna antara kontrol negatif dengan kontrol positif dan ketiga kelompok dosis.

4. Uji Statistik volume edema kaki tikus seluruh kelompok uji pada hari ke-50

4.1 Uji Normalitas (Uji Saphiro-Wilk) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-50

- a. Tujuan : mengetahui kenormalan data sebagai syarat untuk uji ANAVA
- b. Hipotesis : H_0 = Data volume edema kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi normal
 H_a = Data volume edema kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi normal
- c. Kriteria uji : $Sig < 0.05$ berarti H_0 ditolak dan $Sig > 0.05$ berarti H_0 diterima
- d. Hasil

		Shapiro-Wilk		
	Kelompok	Sig.	Hipotesis	Kesimpulan
Hari ke - 50	Kontrol Normal	0,119	H_0 Diterima	Terdistribusi Normal
	Kontrol Negatif	0.346	H_0 Diterima	Terdistribusi Normal
	Kontrol Positif	0.146	H_0 Diterima	Terdistribusi Normal
	Dosis I	0.065	H_0 Diterima	Terdistribusi Normal
	Dosis II	0.201	H_0 Diterima	Terdistribusi Normal
	Dosis III	0.146	H_0 Diterima	Terdistribusi Normal

(Lanjutan)

- e. Kesimpulan : Sig > 0.05 sehingga **Ho diterima**, berarti data volume edema kaki tikus terdistribusi **normal**

4.2 Uji Homogenitas (Uji Levene) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-50

- a. Tujuan: Untuk mengetahui homogenitas sebagai syarat untuk uji ANAVA
 b. Hipotesis : Ho = Data volume edema kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi homogen

Ha = Data volume edema kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi homogen

- c. Kriteria uji : Sig < 0.05 berarti Ho ditolak dan Sig > 0.05 berarti Ho diterima

d. Hasil

Hari ke-50	Sig.	Hipotesis	Kesimpulan
	0.117	Ho Diterima	Terdistribusi Homogen

- e. Kesimpulan : Sig > 0.05 sehingga **Ho diterima**, berarti data volume edema kaki tikus terdistribusi **homogen**

4.3 Uji Analisis varians satu arah (ANOVA) terhadap seluruh kelompok uji pada hari-50.

- a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari volume edema kaki tikus pada tiap perlakuan

- b. Hipotesis : Ho = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume edema kaki tikus tiap kelompok perlakuan

Ha = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume edema kaki tikus tiap kelompok perlakuan

- c. Kriteria uji : Sig < 0.05 berarti Ho ditolak dan Sig > 0.05 berarti Ho diterima

d. Hasil :

Hari ke-50	Sig.	Hipotesis	Kesimpulan
	0.000	Ho Ditolak	Ada perbedaan bermakna

- e. Kesimpulan : Sig < 0.05 sehingga **Ho ditolak**, berarti **ada perbedaan yang bermakna** antar perlakuan pada hari ke-50

4.4 Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) terhadap seluruh kelompok uji pada hari-50

- a. Tujuan : Untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari volume edema kaki tikus antara lima kelompok perlakuan

- b. Hipotesis : Ho = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume edema kaki tikus diantara lima kelompok perlakuan

Ha = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume edema kaki tikus diantara lima kelompok perlakuan

- c. Kriteria uji : Sig < 0.05 berarti Ho ditolak dan Sig > 0.05 berarti Ho diterima

d. Hasil :

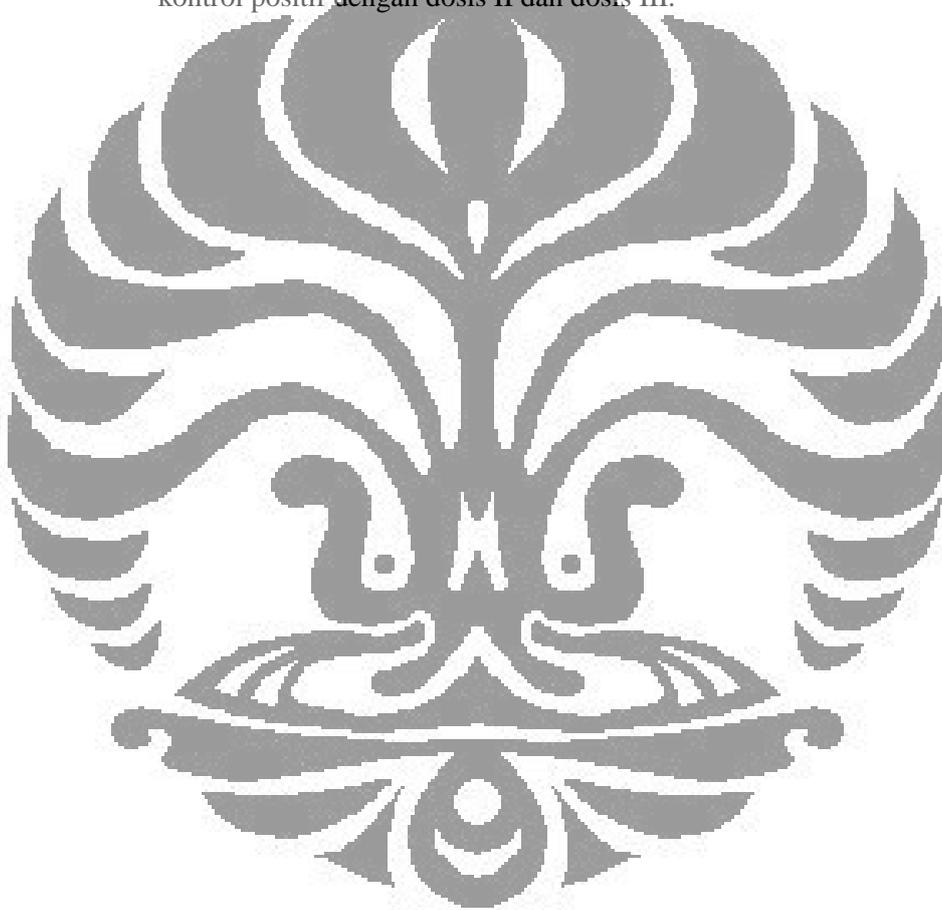
Kelompok	Kelompok	Sig	Hipotesis	Kesimpulan
Normal	Negatif	0.000*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
	Positif	0.006*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
	Do I	0.000*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
	Do II	0.000*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
	Do III	0.000*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
Negatif	Positif	0.000*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
	Do I	0.031*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
	Do II	0.024*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna

Universitas Indonesia

(Lanjutan)

	Do III	0.006*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
Positif	Do I	0.446	Ho Diterima	Tidak Berbeda bermakna
	Do II	0.508	Ho Diterima	Tidak berbeda bermakna
	Do III	0.860	Ho Diterima	Tidak berbeda bermakna
Do I	Do II	1.000	Ho Diterima	Tidak berbeda bermakna
	Do III	0.977	Ho Diterima	Tidak berbeda bermakna
Do II	Do III	0.988	Ho Diterima	Tidak berbeda bermakna

- e. Kesimpulan : Sig < 0.05 sehingga **Ho ditolak** pada perbandingan antara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya; antara kontrol negatif dengan kelompok positif, dosis I, II dan III. Hal ini berarti pada hari ke-50 terdapat **perbedaan bermakna** diantara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya, antara kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif dan dosis III. Namun tidak didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok kontrol positif dengan dosis II dan dosis III.



Lampiran 20. Tabel skoring sinovitis dan hasil statistika

Tabel Skoring histoPA uji artritis sinovitis (per lapang pandang pembesaran 40x lalu diperbesar pembesaran 400x)

Kelompok	Observer I			Observer II			Jumlah		Hasil observasi Sinovitis
	Lining sel	Stroma	Sel radang	Lining sel	Stroma	Sel radang	1	2	
N	1	1	0	0	0	0	1	0	0,2
	2	0	0	0	0	0	0	0	
	3	1	0	0	0	0	1	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	0	0	
	Rata							0,4	
KN	1	1	3	2	3	2	6	7	7,0
	2	2	3	2	3	1	7	6	
	3	1	3	3	2	3	7	7	
	4	2	3	3	2	3	8	7	
	5	2	3	3	2	3	8	7	
	Rata							7,2	
KP	1	1	3	2	1	3	6	6	5,9
	2	1	3	2	1	3	6	6	
	3	1	3	2	1	3	6	6	
	4	1	2	2	1	3	5	6	
	5	1	3	2	1	3	6	6	
	Rata							5,8	
Do I	1	1	3	3	2	3	7	7	6,5
	2	2	3	3	2	3	8	8	
	3	1	3	2	1	3	6	6	
	4	1	3	2	1	3	6	5	
	5	1	3	2	1	3	6	6	
	Rata							6,6	
Do II	1	1	3	2	1	3	6	6	5,9
	2	1	3	2	1	3	6	6	
	3	1	3	2	1	3	6	6	
	4	1	3	2	1	3	6	6	
	5	1	3	2	1	3	6	5	
	Rata							6,0	
Do III	1	1	3	2	1	3	6	6	5,9
	2	1	3	2	1	3	6	5	
	3	1	3	2	1	3	6	6	
	4	1	3	2	1	3	6	6	
	5	1	3	2	1	3	6	6	
	Rata							6,0	

Tabel Perbandingan ada tidaknya perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan berdasarkan hasil uji statistik berdasarkan skor sinovitis

Kelompok	Kelompok	Hari-50
Kontrol Normal	Kontrol negatif	+
	Kontrol positif	+
	Dosis I	+
	Dosis II	+
	Dosis III	+
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	+
	Dosis I	-
	Dosis II	+
	Dosis III	+
Kontrol Positif	Dosis I	-
	Dosis II	-
	Dosis III	-
Antar Kelompok Dosis	Dosis I >> Dosis II	-
	Dosis I >> Dosis III	-
	Dosis II >> Dosis III	-

Keterangan : (-) = Tidak terdapat perbedaan bermakna; (+) = Terdapat perbedaan bermakna; Kontrol normal = CMC 0.5 %; Kontrol negatif = CMC 0.5 %; Kontrol positif = metotreksat 0.05 mg/200 g bb; Dosis I = bahan uji ekstrak daun babandotan 40 mg/200 g bb; Dosis II = bahan uji ekstrak daun babandotan 80 mg/200 g bb; Dosis III = bahan uji ekstrak daun babandotan 160 mg/200 g bb.

1. Uji statistik skor sinovitis

1.1 Uji Normalitas (Uji Saphiro-Wilk) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-50

- Tujuan : mengetahui kenormalan data sebagai syarat untuk uji ANAVA
- Hipotesis : H_0 = Data sinovitis kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi normal
 H_a = Data sinovitis kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi normal
- Kriteria uji : Sig < 0.05 berarti H_0 ditolak dan Sig > 0.05 berarti H_0 diterima
- Hasil

Kelompok	Sig.	Hipotesis	Shapiro-Wilk	
			Kesimpulan	
Hari ke - 50	Kontrol Normal	0.006	H_0 Ditolak	Tidak Terdistribusi Normal
	Kontrol Negatif	0.119	H_0 Diterima	Terdistribusi Normal
	Kontrol Positif	0.000	H_0 Ditolak	Tidak Terdistribusi Normal
	Dosis I	0.440	H_0 Diterima	Terdistribusi Normal
	Dosis II	0.000	H_0 Ditolak	Tidak Terdistribusi Normal
	Dosis III	0.000	H_0 Ditolak	Tidak Terdistribusi Normal

- Kesimpulan : Sig < 0.05 sehingga **H_0 ditolak**, berarti data sinovitis tikus terdistribusi **tidak normal**

(Lanjutan)

1.2 Uji Homogenitas (Uji Levene) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-50

- a. Tujuan: Untuk mengetahui homogenitas sebagai syarat untuk uji ANAVA
- b. Hipotesis : H_0 = Data sinovitis kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi homogen
 H_a = Data sinovitis kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi homogen
- c. Kriteria uji : $Sig < 0.05$ berarti H_0 ditolak dan $Sig > 0.05$ berarti H_0 diterima
- d. Hasil

Hari ke-50	Sig.	Hipotesis	Kesimpulan
	0.001	H_0 Ditolak	Terdistribusi Tidak Homogen

- e. Kesimpulan : $Sig < 0.05$ sehingga **H_0 ditolak**, berarti data sinovitis kaki tikus terdistribusi **tidak homogen**

1.3 Uji Analisis Kruskal wallis terhadap seluruh kelompok uji pada hari-50

- a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari sinovitis kaki tikus pada tiap perlakuan
- b. Hipotesis : H_0 = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap sinovitis kaki tikus tiap kelompok perlakuan
 H_a = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap sinovitis kaki tikus tiap kelompok perlakuan
- c. Kriteria uji : $Sig < 0.05$ berarti H_0 ditolak dan $Sig > 0.05$ berarti H_0 diterima
- d. Hasil :

Hari ke-50	Sig.	Hipotesis	Kesimpulan
	0.001	H_0 Ditolak	Ada perbedaan bermakna

- e. Kesimpulan : $Sig < 0.05$ sehingga **H_0 ditolak**, berarti **ada perbedaan yang bermakna** antar perlakuan pada hari ke-50

1.4 Uji Mann Whitney terhadap seluruh kelompok uji pada hari-50

- a. Tujuan : Untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari sinovitis kaki tikus antara lima kelompok perlakuan
- b. Hipotesis : H_0 = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap sinovitis kaki tikus diantara lima kelompok perlakuan
 H_a = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap sinovitis kaki tikus diantara lima kelompok perlakuan
- c. Kriteria uji : $Sig < 0.05$ berarti H_0 ditolak dan $Sig > 0.05$ berarti H_0 diterima
- d. Hasil :

(Lanjutan)

Kelompok	Kelompok	Sig	Hipotesis	Kesimpulan
Normal	Negatif	0.008*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
	Positif	0.008*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
	Do I	0.008*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
	Do II	0.006*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
	Do III	0.006*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
Negatif	Positif	0.007*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
	Do I	0.290	Ho Diterima	Tidak berbeda bermakna
	Do II	0.007*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
	Do III	0.007*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
	Positif	Do I	0.345	Ho Diterima
Do I	Do II	1.000	Ho Diterima	Tidak berbeda bermakna
	Do III	1.000	Ho Diterima	Tidak berbeda bermakna
	Do II	Do III	0.345	Ho Diterima
Do II	Do III	1.000	Ho Diterima	Tidak berbeda bermakna

e. Kesimpulan : Sig < 0.05 sehingga **Ho ditolak** pada perbandingan antara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya; antara kontrol negatif dengan kelompok positif, dosis II dan III dan antara kontrol positif dengan dosis I. Hal ini berarti pada hari ke-50 terdapat **perbedaan bermakna** diantara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya, antara kontrol negatif dengan kelima kelompok lainnya dan antara kontrol positif dengan dosis I. Namun tidak didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok kontrol positif dengan dosis II dan dosis III.

Lampiran 21. Tabel perhitungan jumlah osteoklas dan hasil statistika

Tabel Jumlah rata-rata osteoklas perlapang pandang (pembesaran 200x) setiap kelompok perlakuan pada pengamatan gambaran histopatologi tulang *calcaneus*

N (Ulangan Tikus)	Jumlah osteoklas per lapang pandang (370473,7 μm^2)					
	N	KN	KP	DO I	DO II	DO III
1	2.80	9.00	4.60	7.60	6.90	5.50
2	2.90	6.10	3.80	7.10	6.60	4.20
3	1.90	7.00	3.70	6.90	6.80	5.70
4	0.88	7.08	3.82	7.08	6.96	4.72
5	1.00	8.30	3.10	7.60	6.20	5.80
Rata-rata	1.90	7.50	3.80	7.26	6.69	5.18
Standar deviasi	\pm 0.96	\pm 1.15	\pm 0.53	\pm 0.32	\pm 0.31	\pm 0.69

Tabel Jumlah rata-rata osteoklas per lapang pandang (pembesaran 400x) setiap kelompok perlakuan pada pengamatan gambaran histopatologi tulang *calcaneus*.

N (Ulangan Tikus)	Jumlah Osteoklas per lapang pandang (92483,2 μm^2)					
	N	KN	KP	DO I	DO II	DO III
1	2.30	8.20	4.60	7.80	6.20	5.10
2	2.50	6.00	4.00	6.80	7.60	5.80
3	1.50	8.20	4.00	7.20	7.80	5.80
4	0.60	7.80	4.20	6.80	7.80	4.90
5	1.20	7.60	4.20	8.00	5.00	4.90
Rata-rata	1.62	7.56	4.20	7.32	6.88	5.30
Standar deviasi	\pm 0.79	\pm 0.91	\pm 0.24	\pm 0.56	\pm 1.25	\pm 0.46

Keterangan : N = kontrol normal (CMC 0.5%), KN = kontrol negatif (CMC 0.5%), KP = kontrol positif (metotreksat 0.05 mg/200 g bb), DO I = dosis I (bahan uji ekstrak daun babandotan 40 mg/200 g bb), DO II = dosis II (bahan uji ekstrak daun babandotan 80 mg/200 g bb), DO III = dosis III (bahan uji ekstrak daun babandotan 160 mg/200 g bb), Pembesaran 200x (lapang pandang = 527.56 μm x 702.24 μm), Pembesaran 400x (lapang pandang = 350.90 μm x 263.56 μm)

(Lanjutan)

Tabel Jumlah rata-rata osteoklas setiap kelompok perlakuan per mm² area (pembesaran 200 x)

N (Ulangan Tikus)	N	Jumlah osteoklas per lapang pandang (mm ²)				
		KN	KP	DO I	DO II	DO III
1	7.56	24.29	12.42	20.51	18.62	14.85
2	7.83	16.47	10.26	19.16	17.82	11.34
3	5.13	18.89	9.99	18.62	18.35	15.39
4	2.38	19.11	10.31	19.11	18.79	12.74
5	2.70	22.40	8.37	20.51	16.74	15.66
Rata-rata	5.12	20.23	10.27	19.59	18.06	13.99
Sd	2.58	3.10	1.44	0.87	0.83	1.87

Tabel Jumlah rata-rata osteoklas setiap kelompok perlakuan per mm² area (pembesaran 400 x)

N (Ulangan Tikus)	N	Jumlah osteoklas per lapang pandang (mm ²)				
		KN	KP	DO I	DO II	DO III
1	24.87	88.66	49.74	84.34	67.04	55.19
2	27.03	64.88	43.25	73.53	82.18	62.71
3	16.22	88.66	43.25	77.85	84.34	62.71
4	6.49	84.34	45.41	73.53	84.34	52.98
5	12.98	82.18	45.41	86.50	54.06	52.98
Rata-rata	17.52	81.74	45.41	79.15	74.39	57.31
Sd	8.49	9.84	2.65	6.04	13.47	5.01

Keterangan : N = kontrol normal (CMC 0.5 %), KN = kontrol negatif (CMC 0.5 %), KP = kontrol positif (metotreksat 0.05 mg/200 g bb), DO I = dosis I (bahan uji ekstrak daun babandotan 40 mg/200 g bb), DO II = dosis II (bahan uji ekstrak daun babandotan 80 mg/200 g bb), DO III = dosis III (bahan uji ekstrak daun babandotan 160 mg/200 g bb); Pembesaran 200x (lapang pandang = 527.56 µm x 702.24 µm), Pembesaran 400x (lapang pandang = 263.56 µm x 350.90 µm).

(Lanjutan)

Tabel Perbandingan ada tidaknya perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan menurut hasil uji statistik berdasarkan jumlah total osteoklas per mm² pada tulang *calcaneus* kaki tikus

Kelompok	Kelompok	200 X	400 X
Kontrol Normal	Kontrol negatif	+	+
	Kontrol positif	+	+
	Dosis I	+	+
	Dosis II	+	+
	Dosis III	+	+
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	+	+
	Dosis I	-	-
	Dosis II	-	-
	Dosis III	+	+
Kontrol Positif	Dosis I	+	+
	Dosis II	+	+
	Dosis III	+	+
Antar Kelompok Dosis	Dosis I >> Dosis II	+	-
	Dosis I >> Dosis III	+	+
	Dosis II >> Dosis III	+	+

Keterangan: (+) : Terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) ; (-) : Tidak ada perbedaan bermakna

Hasil uji statistik jumlah osteoklas

Uji statistik jumlah osteoklas dengan pembesaran 200x

1.1 Uji Normalitas (Uji Saphiro-Wilk) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-50

- Tujuan : mengetahui kenormalan data sebagai syarat untuk uji ANAVA
- Hipotesis : H_0 = Data jumlah osteoklas kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi normal
 H_a = Data jumlah osteoklas kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi normal
- Kriteria uji : Sig < 0.05 berarti H_0 ditolak dan Sig > 0.05 berarti H_0 diterima
- Hasil

Kelompok	Sig.	Shapiro-Wilk		
		Hipotesis	Kesimpulan	
Kontrol Normal	0.237	H_0 Diterima	Terdistribusi Normal	
Hari ke - 50	Kontrol Negatif	0.751	H_0 Diterima	Terdistribusi Normal
	Kontrol Positif	0.548	H_0 Diterima	Terdistribusi Normal
	Dosis I	0.148	H_0 Diterima	Terdistribusi Normal
	Dosis II	0.339	H_0 Diterima	Terdistribusi Normal
	Dosis III	0.291	H_0 Diterima	Terdistribusi Normal

- Kesimpulan : Sig > 0.05 sehingga **H_0 diterima**, berarti data osteoklas kaki tikus terdistribusi **normal**

(Lanjutan)

- 1.2 Uji Homogenitas (Uji Levene) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-50
- Tujuan: Untuk mengetahui homogenitas sebagai syarat untuk uji ANAVA
 - Hipotesis : H_0 = Data jumlah osteoklas kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi homogen
 H_a = Data jumlah osteoklas kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi homogen
 - Kriteria uji : $Sig < 0.05$ berarti H_0 ditolak dan $Sig > 0.05$ berarti H_0 diterima
 - Hasil

Hari ke-50	Sig.	Hipotesis	Kesimpulan
	0.015	H_0 Ditolak	Tidak Terdistribusi Homogen

- e. Kesimpulan : $Sig < 0.05$ sehingga **H_0 ditolak**, berarti data jumlah osteoklas kaki tikus terdistribusi **tidak homogen**

- 1.3 Uji Analisis Kruskal wallis terhadap seluruh kelompok uji pada hari-50
- Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari jumlah osteoklas kaki tikus pada tiap perlakuan
 - Hipotesis : H_0 = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah osteoklas kaki tikus tiap kelompok perlakuan
 H_a = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah osteoklas kaki tikus tiap kelompok perlakuan
 - Kriteria uji : $Sig < 0.05$ berarti H_0 ditolak dan $Sig > 0.05$ berarti H_0 diterima
 - Hasil :

Hari ke-50	Sig.	Hipotesis	Kesimpulan
	0,000	H_0 Ditolak	Ada perbedaan bermakna

- e. Kesimpulan : $Sig < 0.05$ sehingga **H_0 ditolak**, berarti **ada perbedaan yang bermakna** antar perlakuan pada hari ke-50

- 1.4 Uji Mann Whitney terhadap seluruh kelompok uji pada hari-50
- Tujuan : Untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari jumlah osteoklas kaki tikus antara lima kelompok perlakuan
 - Hipotesis : H_0 = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah osteoklas kaki tikus diantara lima kelompok perlakuan
 H_a = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah osteoklas kaki tikus diantara lima kelompok perlakuan
 - Kriteria uji : $Sig < 0.05$ berarti H_0 ditolak dan $Sig > 0.05$ berarti H_0 diterima
 - Hasil :

Kelompok	Kelompok	Sig	Hipotesis	Kesimpulan
Normal	Negatif	0.009*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Positif	0.009*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do I	0.009*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do II	0.009*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do III	0.009*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
Negatif	Positif	0.009*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do I	1.000	H_0 Diterima	Tidak berbeda bermakna
	Do II	0.117	H_0 Diterima	Tidak berbeda bermakna
Positif	Do III	0.009*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do I	0.009*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do II	0.009*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna

Universitas Indonesia

(Lanjutan)

	Do III	0.016*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
Do I	Do II	0.021*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
	Do III	0.009*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna
Do II	Do III	0.009*	Ho Ditolak	Berbeda bermakna

- e. Kesimpulan : Sig < 0.05 sehingga **Ho ditolak** pada perbandingan antara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya; antara kontrol negatif dengan kelompok positif, dan III dan antara kontrol positif dengan dosis I, II dan III. Hal ini berarti pada hari ke-50 terdapat **perbedaan bermakna** diantara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya, antara kontrol negatif dengan kelompok Kontrol positif dan Dosis III serta ada perbedaan bermakna antara variasi dosis. Namun tidak didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok kontrol negatif dengan dosis I dan II.

2. Uji statistik jumlah osteoklas dengan pembesaran 400x

2.1 Uji Normalitas (Uji Saphiro-Wilk) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-50

- Tujuan : mengetahui kenormalan data sebagai syarat untuk uji ANAVA
- Hipotesis : Ho = Data jumlah osteoklas kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi normal
Ha = Data jumlah osteoklas kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi normal
- Kriteria uji : Sig < 0.05 berarti Ho ditolak dan Sig > 0.05 berarti Ho diterima
- Hasil

Kelompok	Sig.	Shapiro-Wilk	
		Hipotesis	Kesimpulan
Kontrol Normal	0.711	Ho Diterima	Terdistribusi Normal
Hari ke - 50 Kontrol Negatif	0.055	Ho Diterima	Terdistribusi Normal
Kontrol Positif	0.145	Ho Diterima	Terdistribusi Normal
Dosis I	0.246	Ho Diterima	Terdistribusi Normal
Dosis II	0.104	Ho Diterima	Terdistribusi Normal
Dosis III	0.050	Ho Diterima	Terdistribusi Normal

- e. Kesimpulan : Sig > 0.05 sehingga **Ho diterima**, berarti data jumlah osteoklas kaki tikus terdistribusi normal

2.2 Uji Homogenitas (Uji Levene) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-50

- Tujuan: Untuk mengetahui homogenitas sebagai syarat untuk uji ANAVA
- Hipotesis : Ho = Data jumlah osteoklas kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi homogen
Ha = Data jumlah osteoklas kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi homogen
- Kriteria uji : Sig < 0.05 berarti Ho ditolak dan Sig > 0.05 berarti Ho diterima
- Hasil

Hari ke-50	Sig.	Hipotesis	Kesimpulan
	0.026	Ho Ditolak	Tidak Terdistribusi Homogen

- e. Kesimpulan : Sig < 0.05 sehingga **Ho ditolak**, berarti data jumlah osteoklas kaki tikus terdistribusi **tidak homogen**

2.3 Uji Analisis Kruskal wallis terhadap seluruh kelompok uji pada hari 50

- Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari jumlah osteoklas kaki tikus pada tiap perlakuan

(Lanjutan)

- b. Hipotesis : H_0 = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah osteoklas kaki tikus tiap kelompok perlakuan
 H_a = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah osteoklas kaki tikus tiap kelompok perlakuan
- c. Kriteria uji : $Sig < 0.05$ berarti H_0 ditolak dan $Sig > 0.05$ berarti H_0 diterima
- d. Hasil :

Hari ke-50	Sig.	Hipotesis	Kesimpulan
	0.000	H_0 Ditolak	Ada perbedaan bermakna

- e. Kesimpulan : $Sig < 0.05$ sehingga **H_0 ditolak**, berarti **ada perbedaan yang bermakna** antar perlakuan pada hari ke-50

2.4 Uji Mann-Whitney terhadap seluruh kelompok uji pada hari-50

- a. Tujuan : Untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari jumlah osteoklas kaki tikus antara lima kelompok perlakuan
- b. Hipotesis : H_0 = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah osteoklas kaki tikus diantara lima kelompok perlakuan
 H_a = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah osteoklas kaki tikus diantara lima kelompok perlakuan
- c. Kriteria uji : $Sig < 0.05$ berarti H_0 ditolak dan $Sig > 0.05$ berarti H_0 diterima
- d. Hasil :

Kelompok	Kelompok	Sig	Hipotesis	Kesimpulan
Normal	Negatif	0.009*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Positif	0.009*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do I	0.009*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do II	0.009*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do III	0.009*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
Negatif	Positif	0.008*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do I	0.399	H_0 Diterima	Tidak berbeda bermakna
	Do II	0.287	H_0 Diterima	Tidak berbeda bermakna
	Do III	0.008*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
Positif	Do I	0.008*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do II	0.008*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
	Do III	0.008*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
Do I	Do II	0.596	H_0 Diterima	Tidak berbeda bermakna
	Do III	0.008*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna
Do II	Do III	0.045*	H_0 Ditolak	Berbeda bermakna

- e. Kesimpulan : $Sig < 0.05$ sehingga **H_0 ditolak** pada perbandingan antara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya; antara kontrol negatif dengan kelompok positif dan dosis III, antara kontrol positif dengan dosis I, II dan III. Hal ini berarti pada hari ke-50 terdapat **perbedaan bermakna** diantara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya, antara kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif dan dosis III, dan antara kontrol positif dengan dosis I, II dan III. Namun tidak didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok kontrol negatif dengan dosis I dan dosis II serta antara dosis I dan II.