



UNIVERSITAS INDONESIA

**EFEK EKSTRAK ETANOL 70% RUMPUT MUTIARA
(*Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk.) TERHADAP PENURUNAN
JUMLAH OSTEOKLAS TULANG *CALCANEUS* TIKUS
MODEL ARTRITIS REUMATOID**

SKRIPSI

**MARGARETHA S.M.U.
0806327862**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**EFEK EKSTRAK ETANOL 70% RUMPUT MUTIARA
(*Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk.) TERHADAP PENURUNAN
JUMLAH OSTEOKLAS TULANG *CALCANEUS* TIKUS
MODEL ARTRITIS REUMATOID**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

**MARGARETHA S.M.U.
0806327862**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

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

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

Depok, Juli 2012



Margaretha S.M.U.

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama	Margaretha S.M.U.
NPM	: 0806327862
Tanda Tangan	: 
Tanggal	: Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Margaretha S.M.U.

NPM : 0806327862

Program Studi : Farmasi

Judul Skripsi : Efek Ekstrak Etanol 70% Rumput Mutiara (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk.) terhadap Penurunan Jumlah Osteoklas Tulang *Calcaneus* Tikus Model Arthritis Reumatoid

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

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

Pembimbing II : Dr. Dadang Kusmana, MS. (.....)

Penguji I : Santi Purna Sari, S.Si, M.Si (.....)

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

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : Juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Pengasih atas segala limpahan berkat, kasih sayang, dan karunia-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Departemen Farmasi, FMIPA Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa penyelesaian skripsi ini bukan hanya atas hasil usaha sendiri, melainkan karena bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak sejak awal masa perkuliahan, penelitian, dan sampai pada penyusunan skripsi ini. Tanpa mereka, penulis akan sulit mencapai tahap penyelesaian skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr. Anton Bahtiar, M.Biomed., Apt. dan Dr. Dadang Kusmana, MS, selaku pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktunya untuk memberikan arahan, bimbingan, nasehat, dan saran dalam melaksanakan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S, selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk melaksanakan penelitian ini.
3. Dra. Retnosari Andrajati, M.S., Ph.D, Apt. selaku Kepala Laboratorium Farmakologi Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan nasehat dan ijin untuk melaksanakan penelitian di laboratorium yang dipimpinnya.
4. Prof. Dr. Effionora Anwar, MS, Apt., selaku pembimbing akademik yang telah memberikan saran dan ijin untuk dapat melaksanakan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
5. Ibu Santi Purna Sari, S.Si., M.Si. dan Dr. Berna Elya, M.Si., Apt. selaku penguji yang telah memberikan saran-saran sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
6. Bapak dan Ibu staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di Farmasi UI serta kepada para staf Farmasi UI yang telah memberikan dukungan selama perkuliahan dan penelitian.

7. Staf Laboratorium Biologi Perkembangan Hewan dan Tumbuhan Departemen Biologi FMIPA UI dan staf Departemen Histologi Fakultas Kedokteran UI yang telah mengajari dan membantu penyelesaian histologi tulang untuk penelitian ini.
8. PT. Kimia Farma atas pemberian natrium diklofenak untuk penelitian ini.
9. Samuel Waterkamp dan Purnama Dewi sebagai orang tua, yang telah memberikan doa, arahan, motivasi, nasihat dan dukungan penuh, baik moral maupun material selama masa perkuliahan, penelitian, dan penyusunan skripsi, serta Putri, Kefas, Amah, dan seluruh keluarga besar untuk kasih sayang, kesabaran, dukungan, dan doa yang selalu diberikan.
10. Teman-teman seperjuangan dalam menjalani suka dan duka penelitian, Melda Silvia, Dita Andriani, Indana Ayu Soraya, Qothrunnada, Stevani Dian Rofista, Irensia Arviana, Clara Herlina, Fransiska S. Damput, Gladys Brigitta, Tris Febriana, dan semua teman-teman Farmasi UI 2008 yang telah membantu, memberi semangat, dan menemani selama masa perkuliahan, sampai penelitian, serta teman-teman lain di luar Farmasi UI yang telah mendukung dan mendoakan penulis.
11. Andyanto Widodo yang selalu memberikan perhatian, semangat, dan saran-saran membangun selama penelitian dan penyusunan skripsi; serta teman-teman KMK FMIPA yang selalu memberikan doa dan semangat dalam menjalani penelitian.

Akhirnya hanya doa dan harapan yang bisa penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Pengasih untuk memberkati pihak-pihak yang telah membantu penyelesaian skripsi ini. Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini, namun penulis berharap semoga skripsi ini dapat berguna bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Penulis

2012

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

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

Nama : Margaretha S.M.U.
NPM : 0806327862
Program Studi : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Efek Ekstrak Etanol 70% Rumput Mutiara (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk.) terhadap Penurunan Jumlah Osteoklas Tulang *Calcaneus* Tikus Model Arthritis Reumatoid

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan 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 : Juli 2012
Yang menyatakan



(Margaretha S.M.U.)

ABSTRAK

Nama : Margaretha S.M.U.
Program Studi : Farmasi
Judul : Efek Ekstrak Etanol 70% Rumput Mutiara (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk.) terhadap Penurunan Jumlah Osteoklas Tulang *Calcaneus* Tikus Model Arthritis Reumatoid

Rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk.) telah terbukti secara empiris untuk mengatasi berbagai gejala inflamasi kemudian sitokin inflamasi yang dihasilkan dapat menyebabkan pembentukan dan aktivasi osteoklas sehingga terjadi risiko resorpsi tulang berlebihan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jumlah osteoklas setelah pemberian ekstrak etanol 70% rumput mutiara ditinjau dari histologi tulang *calcaneus* tikus dengan volume udem telapak kaki tikus menggunakan pletismometer sebagai parameter pendukung. Penelitian ini menggunakan modifikasi metode *adjuvant-induced arthritis*, dilakukan pada 36 tikus jantan, terbagi dalam 6 kelompok. Kelompok-kelompok tersebut diinduksi pada hari ke-1 dengan *Complete Freund's Adjuvant* secara subplantar, kecuali kontrol normal yang diinduksi larutan salin. Bahan uji diberikan secara oral pada hari ke-2 sampai 28 pada tiga kelompok dosis, yaitu 28,06 mg/200 g BB; 63,13 mg/200 g BB; dan 142,04 mg/200 g BB. Pengukuran volume telapak kaki dilakukan pada hari ke-1, 7, 14, 21, 28. Pembuatan histologi dilakukan setelah perlakuan berakhir. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga dosis tidak berefek menurunkan volume udem secara bermakna, tetapi dosis 63,13 mg/200 g BB merupakan dosis terbaik yang dapat menurunkan jumlah osteoklas tulang secara bermakna. Hasil ini menunjukkan bahwa rumput mutiara dapat diteliti lebih lanjut sebagai pengobatan arthritis reumatoid, terutama pencegahan terjadinya resorpsi tulang berlebihan.

Kata kunci : arthritis reumatoid, *calcaneus*, *Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk., histologi, osteoklas
xv + 106 halaman ; 12 gambar; 10 tabel; 13 lampiran
Daftar Pustaka : 74 (1987-2012)

ABSTRACT

Name : Margaretha S.M.U.
Program Study : Pharmacy
Title : The Effect of 70% Ethanolic Extract of Pearl Grass (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk.) in Osteoclasts Reduction in Calcaneus Bone of Male Rats Rheumatoid Arthritis Model

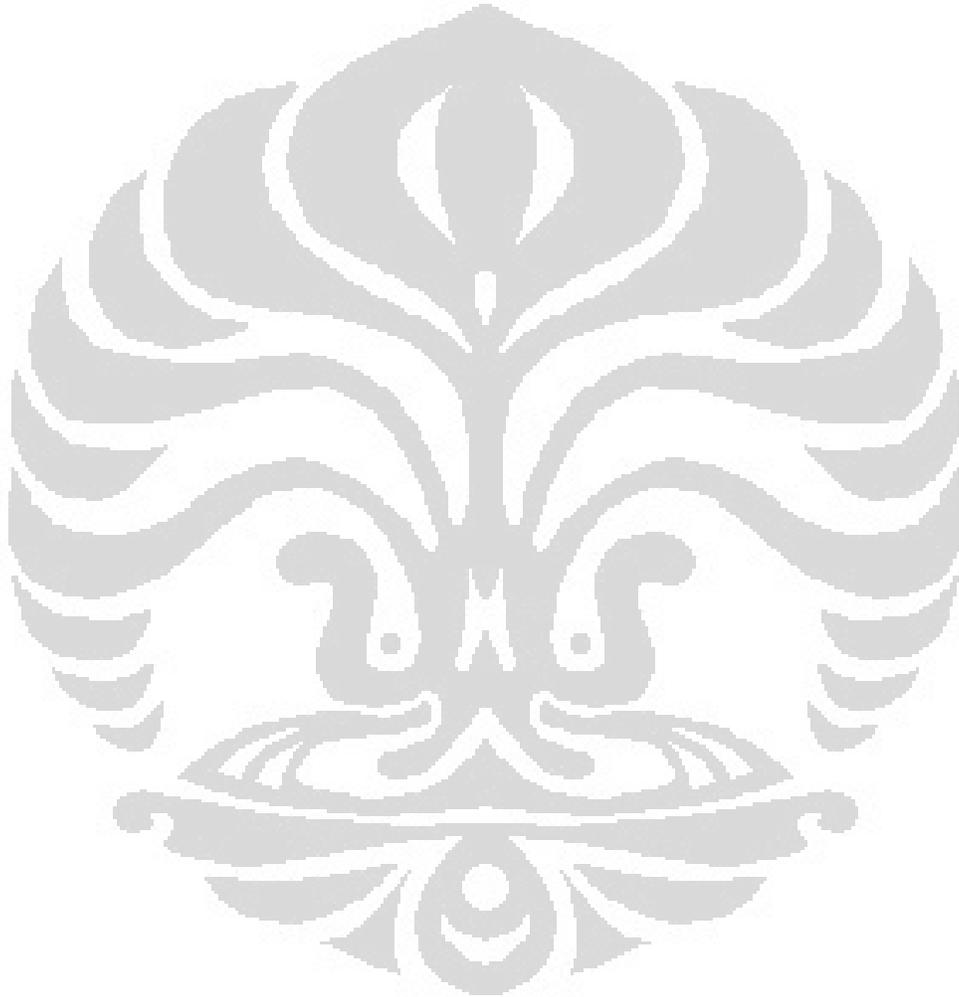
Pearl grass (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk.) has been empirically proven to decrease the various symptoms of inflammation then inflammatory cytokines produced may lead to osteoclasts formation and activation that leading to the risk of excessive bone resorption. This study aimed to determine the number of osteoclasts after administration of pearl grass 70% ethanolic extract in terms of rats calcaneus bone histology with paw edema volume using pletismometer as supporting parameter. This study used a modified method of adjuvant-induced arthritis, conducted on 36 male rats, divided into 6 groups. These groups were induced on day-1 with *Complete Freund's Adjuvant* by subplantar injection, except normal control. Each group was administered orally on days 2 until 28 with 28.06 mg/200 g BW, 63.13 mg/200 g BW, and 142.04 mg/200 g BW doses. Paw volume measurements performed on day 1, 7, 14, 21, 28. Histology was processed after treatment ended. All of doses could not significantly reduce the edema volume, but 63.13 mg/200 g BW dose is the best dose that can decrease the bone osteoclast significantly. These results indicate that the pearl grass can be further investigated as a treatment for rheumatoid arthritis, especially for the prevention of excessive bone resorption.

Key word : calcaneus, *Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk., histology, osteoclast, rheumatoid arthritis
xv + 106 pages ; 12 pictures; 10 tables; 13 appendices
Bibliography : 74 (1987 - 2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah dan Ruang Lingkup	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Jenis Penelitian dan Metode.....	3
1.5 Hipotesis	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Rumput Mutiara (<i>Hedyotis corymbosa</i> (L.) Lamk.)	5
2.2 Arthritis Reumatoid	6
2.3 Natrium Diklofenak	13
2.4 Metode Ekstraksi	14
2.5 Metode Uji Antiarthritis	16
2.6 <i>Complete Freund's Adjuvant</i> (CFA)	18
2.7 Teknik Histologi	19
BAB 3. METODE PENELITIAN	23
3.1 Tempat dan Waktu	23
3.2 Bahan	23
3.3 Peralatan	23
3.4 Cara Kerja	24
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1 Tinjauan Umum	34
4.2 Penyiapan Ekstrak Etanol.....	35
4.3 Penetapan Rendemen	36
4.4 Hasil Penapisan Fitokimia.....	36
4.5 Uji Efek Antiarthritis	37
4.6 Histologi Tulang dan Pengamatan Osteoklas.....	45

4.7 Hubungan antara Penurunan Jumlah Osteoklas Tulang <i>Calcaneus</i> dengan Efek Antiartritis Ekstrak Etanol 70% Rumput Mutiara.....	47
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	51
5.1 Kesimpulan	51
5.2 Saran	51
DAFTAR ACUAN	52



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Proses kerja sitokin inflamasi dalam menyebabkan artritis reumatoid dan penyakit autoimun lainnya	8
Gambar 3.1	Tanaman rumput mutiara	60
Gambar 3.2	Pletismometer dan cara pengukuran volume kaki tikus.....	60
Gambar 3.3	Bagian tulang yang diisolasi.....	61
Gambar 3.4	Proses dekalsifikasi tulang <i>calcaneus</i> menggunakan larutan Na_2EDTA dengan pengadukan konstan	61
Gambar 3.5	<i>Rotary microtome</i> untuk memotong jaringan	61
Gambar 4.1	Ekstrak etanol rumput mutiara.....	36
Gambar 4.2	Perbandingan volume rata-rata telapak kaki tikus pada hari ke-1 sampai 28 setelah diinduksi 0,1 ml <i>Complete Freund's Adjuvant</i> (CFA) pada semua kelompok perlakuan	40
Gambar 4.3	Persentase penghambatan udem pada hari ke-7, 14, 21, dan 28 setelah diinduksi 0,1 ml <i>Complete Freund's Adjuvant</i> (CFA) pada semua kelompok perlakuan kecuali kontrol normal dan kontrol negatif	42
Gambar 4.4	Preparat histologi tulang dengan menggunakan pewarnaan hematoksilin dan eosin, pengamatan dengan mikroskopi optik, perbesaran 100x	62
Gambar 4.5	Perbandingan jumlah osteoklas per mm^2 pada setiap kelompok perlakuan.....	46
Gambar 4.6	Penampakan telapak kaki tikus dilihat dari permukaan telapak kaki pada hari ke-28 setelah induksi	49

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Kelompok perlakuan uji antiarthritis metode <i>adjuvant-induced arthritis</i>	29
Tabel 4.1	Hasil penapisan fitokimia pada ekstrak etanol 70% rumput mutiara	37
Tabel 4.2	Volume telapak kaki tikus pada hari ke-1 sampai 28 setelah diinduksi 0,1 ml <i>Complete Freund's Adjuvant</i> (CFA) pada semua kelompok perlakuan kecuali kontrol normal.....	64
Tabel 4.3	Volume rata-rata telapak kaki tikus pada hari ke-1 sampai 28 setelah diinduksi 0,1 ml <i>Complete Freund's Adjuvant</i> (CFA) pada semua kelompok perlakuan, kecuali kontrol normal.....	39
Tabel 4.4	Persentase penghambatan udem rata-rata pada hari ke-7, 14, 21, dan 28 setelah diinduksi 0,1 ml <i>Complete Freund's Adjuvant</i> (CFA) pada semua kelompok perlakuan kecuali kontrol normal	65
Tabel 4.5	Perbandingan ada tidaknya perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan berdasarkan hasil uji Mann-Whitney	66
Tabel 4.6	Jumlah osteoklas setiap kelompok perlakuan pada pengamatan histologi tulang <i>calcaneus</i>	67
Tabel 4.7	Jumlah osteoklas setiap kelompok perlakuan pada pengamatan histologi tulang <i>calcaneus</i> per mm ²	67
Tabel 4.8	Jumlah osteoklas rata-rata setiap kelompok perlakuan.....	68
Tabel 4.9	Perbandingan jumlah osteoklas dan volume telapak kaki rata-rata pada hari ke-28 semua kelompok perlakuan	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Penentuan dosis dan pembuatan bahan uji	70
Lampiran 2.	Penentuan persentase penghambatan volume udem rata-rata.....	72
Lampiran 3.	Uji statistik volume telapak kaki tikus seluruh kelompok uji pada hari ke-1.....	73
Lampiran 4.	Uji statistik volume telapak kaki tikus seluruh kelompok uji pada hari ke-7.....	76
Lampiran 5.	Uji statistik volume telapak kaki tikus seluruh kelompok uji pada jam ke-14.....	81
Lampiran 6.	Uji statistik volume telapak kaki tikus seluruh kelompok uji pada hari ke-21.....	86
Lampiran 7.	Uji statistik volume telapak kaki tikus seluruh kelompok uji pada hari ke-28.....	91
Lampiran 8.	Uji statistik jumlah osteoklas histologi tulang calcaneus tikus seluruh kelompok uji	96
Lampiran 9.	Sertifikat analisis natrium diklofenak dari PT. Kimia Farma.....	101
Lampiran 10.	Sertifikat analisis <i>Complete Freund's Adjuvant (CFA)</i> dari Sigma-Aldrich.....	102
Lampiran 11.	Sertifikat determinasi tanaman rumput mutiara dari Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada	103
Lampiran 12.	Sertifikat hewan uji	105
Lampiran 13.	Skema kerja pelaksanaan uji antiartritis dan pengerjaan histologi tulang	106

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Artritis Reumatoid adalah penyakit sistemik kronis yang mempengaruhi sendi, jaringan penghubung, otot, tendon, dan jaringan fibrosa. Penyakit ini cenderung menyerang usia dewasa paling produktif, antara usia dua puluh hingga empat puluh tahun, dan merupakan kondisi ketidakmampuan kronis yang sering menyebabkan nyeri dan deformitas. Prevalensi penyakit ini bervariasi antara 0,3% dan 1%; paling sering menyerang wanita, serta biasanya terjadi pada negara-negara berkembang. Setelah onset sepuluh tahun, sedikitnya 50% pasien di negara berkembang tidak dapat melakukan pekerjaan dalam waktu kerja yang penuh. (WHO, 2012). Kasus artritis reumatoid diperkirakan berkisar antara 0,1 % sampai dengan 0,3 % dari jumlah penduduk Indonesia (Nasution, 2011). Gambaran klinis umum dari artritis reumatoid adalah inflamasi berupa demam, rasa lemah, nyeri tubuh, dan pembengkakan sendi (Corwin, 2001).

Sebagaimana penyakit tulang dan sendi lainnya seperti osteoporosis, *lytic bone metastasis*, periodontitis, dan *Paget's disease*, artritis reumatoid ditandai dengan terjadinya resorpsi tulang yang progresif dan berlebihan oleh osteoklas (Boyle et al., 2003; Lee, Jin, Shim, Kim, Ha, & Lee, 2010). Beberapa penelitian terdahulu telah menemukan bahwa osteoklas merupakan sel efektor penting dalam inflamasi terinduksi penurunan massa tulang dan penyakit yang melibatkan lisis tulang secara abnormal, seperti artritis reumatoid. Selain itu, penelitian *in vitro* maupun *in vivo* juga telah menunjukkan bahwa banyak sitokin yang dihasilkan saat inflamasi memiliki peran terhadap diferensiasi dan aktivasi osteoklas. Oleh karena itu, saat ini strategi pengobatan pada penyakit tulang berfokus pada penekanan destruksi tulang dan inflamasi yang berhubungan dengan kehilangan massa tulang (Han et al., 2007). Penelitian mengenai agen antiinflamasi yang memiliki efek penghambatan pembentukan osteoklas juga telah banyak dilakukan sehingga respon inflamasi dan resorpsi tulang abnormal dapat diatasi dengan penggunaan satu jenis terapi antiinflamasi, khususnya antinflamasi non-steroid (Karakawa et al., 2011).

Antiinflamasi non-steroid yang biasanya digunakan untuk pengobatan artritis reumatoid adalah selekoksib, indometasin, dan natrium diklofenak (Wells et al., 2009). Akan tetapi, masyarakat semakin menyadari bahwa penggunaan obat sintetis juga disertai dengan terjadinya berbagai reaksi obat yang tidak diinginkan sehingga penggunaan obat herbal banyak menjadi pilihan bagi terapi artritis reumatoid. Salah satu tanaman yang mengandung agen antiinflamasi alami adalah rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk.). Tanaman ini telah terbukti memiliki efek antiinflamasi secara *in vitro* pada dosis 50 µg/ml (Ahmad, Alib, Israfi, & Ismaila, 2005). Rumput mutiara telah lama digunakan pula secara tradisional untuk pengobatan radang kantung empedu, radang akut usus buntu, radang amandel, kanker, dan hepatitis (Wijayakusuma, 2008). Tanaman ini juga digunakan sebagai agen antiinflamasi kuat pada pengobatan secara empiris di klinik herbal (Herbal Insani, 2012; wawancara dengan dr. Ipak Ridmah Rikenawaty, 5 Januari 2012).

Penelitian ini dilakukan untuk menguji efek penghambatan osteoklastogenesis dari tanaman rumput mutiara dengan menggunakan sejumlah hewan uji tikus putih jantan terinduksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) yang dikelompokkan ke dalam beberapa kelompok dosis. Dosis ekstrak diberikan dalam tiga kelompok dosis yang digunakan berdasarkan konversi dari dosis manusia ke dosis tikus sebagai hewan coba. Dosis serbuk kering rumput mutiara sebagai antiinflamasi untuk manusia yang telah digunakan secara empiris adalah sehari 2x2 kapsul serbuk kering produksi CV. Herbal Insani (Herbal Insani, 2012) dan 3x3 kapsul serbuk kering berdasarkan persepan praktek dokter herbal di Klinik Pala Farma, Depok (wawancara dengan dr. Ipak Ridmah Rikenawaty, 5 Januari 2012), sedangkan dosis pertama merupakan pembagian 2,25 kali dari jumlah dosis kedua. Penelitian dilakukan dengan beberapa variasi dosis ekstrak rumput mutiara untuk mengetahui dosis optimal rumput mutiara sebagai agen antiinflamasi dan inhibitor osteoklastogenesis sehingga diharapkan ekstrak rumput mutiara dapat bermanfaat bagi terapi pasien artritis reumatoid sekaligus dapat mencegah terjadinya penurunan kepadatan tulang akibat aktivitas osteoklas yang berlebihan.

1.2 Perumusan Masalah dan Ruang Lingkup

1.2.1 Perumusan Masalah

Inflamasi yang dialami oleh pasien artritis reumatoid disertai pembentukan sitokin inflamasi yang dapat menginduksi pembentukan dan pematangan osteoklas. Osteoklas merupakan sel yang berfungsi meresorpsi tulang pada proses *remodelling* tulang normal, tetapi pada pembentukan dan aktivitas berlebihan dapat menyebabkan osteoporosis pada jangka panjang. Berdasarkan literatur, rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk.) memiliki efek antiinflamasi yang dapat menghambat sitokin inflamasi. Penelitian ini menganalisis mengenai apakah pemberian ekstrak etanol 70% rumput mutiara memiliki efek terhadap penurunan jumlah osteoklas pada histologi tulang *calcaneus* tikus putih jantan model artritis reumatoid.

1.2.2 Ruang Lingkup

Farmakologi

1.3 Tujuan

Mengetahui efek penurunan jumlah osteoklas setelah pemberian ekstrak etanol 70% rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk.) terhadap tikus putih jantan model artritis reumatoid yang diinduksi CFA.

1.4 Jenis Penelitian dan Metode

1.4.1 Jenis Penelitian

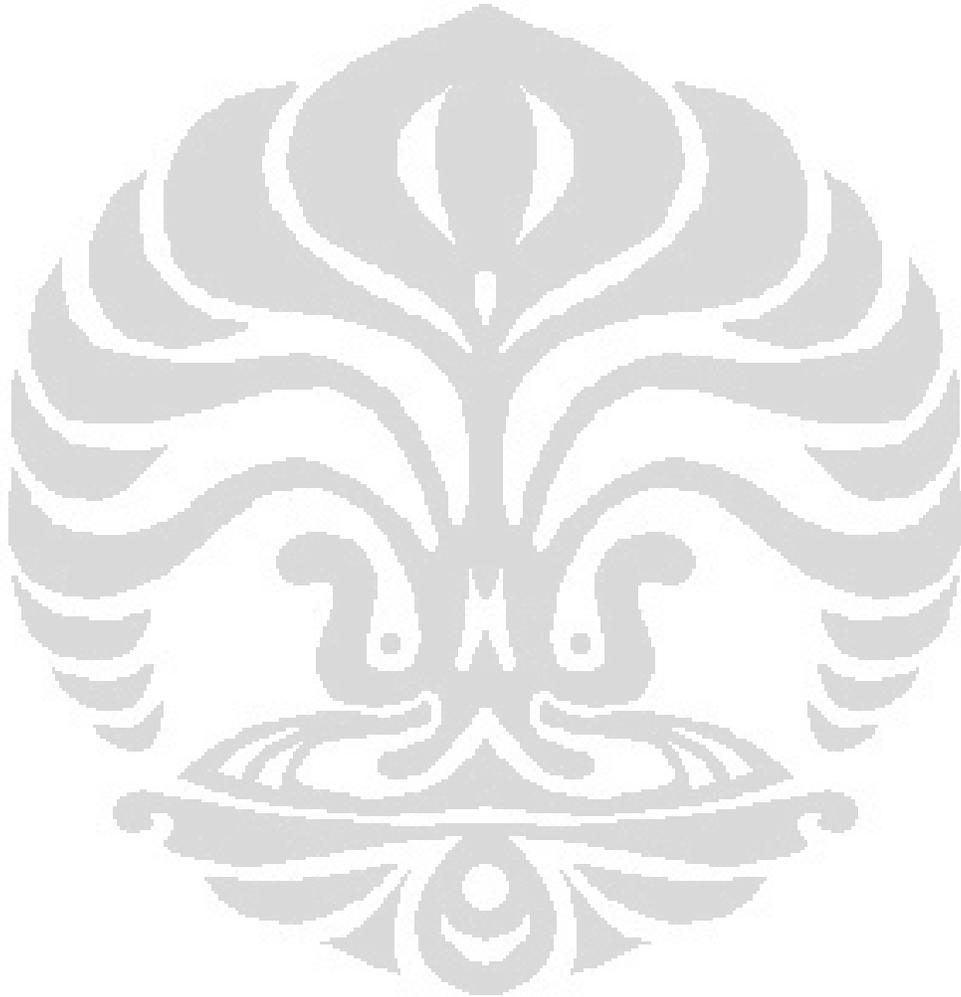
Eksperimental

1.4.2 Metode

Kelompok dosis dan kontrol diinduksi dengan CFA pada hari pertama dan pemberian dosis terapi pada hari ke-2 sampai ke-28. Pengukuran inflamasi dilakukan dengan pletismometer. Pengamatan histologi tulang dilakukan secara mikroskopik dengan membandingkan jumlah osteoklas yang terdapat pada histologi kelompok normal, dosis, dan kontrol setelah hari ke-28.

1.5 Hipotesis

Ekstrak etanol 70% tanaman rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk.) dapat menurunkan jumlah osteoklas pada tulang *calcaneus* tikus putih jantan model artritis reumatoid yang diinduksi CFA.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rumput Mutiara (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk.)

2.1.1 Klasifikasi dan Tata Nama

2.1.1.1 Klasifikasi (USDA, 2012)

Dunia	: Plantae
Subdunia	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Asteridae
Bangsa	: Rubiales
Suku	: Rubiaceae
Marga	: <i>Oldenlandia</i> L.
Jenis	: <i>Hedyotis corymbosa</i> L.

2.1.1.2 Nama Daerah

Rumput siku-siku, bunga telur, belungkas (Indonesia); daun mutiara, rumput mutiara (Jakarta); katepan, urek-urek polo, lidah ular (Jawa); pengka (Makassar); *Shui xian cao* (China) (Depkes RI, 1995; Dalimartha, 2008).

2.1.2 Deskripsi

Rumput mutiara tumbuh subur pada tanah lembab di tepi jalan, pinggir selokan, atau di tanah telantar. Terna, tumbuh rindang berserak karena banyak percabangan, batang bersegi, agak lemah, tinggi 15-50 cm. Daun letak berhadapan bersilangan, bertangkai sangat pendek. Helaian daun bentuk lanset, ujung runcing berambut pendek, pangkal menyempit, tepi rata, tulang daun satu di tengah, panjang daun 1-3 cm, lebar 1,5 mm sampai 5 mm warna hijau muda, permukaan bawah berwarna keabu-abuan. Batang persegi empat, bercabang tebal lebih kurang 1 mm, warna hijau kecoklatan sampai hijau keabu-abuan. Bunga majemuk 2-5, keluar dari ketiak daun, berbentuk payung berwarna putih, tangkai bunga

induk keras seperti kawat, dan panjang 5-10 mm. Buah memiliki panjang 1,75 mm sampai 2 mm, lebar 2 mm sampai 2,5 mm, pada permukaan luar di dekat bagian ujung terdapat sisa kelopak berupa tonjolan kecil runcing. Biji bersudut-sudut. Akar tunggang, warna kecoklatan, garis tengah lebih kurang 1 mm, akar cabang serupa benang-benang (Depkes RI, 1995; Dalimartha, 2008).

2.1.3 Kandungan Kimia

Rumput mutiara mengandung flavonoid, tanin, triterpenoid, glikosida iridoid, henriakontan, stigmasterol, asam ursolat, β -sitosterol, sitosterol-D-glukosida, asam-p-kumarat, asam oleat, *baihuasheshecaosu* (kemungkinan analog kumarin), alizarin, krorogenin, dan ikatan antragalol (Depkes RI, 1995; Soenanto, 2005; Wijayakusuma, 2008).

2.1.4 Persyaratan Simplisia

Persyaratan simplisia adalah kadar abu tidak lebih dari 12%, kadar abu yang tidak larut dalam asam tidak lebih dari 2%, kadar sari yang larut dalam air tidak kurang dari 10%, dan kadar sari yang larut dalam etanol tidak kurang dari 7% (Depkes RI, 1995).

2.1.5 Kegunaan

Efek farmakologis tanaman ini adalah untuk menghilangkan panas dan toksik, antiradang, diuretik, menyembuhkan bisul (antikarbunkular), antipiretik, antikanker, dan melancarkan sirkulasi darah. Tanaman ini telah lama digunakan secara tradisional untuk pengobatan radang kandung empedu, radang akut usus buntu, radang amandel, kanker, dan hepatitis (Dalimartha, 2008; Wijayakusuma, 2008).

2.2 Arthritis Reumatoid

2.2.1 Definisi

Arthritis reumatoid adalah suatu prototipe dari arthritis yang bersifat destruktif. Penyakit ini secara langsung menyebabkan kerusakan sendi, dengan sedikit kemungkinan untuk membaik. Kerusakan struktural pada arthritis reumatoid telah diidentifikasi menggunakan radiografi konvensional untuk mendeteksi

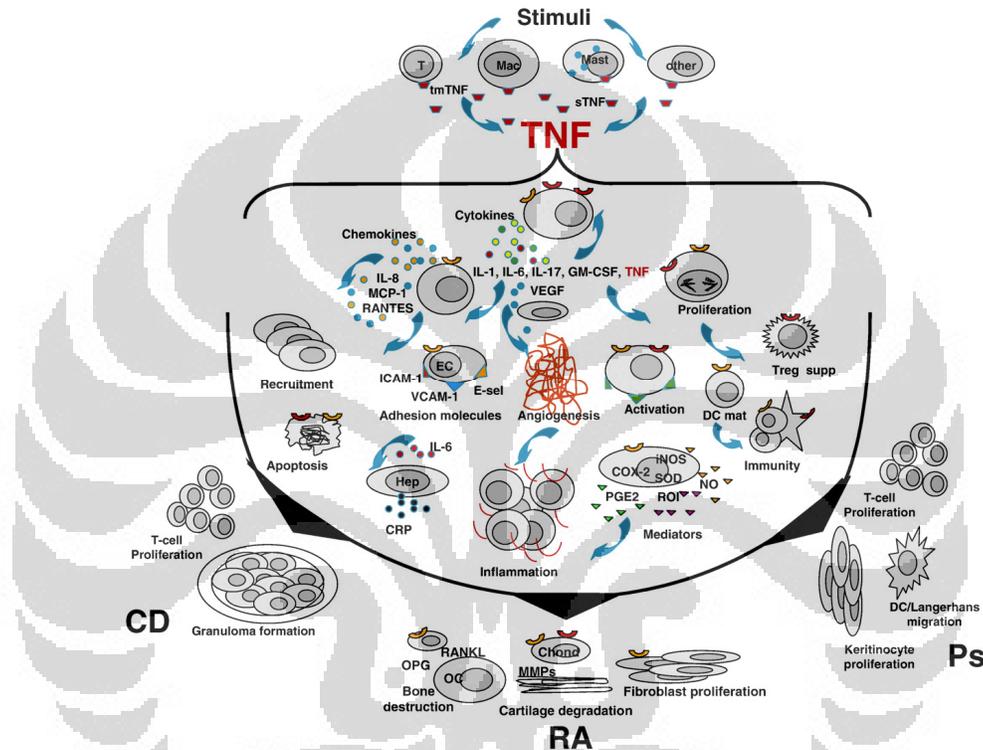
pengikisan tulang kortikal, penyempitan ruang sendi, dan osteoporosis periartikular. Pengikisan tulang telah dianggap sebagai sebuah indikator dari kerusakan ireversibel akibat inflamasi berkelanjutan pada membran sinovial tulang (Schett, Coates, Ash, Finzel, & Conaghan, 2011).

2.2.2 Patofisiologi

Arthritis reumatoid merupakan akibat dari disregulasi komponen humoral dan komponen termediasi sel sistem imun. Sebagian pasien memproduksi antibodi yang disebut faktor reumatoid. Immunoglobulin dapat mengaktivasi sistem komplemen, yang memperkuat respon imun dengan meningkatkan kemotaksis, fagositosis, dan pelepasan limfokin yang kemudian disajikan ke limfosit T. Antigen yang diproses tersebut dikenali oleh protein *major histocompatibility complex* (MHC) pada permukaan limfosit, mengakibatkan aktivasi sel T dan B. *Tumor Necrosis Factor* (TNF), interleukin-1 (IL-1), dan IL-6 adalah sitokin proinflamasi penting dalam inisiasi dan kelanjutan dari inflamasi. Sel T yang telah diaktivasi memproduksi sitotoksin, yang secara langsung bersifat toksik terhadap jaringan, dan sitokin, yang menstimulasi aktivasi lebih lanjut dari proses inflamasi dan menarik sel ke area inflamasi. Makrofag distimulasi untuk melepaskan prostaglandin dan sitotoksin. Sel B teraktivasi menghasilkan sel plasma pembentuk antibodi, yang pada kombinasi dengan komplemen menghasilkan akumulasi leukosit polimorfonuklear. Leukosit polimorfonukleat melepaskan sitotoksin, oksigen radikal bebas, dan radikal hidroksi yang mendorong kerusakan sel sinovial dan tulang (Wells et al., 2009).

Salah satu sitokin inflamasi yang terlibat adalah *tumor necrosis factor* (TNF) yang aktivitasnya berhubungan dengan respon inflamasi serta aktivitas biologis lainnya seperti osteoklastogenesis. Membran sinovial yang membatasi ruang antar-sendi mengalami inflamasi akibat peningkatan vaskularitas dan influks dari sel-sel mediator inflamasi. Menurut Ulfgren et al. (1995); Tak et al. (1997); Ulfgren et al. (2000); Choy & Panayi (2001), TNF khususnya lebih kuat pada permukaan invasif, yaitu pannus kartilago. Jaringan sinovial pada pasien arthritis reumatoid mengandung TNF dan sitokin proinflamasi lain, misalnya IL-1, tanpa dipengaruhi oleh waktu perkembangan penyakit tersebut. Sebagaimana

diterangkan pada Gambar 2.1, TNF dan sitokin inflamasi lainnya dapat merangsang terbentuknya mediator inflamasi termasuk prostaglandin, hasil konversi oleh enzim siklooksigenase, yang pada akhirnya akan menyebabkan resorpsi tulang akibat interaksi antara RANKL dengan RANK. (Tracey, Klareskog, Sasso, Salfeld, & Tak, 2008)



[Sumber: Tracey, Klareskog, Sasso, Salfeld, & Tak, 2008, telah diolah kembali]

Keterangan: CD= Crohn's disease; COX-2= cyclooxygenase-2; CRP= C-reactive protein; E-Sel= e-selectin; GM-CSF= granulocyte macrophage-colony stimulating factor; ICAM-1= intercellular adhesion molecule-1; IL= Interleukin; i-NOS= nitric oxide synthase; MCP-1= macrophage chemottractant protein-1; MMP= matrix metalloproteinase; NO= nitric oxide; OC= osteoclasts; OPG= osteoprotegerin; PGE2= prostaglandin E2; Ps= Paget's disease; RA= rheumatoid arthritis; RANKL= receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; RANTES= regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted; ROI= reactive oxygen intermediates; SOD= superoxide dismutase; sTNF= soluble tumor necrosis factor; TNF= tumor necrosis factor; VCAM-1= vascular adhesion molecule-1; VEGF= vascular endothelial growth factor

Gambar 2.1 Proses kerja sitokin inflamasi dalam menyebabkan artritis reumatoid dan penyakit autoimun lainnya

Osteoklas yang meresorpsi tulang merupakan sel efektor penting dalam kehilangan massa tulang terinduksi inflamasi. Jalur RANK (*Receptor Activator*

Universitas Indonesia

for Nuclear κB) atau *RANK Ligand* telah diteliti penting untuk diferensiasi osteoklas pada destruksi tulang akibat inflamasi. Studi *in vitro* dan *in vivo* telah menunjukkan bahwa banyak sitokin yang dihasilkan saat inflamasi, termasuk sitokin proinflamasi TNF- α dan interleukin 1 memiliki peran terhadap diferensiasi dan aktivasi osteoklas (Han et al., 2007). Faktor-faktor ini menstimulasi baik progenitor osteoklas maupun berpartisipasi dalam sistem parakrin di mana sel sumsum tulang dan osteoblas memegang peranan utama di dalamnya. Sistem parakrin ini penting untuk metabolisme tulang, mediatornya termasuk RANK, RANKL, osteoprotegerin (OPG). RANK merupakan anggota reseptor golongan TNF yang diekspresikan terutama pada sel makrofag atau sel monosit yang dapat berdiferensiasi menjadi osteoklas (preosteoklas). Ketika reseptor ini terikat dengan RANKL melalui kontak antarsel, proses osteoklastogenesis dimulai. RANKL berperan terutama dalam metabolisme tulang sebagai stimulator pembentukan, fusi, diferensiasi, aktivasi, dan kelangsungan hidup dari osteoklas. Aksi RANKL dapat dihambat oleh osteoprotegerin. Osteoprotegerin menghambat osteoklastogenesis dengan beraksi sebagai pengikat reseptor RANKL sehingga tidak terjadi interaksi antara RANK dengan RANKL (Kumar, Vinay, Abbas, & Fausto, 2005).

Mekanisme inflamasi yang terjadi akibat pelepasan sitokin inflamasi salah satunya adalah produksi enzim siklooksigenase (COX). COX mengkatalisis konversi asam arakidonat menjadi prostaglandin H₂ yang kemudian akan dikonversi lagi menjadi satu dari beberapa prostaglandin bergantung pada sel yang terlibat. Terdapat dua isoform dari siklooksigenase, yaitu siklooksigenase-1 (COX-1) dan siklooksigenase-2 (COX-2). Menurut Murphy & Fitzgerald (2001) serta von Rahden (2005) COX-1 merupakan enzim yang terdapat secara konstan dalam sebagian besar sel. Fungsi COX-1 antara lain adalah merangsang produksi mukosa gastrik dan agregasi platelet (Dermond & Ruegg, 2001). Sedangkan menurut Cha, Solnica-Krezel, & DuBois (2006), COX-2 yang tidak terdapat secara normal dalam sel diinduksi secara cepat oleh mediator interselular termasuk faktor pertumbuhan, mediator inflamasi, dan promotor tumor (Murphy, 2008).

Senyawa vasoaktif seperti histamin, kinin, dan prostaglandin yang dilepaskan di lokasi inflamasi, meningkatkan aliran darah dan permeabilitas vaskular. Hal ini menyebabkan edema, suhu tubuh menjadi hangat, eritema, dan nyeri, serta memudahkan granulosit melalui pembuluh darah menuju lokasi inflamasi (Wells et al., 2009).

2.2.3 Gejala Kinis

Gejala prodromal nonspesifik yang berkembang tanpa gejala setelah berminggu-minggu hingga berbulan-bulan yang mencakup kelelahan, kelemahan, demam ringan, kehilangan nafsu makan, nyeri sendi, kekakuan, dan mialgia dapat mendahului sinovitis. Keterlibatan sendi cenderung simetris dan mempengaruhi sendi-sendi kecil dari tangan, pergelangan tangan, dan kaki. Siku, bahu, pinggang, lutut, dan pergelangan kaki juga dapat terkena pengaruhnya. Kekakuan sendi memburuk di pagi hari, biasanya lebih dari 30 menit, dan dapat bertahan sepanjang hari (Wells et al., 2009).

2.2.4 Diagnosis

Abnormalitas hasil laboratorium yang dapat terlihat adalah anemia normositik dan normokromik; trombositosis atau trombositopenia; leukopenia; peningkatan laju sedimentasi eritrosit dan *C-reactive protein*; faktor reumatoid positif (60%-70% pasien); antibodi *anticyclic citrullinated peptide* positif (50%-85% pasien); antibodi antinukleat positif (25% pasien). Pemeriksaan terhadap aspirasi cairan sinovial akan memperlihatkan turbiditas, leukositosis, penurunan viskositas, dan glukosa normal atau rendah relatif terhadap konsentrasi serum. Uji radiologi menemukan secara dini bahwa penyakit dapat menyebabkan pembengkakan jaringan lunak dan osteoporosis periartikular. Erosi yang terjadi kemudian pada penyakit ini biasanya terlihat pertama pada sendi *metacarpophalangeal* dan *interphalangeal* proksimal tangan serta sendi *metatarsophalangeal* pada kaki (Wells et al., 2009).

2.2.5 Outcome yang diinginkan

Tujuan utama adalah untuk mengurangi pembengkakan, kekakuan, dan nyeri sendi; menjaga rentang gerak dan fungsi sendi; memperbaiki kualitas hidup; mencegah komplikasi sistemik; memperlambat perubahan destruktif sendi (Wells et al., 2009).

2.2.6 Terapi

2.2.6.1 Nonfarmakologi

Istirahat yang cukup, mengurangi berat badan jika obesitas, terapi dengan memberi pekerjaan tertentu, terapi fisik, serta penggunaan alat bantu yang dapat memperbaiki gejala dan memelihara fungsi sendi. Pasien dengan penyakit parah bisa mendapatkan manfaat dari operasi seperti tenosinovektomi, perbaikan tendon, dan penggantian sendi. Pendidikan pasien mengenai penyakit ini dan manfaat serta keterbatasan terapi obat penting untuk dilakukan (Wells et al., 2009).

2.2.6.2 Farmakologi

a. *Disease-modifying antirheumatic drug* (DMARD)

Sampai sekarang, terapi tradisional artritis reumatoid bertujuan untuk mengurangi inflamasi dan gejala pasien dengan DMARDs (*Disease-modifying antirheumatic drugs*). Mekanisme dari obat yang digunakan secara luas ini, meskipun telah dilakukan studi dan aplikasi selama bertahun-tahun, masih sering belum diketahui (Lukas, Combe, & Morel, 2007).

Lini pertama adalah metotreksat, hidroklorokuin, sulfasalazin, dan leflunomid. Agen biologis yang berefek memodifikasi reumatik antara lain anti-TNF (infliximab, adalimumab). Obat lain yang lebih jarang digunakan adalah azatioprin, penisilamin, minosiklin, siklosporin, siklofosfamid. Kombinasi dua atau lebih DMARD efektif jika terapi tunggal tidak berhasil. Kombinasi yang efektif antara lain, yaitu metotreksat dan siklosporin atau metotreksat dengan sulfasalazin dan hidroklorokuin (Wells et al., 2009). Menurut penelitian Pullar, Hunter, & Capell (1987) dan Rich Moreland, & Alarcon (1999), metotreksat maupun sulfasalazin telah terbukti dapat menghambat progresi artritis reumatoid

berdasarkan pengamatan radiologis pada penggunaan tunggal, sedangkan kombinasi keduanya juga telah terbukti memiliki efek penghambatan yang sama pada penelitian Boers et al. (1997), Calguneri et al. (1999), dan Mottonen et al. (1999) (Lee, C.K., Lee, E.Y., Chung, Mun, Yoo, & Moon, 2004).

Metotreksat (MTX), obat antagonis folat, merupakan obat antireumatik yang digunakan secara luas dan sering dikombinasikan dengan obat-obat lain seperti salazosulfapiridin (SASP). *Bucillamine* (Buc) digunakan secara klinis di Jepang dan Korea untuk mengobati pasien artritis reumatoid. MTX, Buc, dan SASP memiliki efek supresif terhadap diferensiasi osteoklas dengan cara bekerja pada sel prekursor osteoklas dan menghambat ekspresi NFATc1 (*Nuclear Factor of Activated T-cells*) yang dimediasi RANKL. Selain itu, MTX dan SASP memiliki efek inhibisi pada ekspresi RANKL di sel mesenkim. Telah dilaporkan bahwa MTX, Buc, dan SASP menghambat aktivasi sel T dan respon inflamasi pada sel sinovial (Suematsu et al., 2007).

b. Antiinflamasi nonsteroid (AINS)

Obat golongan antiinflamasi ini memiliki efek terapi yang lebih cepat dibandingkan DMARD dan berguna untuk meredakan gejala jika diperlukan (Wells et al., 2009). Antiinflamasi non-steroid (AINS) pada umumnya diresepkan untuk meringankan nyeri muskuloskeletal akut dan kronis. Kerusakan muskuloskeletal akut ditandai dengan pembesaran jaringan terlokalisasi, inflamasi, dan nyeri serta ditandai dengan peregangan atau kerusakan sebagian ligamen dan tendon atau patah tulang. Patologi muskuloskeletal kronis seperti osteoarthritis juga dihubungkan dengan inflamasi dan pembesaran jaringan yang terlokalisasi. Pengobatan dengan AINS mengurangi inflamasi lokal dan nyeri dengan menghambat siklooksigenase (COX), yang memiliki aktivitas enzimatis dalam mengubah asam arakhidonat menjadi prostaglandin pro-inflamasi. Sebagai hasilnya, penghambatan AINS terhadap COX menurunkan jumlah prostaglandin yang menghambat inflamasi serta bengkak dan nyeri yang timbul. AINS tradisional menghambat aktivitas COX-1 dan COX-2 dengan potensi yang hampir sama dan dapat menyebabkan banyak efek samping. AINS juga biasanya digunakan untuk mengobati kerusakan dan nyeri tulang.

Dosis antiinflamasi selektif COX-2, yaitu selekoksib yang berefek meningkatkan kadar mineral tulang adalah 3 mg/kg/hari pada *adjuvant-induced arthritis* (Noguchi et al., 2008). Dosis natrium diklofenak yang digunakan untuk artritis reumatoid adalah 5 mg/kg BB tikus/hari (Siddalingappa, Rajesh, Kudagi, Krishnakanth, & Sujith, 2011).

c. Kortikosteroid

Dalam sepuluh tahun terakhir telah terlihat peningkatan bukti dari efek penggunaan dosis rendah kortikosteroid untuk pasien artritis reumatoid. Terdapat studi yang telah membuktikan efek kortikosteroid pada kerusakan sendi yang ditunjukkan dengan kemajuan secara radiografis. Meskipun studi termasuk pada penggunaan dosis glukokortikoid yang sangat rendah dan penggunaan yang tidak bersamaan dengan DMARDs, rata-rata penurunan tingkat perkembangan penyakit adalah 70%. Kortikosteroid oral seperti prednison dan metilprednisolon dapat digunakan untuk mengontrol nyeri dan sinovitis pada saat DMARDs akan mulai memberikan efek (*bridging therapy*).

Penelitian lain oleh Choy, Kingsley, Khoshaba, Pipitone, & Scott (2005) mengamati depot steroid yang terdapat pada jaringan intramuskular pada pasien penderita artritis reumatoid selama lebih dari dua tahun. Penelitian ini menunjukkan bahwa pada pasien artritis reumatoid yang tidak terkontrol dengan DMARDs, penambahan metilprednisolon yang terdeposit di intramuskular dapat mengurangi perkembangan penyakit dan memiliki sedikit efek menguntungkan dalam mengurangi pengikisan tulang. Akan tetapi kortikosteroid mengakibatkan efek samping antara lain adalah osteoporosis pada penggunaan dosis tinggi dan berulang dan sindrom *Cushing* yang menyerang kulit (Chauduri & Paul, 2008; Wells et al., 2009).

2.3 Natrium Diklofenak

Diklofenak termasuk ke dalam golongan obat AINS dan digunakan secara luas dalam pengobatan nyeri dan inflamasi menengah, yang merupakan gejala dari berbagai penyakit, termasuk artritis. Diklofenak bekerja dengan menghambat COX, tromboksan, dan prostasiklin. Diklofenak dan metabolitnya memiliki

kecenderungan untuk mencapai konsentrasi lebih besar pada telapak kaki dan tengkuk leher yang meradang pada hewan yang diinjeksi karagenan ketika dibandingkan dengan telapak kaki yang tidak meradang dari hewan yang sama atau hewan kontrol (Schweitzer, Hasler-Nguyen, & Zijlstra, 2009).

Natrium diklofenak diabsorpsi secara cepat pada usus dan melalui metabolisme lintas pertama. Ikatan protein zat aktif adalah 99,7% dan waktu paruh plasma untuk fase eliminasi terakhir adalah 1-2 jam. Waktu untuk mencapai nilai puncak plasma adalah 4-8 jam. Natrium diklofenak memasuki cairan sinovial dengan konsentrasi maksimum didapat setelah 2-4 jam nilai puncak plasma dicapai. Waktu paruh eliminasi dari cairan sinovial adalah 3-6 jam. Dua jam setelah mencapai nilai puncak plasma, konsentrasi zat aktif telah menjadi lebih tinggi dibandingkan di plasma dan tetap lebih tinggi sampai lebih dari 12 jam. Sekitar 60% dari dosis yang diberikan diekskresi melalui ginjal dalam bentuk metabolit dan kurang dari 1% dalam bentuk utuh. Dosis yang tersisa diekskresi melalui empedu dalam bentuk yang telah dimetabolisme. Pada pasien dengan kerusakan fungsi ginjal tidak terdapat akumulasi natrium diklofenak yang dilaporkan (Sandoz Limited, 2009; Schweitzer, Hasler-Nguyen, & Zijlstra, 2009).

Pengobatan dengan diklofenak menurunkan hematokrit, hemoglobin, dan volume korpuskular serta meningkatkan jumlah platelet. Pada hewan coba yang diobati dengan diklofenak meningkatkan kadar urea dan dapat menyebabkan pendarahan gastrointestinal (Sanchez, Alarcon De La Lastra, Ortiz, Motilva, & Martin, 2002).

2.4 Metode Ekstraksi

Kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tanaman perlu ditarik untuk memperoleh senyawa yang lebih murni dengan cara yang khusus dan spesifik. Cara penarikan yang khusus dan spesifik ini dinamakan proses ekstraksi. Ekstraksi adalah proses dinamis yang melibatkan fenomena fisika dan kimia pada tahap awal melalui kontak antara pelarut dengan senyawa tanaman, pengeluaran senyawa kimia dari bagian tanaman, dan disolusi senyawa tersebut, dengan difusi yang bersamaan terhadap lingkungan eksternal, yang bergantung pada afinitas kimia senyawa terhadap pelarut pengestraksi (Lucinda

da Silva, Couto, & Bresolin, 2012). Metode-metode ekstraksi yang sering digunakan antara lain (Depkes RI, 2000):

2.4.1 Cara Dingin

2.4.1.1 Maserasi

Maserasi adalah proses mengekstraksi simplisia dengan cara merendamnya menggunakan pelarut yang sesuai dan wadah yang tertutup pada suhu kamar dengan dilakukan pengadukan sesekali secara konstan untuk meningkatkan kecepatan ekstraksi. Pada prosedur maserasi, terdapat istilah remaserasi, yakni setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, ditambahkan pelarut lalu dilanjutkan maserasi berikutnya, dan seterusnya. Hal ini memakan waktu yang cukup lama bisa beberapa hari bahkan beberapa minggu. Kelemahan lain adalah ekstraksi yang tidak optimal bila ada senyawa yang kurang larut dalam suhu kamar. Namun, itu menjadi salah satu kelebihan maserasi, yakni tidak menyebabkan degradasi dari metabolit yang tidak tahan panas karena dilakukan pada suhu kamar.

2.4.1.2 Perkolasi

Perkolasi adalah proses ekstraksi dengan merendam tanaman dalam pelarut yang sesuai lalu dimasukan ke dalam alat yang dinamakan perkolator. Proses ekstraksi dilakukan dengan menambah pelarut yang baru sampai ekstraksi sempurna yang dilakukan pada suhu ruang. Tahapan ekstraksi meliputi pendahuluan, maserasi antara, dan perkolasi sebenarnya yang dilakukan terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat). Untuk meyakinkan perkolasi telah sempurna, perkolat dapat diuji apakah terdapat metabolit dengan reagen spesifik.

2.4.2 Cara Panas

2.4.2.1 Refluks

Refluks adalah proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang umumnya konstan dengan adanya pendingin balik. Pengulangan ekstraksi pada residu pertama dilakukan 3-5 kali sehingga diperoleh hasil ekstrak yang

sempurna. Refluks memungkinkan senyawa yang tidak tahan panas akan mengalami degradasi.

2.4.2.2 Soxhlet

Soxhlet adalah proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang selalu baru menggunakan alat khusus agar berlangsung secara kontinyu dengan jumlah pelarut konstan dan adanya pendingin balik.

2.4.2.3 Digesti

Digesti adalah proses maserasi dengan pengadukan kontinyu pada suhu yang lebih tinggi dari suhu ruangan yang pada umumnya dilakukan pada suhu 40-50⁰C.

2.4.2.4 Infus

Infus adalah proses ekstraksi dengan pelarut air pada suhu air mendidih (96-98⁰C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

2.4.2.5 Dekok

Dekok adalah proses infus dengan kondisi waktu yang lebih lama (lebih dari 30 menit) pada suhu air mendidih.

2.5 Metode Uji Antiartritis

2.5.1 *Adjuvant-induced arthritis*

Hewan uji diinjeksi secara intraplantar dengan 0,1 ml *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) ke telapak kaki tikus. CFA dipreparasi dengan menggunakan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Pengukuran volume edema yang terjadi akibat inflamasi dilakukan menggunakan metode pletismografi dengan cara mengukur volume air yang digantikan. (Woode et al., 2008)

2.5.2 *Antigen arthritis*

Hewan uji diinjeksi secara intraartikular dengan antigen, yang biasanya merupakan senyawa kationik seperti *methylated bovine serum albumin* (m-BSA).

Kemudian inflamasi akut akan berkembang cepat menyebabkan kerusakan sendi. Hal ini terjadi karena reaksi antara antibodi pada kartilago artikular dengan antigen membentuk kompleks yang mengaktivasi komplemen secara lokal dan menyebabkan kerusakan kartilago (Bendele, 2001).

2.5.3 *Collagen-induced arthritis*

Tikus atau hewan uji diberikan kolagen tipe II homolog atau heterolog. Poliartritis yang terjadi dikarakterisasi dengan destruksi kartilago yang ditandai dan berhubungan dengan deposisi kompleks imun pada permukaan sendi, resorpsi tulang, dan proliferasi periosteal (Bendele, 2001).

2.5.4 *Carragenan-induced arthritis*

Injeksi karagenan (1% b/v) pada kaki belakang hewan uji menyebabkan edema. Edema dipantau dengan mengukur ketebalan pembengkakan telapak kaki pada jam pertama, kedua, ketiga, dan keempat setelah injeksi karagenan menggunakan jangka sorong (Biradar, 2010).

2.5.5 *Formaldehyde-induced arthritis*

Pengukuran volume kaki belakang tikus atau hewan uji diukur mulai pada hari ke-0 untuk pengukuran volume basal. Alat yang digunakan adalah pletismometer. Pada hari pertama dan ketiga, tikus diinjeksi dengan formaldehid dalam larutan salin normal. Kelompok kontrol positif diberikan obat sintesis, sedangkan kelompok yang lain diberikan beberapa dosis ekstrak yang berbeda pada hari yang sama. Volume kaki diukur setiap hari (Biradar, 2010).

2.5.6 *MRL/I arthritis*

Beberapa galur mencit mengalami gejala lesi artritis akibat manipulasi genetik. Hewan ini mengalami perkembangan kompleks imun poliartritis yang berhubungan dengan kelainan limfoproliferasinya. Kejadian dan keparahan yang terjadi diperkuat dengan pemberian sitokin seperti interleukin 1 (Bendele, 2001). Hewan coba MRL/I mengalami perkembangan gejala autoimun *Lupus-like syndrome* (Henderson, Henderson, B., & Edwards, 1995).

2.5.7 *Streptococcal cell wall-induced arthritis*

Poliarthritis diinduksi dengan injeksi peritoneal fragmen dinding sel *Streptococcus* grup A. Inflamasi dipantau dengan pengukuran jaringan yang diinduksi menggunakan mikrometer digital (Richards, 2001).

2.6 *Complete Freund's Adjuvant (CFA)*

Complete Freund's Adjuvant (CFA) merupakan emulsi air dalam minyak yang berisi *Mycobacterium* yang dimatikan oleh pemanasan atau berisi komponen dinding sel *Mycobacterium*. CFA efektif meningkatkan respon antibodi selular dan humoral terhadap imunogen yang diinjeksikan secara bermakna. Aktivitas adjuvan merupakan hasil dari pelepasan lambat antigen dari penyimpanan pada fase minyak dan stimulasi respon imun lokal bawaan yang menyebabkan peningkatan imunitas adaptif. Komponen penting dari respon ini adalah reaksi inflamasi kuat pada lokasi deposisi antigen akibat pembentukan influks leukosit dan interaksinya dengan antigen. CFA yang digunakan secara tidak tepat atau berlebihan dapat menyebabkan efek samping signifikan seperti inflamasi kronik, ulserasi kulit, abses lokal atau peluruhan jaringan (OACU, 2011).

Preparasi antigen harus steril dan idealnya isotonis, pH netral, dan bebas urea, asam asetat, dan pelarut toksik lainnya. *Mycobacterium* dalam CFA di suspensi kembali dengan vortex atau mengocok ampul atau vial. CFA kemudian dipindahkan dari ampul atau vial secara steril. Perhatian harus diberikan pada pencegahan terbentuknya gelembung udara ketika mencampur emulsi CFA-antigen. Meskipun formulasi CFA dengan konsentrasi *Mycobacterium* 0,5 mg/ml tersedia secara komersial dan telah sukses digunakan oleh banyak peneliti, konsentrasi di bawah 0,1 mg/ml direkomendasikan untuk mengurangi inflamasi dan nekrosis akibat konsentrasi yang lebih tinggi (OACU, 2011). Respon inflamasi berupa lesi terdiri dari lesi primer dan sekunder. Lesi primer terjadi dalam 3-5 hari dan lesi sekunder terjadi setelah 11-12 hari terhitung sejak hari ke-0 disuntik CFA (Parmar & Prakash, 2006).

Administrasi intraperitoneal pada mencit telah digunakan untuk memperoleh titer poliklonal atau monoklonal antibodi yang lebih tinggi. Volume

tidak boleh melebihi 0,2 ml. Peritonitis dapat dikurangi dengan mengurangi dosis CFA pada dosis awal pemberian. Injeksi subkutan harus dibatasi pada volume total 0,2 ml dengan pemberian tidak lebih dari 0,1 ml pada satu tempat. Pemberian pada telapak kaki juga dapat dilakukan. Jumlah CFA yang diberikan harus minimal. Selain itu, hewan uji juga harus diberi tempat tinggal dengan alas lembut untuk mencegah kesakitan. Volume maksimal yang diperbolehkan adalah 0,05 ml untuk mencit dan 0,10 ml untuk tikus (University of Iowa, 2012).

2.7 Teknik Histologi

Preparasi jaringan untuk pengamatan histologi tulang menggunakan mikroskop cahaya terdiri dari beberapa tahap menurut Qian, LaBreck, Gruber, & Yuehuei (2003), yaitu:

2.7.1 Pemotongan secara Kasar dan Fiksasi

Pemotongan secara kasar dan fiksasi adalah langkah pertama dalam preparasi pemotongan jaringan terdekalifikasi. Fiksasi merupakan sebuah proses pengawetan cepat jaringan, sehingga jaringan dapat mempertahankan bentuk, struktur, dan semua elemen konstituennya. Untuk mendapatkan hasil terbaik, penting untuk menempatkan jaringan ke dalam volume besar cairan fiksasi dalam waktu tersingkat yang memungkinkan setelah dipisahkan dari tubuh.

Senyawa yang populer untuk memfiksasi spesimen kasar sebelum dekalifikasi adalah 10% *neutral buffered formalin* (NBF). NBF terdiri dari larutan formaldehid 37–40% 100,0 ml, akuades 900,0 ml, natrium dihidrogen fosfat 4,0 g, dinatrium hidrogen fosfat 6,5 g yang dicampurkan hingga larut.

Fiksasi untuk mikroskopi cahaya pada umumnya dilakukan pada temperatur ruang. Perbandingan volume antara spesimen dan fiksatif antara 1:10 hingga 1:20. Waktu yang dibutuhkan untuk merendam jaringan dalam larutan bergantung pada kecepatan penetrasi fiksatif dan ketebalan jaringan. Untuk kebanyakan spesimen jaringan kecil (ketebalan kurang dari 5 mm), cukup membutuhkan 24-48 jam. Untuk spesimen yang lebih lebar atau tulang berdensitas rendah, sedikitnya membutuhkan waktu 48-72 jam fiksasi.

2.7.2 Dekalsifikasi

Dekalsifikasi merupakan proses lengkap dari penghilangan garam kalsium dan mineral dari jaringan tulang setelah fiksasi. Tanpa dekalifikasi, pemotongan (*sectioning*) hampir tidak mungkin dilakukan kecuali spesimen dilekatkan dalam medium plastik dan dipotong dengan *heavy-duty rotary microtome*.

Prosedur dekalifikasi yang paling luas digunakan menggunakan asam, yang bereaksi dengan kalsium tulang membentuk garam kalsium yang larut, atau agen pengkelat, yang mengkompleks ion kalsium. Agen pendekalsifikasi asam diketahui memiliki kekurangan dalam mengganggu pewarnaan tulang. Larutan pendekalsifikasi yang biasanya digunakan adalah asam format (5-10% dalam larutan salin), asam etilendiamin tetraasetat (EDTA) 14%, dan beberapa larutan komersial lainnya. Senyawa asam pendekalsifikasi lainnya, yaitu asam nitrat, asam sulfat, asam kromat, asam trikloroasetat, dan asam trifluoroasetat. Menurut Mori, et al. (1988) larutan pendekalsifikasi yang digunakan adalah larutan EDTA-G (14,5 g EDTA, 1,25 g NaOH, and 15 ml gliserol dilarutkan dalam akuades dengan pH diatur hingga pH 7,3), larutan kemudian dicukupkan hingga 100 ml dan disimpan 4°C), spesimen direndam selama 10-14 hari pada suhu 4°C (Miao & Scutt, 2002). Penempatan spesimen dalam larutan pendekalsifikasi dalam *stirrer* berkecepatan rendah atau pengocokan manual secara periodik dapat meningkatkan kecepatan dekalifikasi. Frekuensi penggantian larutan juga penting untuk dilakukan. Pengujian terhadap ketuntasan proses dekalifikasi diperlukan setelah proses dekalifikasi selesai. Beberapa cara yang dapat digunakan adalah radiografi, manipulasi, waktu perendaman, dan kimiawi. Radiografi merupakan cara akurat untuk melihat keberadaan kalsium dalam spesimen tulang; manipulasi dengan cara membengkokkan untuk menguji kelunakan spesimen tulang; waktu perendaman adalah cara yang digunakan dengan mengikuti waktu dan jumlah penggantian larutan dekalifikasi sesuai protokol yang telah teruji untuk bagian tulang yang spesifik; sedangkan cara kimia adalah salah satu cara yang akurat untuk mengetahui kadar kalsium dalam larutan dekalifikasi, sebaiknya dilakukan uji setiap minggu jika menggunakan larutan EDTA, dilakukan dengan menetralkan larutan menggunakan amonium hidroksida, kemudian larutan netral tersebut direaksikan dengan natrium oksalat. (Skinner, 2003)

2.7.3 Dehidrasi dan Penjernihan

Jaringan yang telah didekalsifikasi dipindahkan ke dalam etanol dengan peningkatan konsentrasi alkohol, misalnya alkohol 70%, alkohol 95%, dan alkohol absolut (100%), pada umumnya dua kali pergantian dilakukan untuk masing-masing konsentrasi. Peningkatan konsentrasi secara bertahap dilakukan untuk mengurangi penyusutan yang terjadi pada sel. Penjernihan merupakan penggantian cairan dehidrasi dengan cairan yang bercampur dengan medium pada proses *embedding*. Terdapat beberapa reagen penjernih yang biasa digunakan, seperti xilen, toluen, dan benzen. Xilen merupakan reagen penjernih yang umum digunakan untuk jaringan terdekalsifikasi.

2.7.4 Infiltrasi dan Penanaman

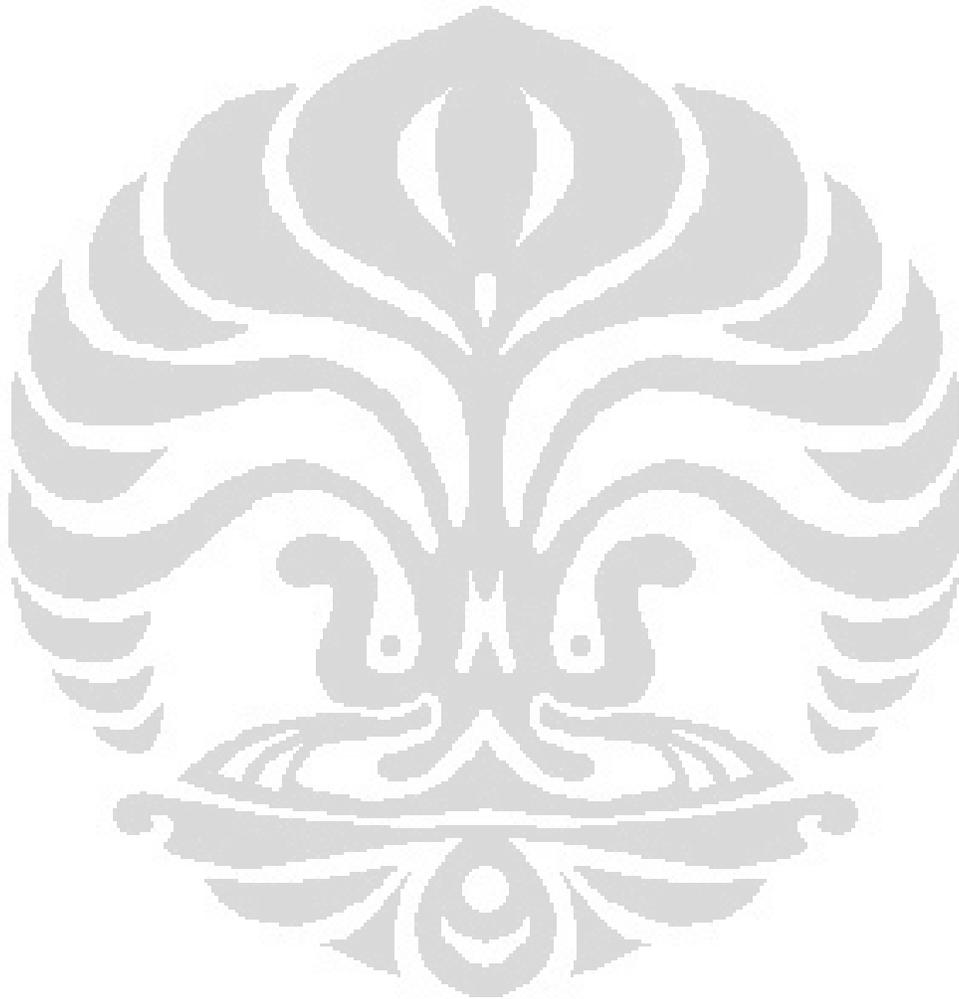
Infiltrasi menghilangkan agen penjernih dari jaringan dan dipermeasi secara utuh dengan parafin, yang kemudian akan mengeras, sehingga menciptakan suatu blok yang akan dipotong. Infiltrasi vakum mungkin perlu dilakukan untuk menyingkirkan gelembung udara yang dapat terjebak dalam spesimen. Setelah itu, spesimen dipindahkan ke dalam cetakan dan parafin baru ditambahkan, lalu parafin cair yang mengandung spesimen dibiarkan mengeras. Langkah inilah yang disebut tahap penanaman. Saat proses ini, sangat penting untuk memastikan bahwa spesimen berada pada orientasi yang diinginkan.

2.7.5 Pemotongan

Untuk spesimen terdekalsifikasi, mikrotom putar dapat memotong bagian dengan ketebalan 1-10 μm . Masalah yang biasa muncul pada pemotongan jaringan terdekalsifikasi adalah pemotongan permukaan yang keras karena dekalsifikasi yang belum tuntas dan/atau dehidrasi atau penjernihan spesimen yang belum tuntas. Hal yang dapat dilakukan sebagai solusi adalah dekalsifikasi permukaan dan pelunakan dengan air.

2.7.6 Pewarnaan dan Hasil

Teknik pewarnaan yang umum digunakan untuk jaringan terdekalsifikasi adalah H&E (Hematoksin-Eosin), safranin O/fast green, dan Goldner's trichrome. Pewarnaan dilakukan setelah proses deparafinisasi. Kemudian hasil diamati di mikroskop cahaya (Qian, LaBreck, Gruber, & Yuehuei, 2003).



BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Fitokimia Departemen Farmasi, Laboratorium Biologi Perkembangan Hewan dan Tumbuhan Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang berlangsung dari bulan Februari-Juni 2012.

3.2 Bahan

3.2.1 Bahan Uji

Pada penelitian ini digunakan bahan uji yaitu, serbuk kering rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk.) dari PT. Bina Agromandiri. Surat determinasi tanaman terlampir pada Lampiran 11. Bahan yang digunakan adalah seluruh bagian tanaman (Gambar 3.1).

3.2.2 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan berupa akuades, asam klorida 2N, asam sulfat pekat, asetat anhidrida, benzen, benzil benzoat, *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* (Sigma-Aldrich, USA), entellan (Merck), Eter, dinatrium hidrogen fosfat, eosin, etanol 70%, etanol 96%, etanol absolut, formaldehid (Mallinckrodt), gliserol (Brataco), hematoksilin, karboksimetilselulosa atau CMC (Brataco), larutan gelatin 10%, Na₂EDTA (Merck), natrium diklofenak (Kimia Farma), natrium dihidrogen fosfat, natrium hidroksida (Merck), natrium klorida 0,9% steril (Otsuka), parafin (Histoplast), pereaksi mollisch, serbuk Mg, xilen.

3.3 Peralatan

Alat – alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas, alat bedah, alkoholmeter, jarum suntik 27 G1/2 (Terumo), kamera (Optilab), kandang tikus, lemari pendingin, *magnetic stirrer* (Boecco), mikroskop optik (Nikon

Eclipse E200), oven parafin (Sakura), pletismometer, *rotary evaporator* (Buchi, IKA), *rotary microtome* (820 Spencer Microtome), *shaker*, sonde oral, spuit 1 ml; 3 ml (Terumo), timbangan analitik (Mettler Toledo), timbangan hewan, *water bath*.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pembuatan Ekstrak Etanol 70% Rumput Mutiara

Metode yang digunakan untuk membuat ekstrak etanol rumput mutiara adalah maserasi. Serbuk kering rumput mutiara sebanyak 250 g, ditambahkan etanol 70% dengan perbandingan 1:5, direndam selama 6 jam dengan pengadukan, kemudian didiamkan selama 18 jam. Setelah itu sampel tersebut disaring untuk memisahkan maserat. Proses diulangi empat kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama sampai filtrat menjadi tidak berwarna atau berbeda dari filtrat pertama. Semua filtrat yang diperoleh dicampur dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* bertekanan rendah pada suhu 50°C dengan kecepatan putar 30 rpm. Selanjutnya, filtrat pekat diuapkan diatas penangas air pada suhu 50°C hingga menjadi ekstrak kental (Depkes RI, 2008).

3.4.2 Penetapan Rendemen

Penetapan rendemen dilakukan untuk menentukan jumlah ekstrak yang diperoleh dari jumlah tertentu serbuk simplisia. Penetapan rendemen perlu dilakukan karena jurnal penelitian mengenai dosis ekstrak rumput mutiara sebagai antiinflamasi belum ada, tetapi penggunaan secara klinis pada pengobatan herbal tradisional telah dilakukan dan telah terdapat dosis serbuk simplisia untuk pasien sehingga hanya diperlukan konversi dari dosis serbuk kering ke dosis ekstrak.

Cara penentuan rendemen adalah masing-masing ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan dibandingkan bobotnya dengan serbuk simplisia awal yang digunakan. Perbandingan tersebut dinyatakan dalam % (persen) (Depkes RI, 2008).

3.4.3 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan secara kualitatif untuk mengetahui kandungan kimia dalam ekstrak. Senyawa yang diuji dalam penapisan ini adalah senyawa glikosida, flavonoid, tanin, dan terpenoid. Pengujian dilakukan dengan penambahan reagen spesifik untuk masing-masing senyawa uji.

3.4.3.1 Uji Glikosida

Uji glikosida dilakukan dengan menggunakan pereaksi Mollisch. Ekstrak sejumlah 100 mg ditambahkan dengan HCl 2 N sejumlah 15 ml, dipanaskan hingga tersisa setengah bagian kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh diambil sejumlah 3 ml kemudian ditambah dengan menggunakan 3 ml pereaksi Mollisch. Setelah itu ditambahkan 3 tetes $H_2SO_{4(p)}$. Hasil yang didapatkan dibandingkan menggunakan reagen yang sama dengan Centellae Herba sebagai blanko positif. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin pada lapisan tengah larutan (Depkes RI, 1995).

3.4.3.2 Uji Flavonoid

Filtrat ekstrak sebanyak 10 ml diuapkan hingga kering, lalu ditambah 1 ml etanol 95%, kemudian ditambahkan 100 mg serbuk Mg dan 10 tetes $HCl_{(p)}$. Hasil dibandingkan dengan reaksi yang sama terhadap Orthosiphonis Folium sebagai blanko positif. Hasil positif ditunjukkan dengan warna merah jingga hingga merah ungu (Depkes RI, 1995).

3.4.3.3 Uji Tanin

Ekstrak sebanyak 100 mg ditambahkan 15 ml air panas kemudian dipanaskan selama 5 menit hingga mendidih setelah itu disaring. Filtrat sejumlah 5 ml ditambahkan 1 ml larutan gelatin 10%. Hasil dibandingkan dengan hasil reaksi terhadap blanko positif untuk tanin, yaitu Psidii Folium. Hasil positif menunjukkan endapan putih yang menggumpal (Depkes RI, 1995).

3.4.3.4 Uji Terpenoid

Ekstrak sejumlah 100 mg ditambah dengan 5 ml eter, kemudian diuapkan pada cawan penguap di dalam lemari asam. Setelah itu ditambahkan 5 tetes asetat anhidrida dan 3 tetes $H_2SO_{4(p)}$. Hasil yang didapatkan dibandingkan dengan hasil reaksi terhadap Caryophylli Flos sebagai blanko positif. Hasil reaksi positif apabila dihasilkan warna hijau (Depkes RI, 1995).

3.4.4 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* (SD) dewasa jantan, bobot 180-200 gram dan berumur 3 bulan. Sertifikat hewan uji terlampir pada Lampiran 12. Tikus dibagi dalam 6 kelompok dengan jumlah tikus dalam tiap kelompok dihitung berdasarkan rumus Federer (Federer, 1991; David & Arkeman, 2008) berikut:

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

Dimana: t adalah jumlah perlakuan
n adalah jumlah pengulangan untuk tiap perlakuan

Pada penelitian ini, $t = 6$, maka $n \geq 4$

Jadi, tikus dibagi dalam 6 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor.

3.4.5 Pemeliharaan Hewan Uji

Aklimatisasi hewan uji selama 2 minggu dengan tujuan mengadaptasikan hewan coba dengan lingkungannya yang baru. Tikus diberi makan dan minum dalam jumlah yang seragam dan dilakukan pengamatan rutin terhadap keadaan umum dan penimbangan berat badan tikus. Tikus yang sehat memiliki ciri-ciri bulu bersih, mata terlihat sehat, dan berat badan tidak berkurang. Tikus yang dinyatakan sehat dikelompokkan secara acak dengan jumlah enam ekor untuk tiap kelompoknya. Hewan uji yang sakit tidak diikutsertakan dalam pengujian.

3.4.6 Penentuan Dosis Bahan Uji

Dosis serbuk kering tanaman rumput mutiara yang telah dibuat sediaan kapsul oleh CV. Herbal Insani memiliki indikasi yang salah satunya untuk

mengatasi peradangan mempunyai aturan pakai 2x2 kapsul (masing-masing berisi 500 mg serbuk kering) sehari sehingga dosis per hari adalah 2000 mg serbuk kering. Jika dikonversi ke dalam dosis tikus dengan berat \pm 200 g (faktor konversi = 0,018 dan faktor koreksi farmakokinetika = 10), maka didapatkan dosis 360 mg/200 g BB tikus/hari sebagai dosis kedua. Selain itu, terdapat pula dosis yang telah terbukti secara empiris pada klinik herbal, yaitu 3x3 kapsul (masing-masing berisi 500 mg serbuk kering) sehingga didapatkan dosis per hari adalah 4500 mg serbuk kering. Setelah dikonversi, dosis yang didapatkan adalah 810 mg/200 mg BB tikus/hari. Dosis divariasikan menjadi tiga dosis pemberian. Berikut ini adalah perhitungan dosis harian serbuk kering rumput mutiara per 200 g BB tikus:

- a. Dosis I : $888,89 \text{ mg} \times 0,018 \times 10 = 160 \text{ mg} / 200 \text{ g BB}$
- b. Dosis II : $2000 \text{ mg} \times 0,018 \times 10 = 360 \text{ mg} / 200 \text{ g BB}$
- c. Dosis III : $4500 \text{ mg} \times 0,018 \times 10 = 810 \text{ mg} / 200 \text{ g BB}$

Jumlah dosis ekstrak yang diberikan akan dihitung berdasarkan hasil penetapan rendemen simplisia. Dosis diberikan secara oral.

3.4.7 Penyiapan Bahan Uji

Ekstrak disuspensikan sesuai dosis sesuai dengan perhitungan pada Lampiran 1.2, menggunakan CMC (*Carboxymethylcellulose*) 0,5% sebagai bahan pensuspensi. Sebanyak 400 mg serbuk CMC ditaburkan pada lumpang berisi akuades panas bersuhu 70⁰C dengan volume 10 ml. Kemudian CMC dibiarkan mengembang selama kurang lebih 10 menit. CMC yang telah mengembang tersebut digerus bersama sediaan, dan ditambahkan perlahan-lahan dengan akuades sambil dihomogenisasi, hingga mencapai volume suspensi 80 ml. Suspensi ini disimpan dalam lemari pendingin. Untuk menjaga kestabilan suspensi tersebut, suspensi baru akan dibuat dan diberikan pada hewan coba menjelang percobaan. Pemberian pada hewan coba dilakukan secara oral dengan teknik sonde.

3.4.8 Pembuatan Suspensi Natrium Diklofenak

Dosis serbuk natrium diklofenak yang digunakan untuk uji antiartritis adalah 5 mg/kg BB tikus setiap hari secara oral (Ilavarasan, Mallika, &

Venkataraman, 2005; Fitriyah, 2011; Siddalingappa, Rajesh, Kudagi, Krishnakanthk, & Sujith, 2011). Untuk itu, pada penelitian ini ditentukan dosis yang akan dipakai adalah 1 mg/200 g BB tikus.

Setiap pemberian diberikan dalam 2 ml volume suspensi sehingga dalam 2 ml suspensi mengandung 1 mg natrium diklofenak. Untuk membuat 50 ml suspensi natrium diklofenak 1 mg/200 g BB, natrium diklofenak 50 ml/2 ml x 1 mg = 25 mg, maka sebanyak 25 mg natrium diklofenak, disuspensikan dalam CMC 0,5% sampai 50 ml.

Ditimbang sebanyak 25 mg serbuk natrium diklofenak kemudian digerus dengan penambahan suspensi CMC 0,5% sampai homogen dan dicukupkan volumenya hingga 50 ml.

3.4.9 Induksi Arthritis Reumatoid

Prinsip metode pada penelitian ini adalah modifikasi metode *adjuvant-induced arthritis*. Skema kerja penelitian ini terlampir pada Lampiran 13. Pengukuran volume edema yang terjadi akibat inflamasi dilakukan menggunakan pletismometer (Gambar 3.2) dengan cara mengukur volume air yang digantikan (Woode et al., 2008). Induksi dan perlakuan pada setiap kelompok dipaparkan pada Tabel 3.1. Pengamatan volume kaki dilakukan pada hari ke-1 sebelum induksi, hari ke-7, 14, 21, dan 28 setelah induksi CFA (Fitriyah, 2011). Sertifikat analisis CFA terlampir pada Lampiran 9.

Tabel 3.1 Kelompok perlakuan uji antiarthritis metode *adjuvant-induced arthritis*

No.	n (ekor)	Kelompok	Perlakuan
1.	6	Kontrol Normal	Hari ke-1 disuntik 0,1 ml larutan salin secara subplantar pada kaki kiri belakang, hari ke-2 sampai ke-28 diberi 2 ml larutan CMC 0,5%
2.	6	Kontrol Negatif	Hari ke-1 disuntik 0,1 ml CFA secara subplantar pada kaki kiri belakang, hari ke-2 sampai ke-28 diberi 2 ml larutan CMC 0,5% per oral
3.	6	Kontrol Positif	Hari ke-1 disuntik 0,1 ml CFA secara subplantar pada kaki kiri belakang, hari ke-2 sampai ke-28 diberi 2 ml suspensi Natrium Diklofenak 1 mg/200 g BB dalam CMC 0,5% per oral
4.	6	Dosis I	Hari ke-1 disuntik 0,1 ml CFA secara subplantar pada kaki kiri belakang, hari ke-2 sampai ke-28 diberi 2 ml suspensi ekstrak etanol 70% rumput mutiara setara dosis serbuk kering 160 mg/200 g BB dalam CMC 0,5% per oral
5.	6	Dosis II	Hari ke-1 disuntik 0,1 ml CFA secara subplantar pada kaki kiri belakang, hari ke-2 sampai ke-28 diberi 2 ml suspensi ekstrak etanol 70% rumput mutiara setara dosis serbuk kering 360 mg/200 g BB dalam CMC 0,5% per oral
6.	6	Dosis III	Hari ke-1 disuntik 0,1 ml CFA secara subplantar pada kaki kiri belakang, hari ke-2 sampai ke-28 diberi 2 ml suspensi ekstrak etanol 70% rumput mutiara setara dosis serbuk kering 810 mg/200 g BB dalam CMC 0,5% per oral

Keterangan: kontrol normal = CMC 0,5%, kontrol negatif = CMC 0,5%, kontrol positif = natrium diklofenak 1 mg/200 g BB, dosis I = bahan uji ekstrak rumput mutiara 28,06 mg/200 g BB, dosis II = bahan uji ekstrak rumput mutiara 63,13 mg/200 g BB, dosis III = bahan uji ekstrak rumput mutiara 142,04 mg/200 g BB; CFA = *Complete Freund's Adjuvant*

3.4.10 Isolasi Tulang Kaki Tikus

Pada akhir perlakuan, semua hewan coba dikorbankan menggunakan uap eter untuk diambil tulang kaki kirinya. Pembedahan dilakukan menggunakan alat

bedah dengan membersihkan tulang dari jaringan dan lemak yang menempel. Kemudian dilakukan isolasi bagian tulang *calcaneus* yang dibutuhkan (Gambar 3.3).

3.4.11 Pembuatan *Neutral Buffered Formalin*

Larutan formaldehid 37-40% 10,0 ml dicampurkan dengan natrium dihidrogen fosfat 400 mg dan dinatrium hidrogen fosfat 650 mg, dilanjutkan dengan penambahan akuades hingga larut, cukupkan volume hingga 100,0 ml dengan akuades.

3.4.12 Metode Histologi Tulang Kaki Tikus

Berdasarkan penelitian terdahulu (Ballanti, 1995; An dan Martin, 2003) dan pembicaraan dengan Kusmana (2012), langkah kerja histologi tulang adalah:

3.4.12.1 Fiksasi

Spesimen tulang difiksasi selama 48 jam pada suhu ruang dengan 10% *neutral buffered formalin* (NBF), volume larutan fiksatif 15-20 kali volume jaringan.

3.4.12.2 Dekalsifikasi

Spesimen kemudian dibilas dengan akuades dan ditempatkan dalam larutan pendekalsifikasi, yaitu EDTA 14% (14,5 g EDTA, 1,25 g NaOH, and 15,0 ml gliserol dilarutkan dalam akuades dengan pH diatur hingga pH 7,3; setelah itu, volume dicukupkan dengan akuades hingga 100,0 ml) dengan volume 10-20 kali volume spesimen, selama 7-21 hari pada suhu 4°C dengan pengadukan perlahan (Gambar 3.4). Spesimen lalu dibilas dengan akuades dan direndam dalam etanol 70%, dibilas kembali dengan akuades.

3.4.12.3 Dehidrasi

Spesimen direndam dengan etanol 70% selama 1 jam dengan pengadukan, kemudian 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 menggunakan etanol absolut selama 1 jam dengan pengadukan, lalu rendam kembali dengan etanol absolut segar selama 1 jam dengan pengadukan.

3.4.12.4 Penjernihan

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

3.4.12.5 Infiltrasi dan Penanaman

Spesimen mengalami proses infiltrasi dengan perendaman dalam parafin cair pada oven bersuhu 66°C selama 1 jam dalam kondisi vakum, langkah kerja dengan parafin cair diulang menggunakan parafin segar, kemudian dilakukan proses penanaman dalam alat pencetak pada suhu 5-10°C di atas titik lebur kemudian didiamkan hingga dingin.

3.4.12.6 Pematangan

Spesimen dipotong dengan mikrotom putar (Gambar 3.5) sehingga didapatkan ketebalan potongan sebesar 5 µm. Letakkan dan tempelkan irisan tunggal yang rata tanpa tertekuk pada kaca objek, dipanaskan pada suhu 45°C.

3.4.12.7 Deparafinisasi.

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

3.4.12.8 Pewarnaan dengan Hematoksilin-Eosin.

Potongan spesimen ditempatkan dalam larutan pewarna Hematoksilin selama 5 menit, dibilas dengan akuades mengalir, kemudian direndam dengan larutan eosin dalam etanol 70% selama 2-3 menit, kemudian didehidrasi dengan etanol bertingkat dari konsentrasi 70% selama 2-3 menit, dilanjutkan etanol 96%

Universitas Indonesia

dan absolut, masing-masing sebanyak 2 kali selama 5 menit, jernihkan dengan 2 kali pergantian xilen, ditetaskan entellan, kemudian ditutup dengan hati-hati untuk menghindari gelembung udara.

3.4.12.9 Pengamatan dan Perhitungan Osteoklas

Pengamatan dan perhitungan osteoklas pada tulang *calcaneus* dilakukan secara mikroskopik dengan mikroskop cahaya pada perbesaran 100x. Pengambilan foto dengan kamera optik Optilab dan penghitungan osteoklas dilakukan dengan secara manual dengan perangkat lunak *Optilab Image Raster*. Foto dibuka dengan menggunakan perangkat lunak kemudian dipilih menu *manual count*. Setelah itu, dengan mengeklik sel osteoklas yang dihitung, jumlah osteoklas akan tercatat secara langsung.

3.4.13 Metode Pengolahan Data

Data yang diperoleh adalah volume udem dan jumlah osteoklas tulang *calcaneus*. Data yang diperoleh dianalisis dengan perangkat lunak SPSS 19 yang meliputi uji *Saphiro -Wilk* untuk melihat normalitas data dan dianalisis dengan uji *Levene* untuk melihat homogenitas data. Jika data terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji analisis varians (ANAVA) satu arah dengan taraf kepercayaan 95% sehingga dapat diketahui apakah perbedaan yang diperoleh bermakna atau tidak. Apabila terdapat perbedaan bermakna, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk melihat perbedaan antar tiap kelompok perlakuan (Besral, 2010).

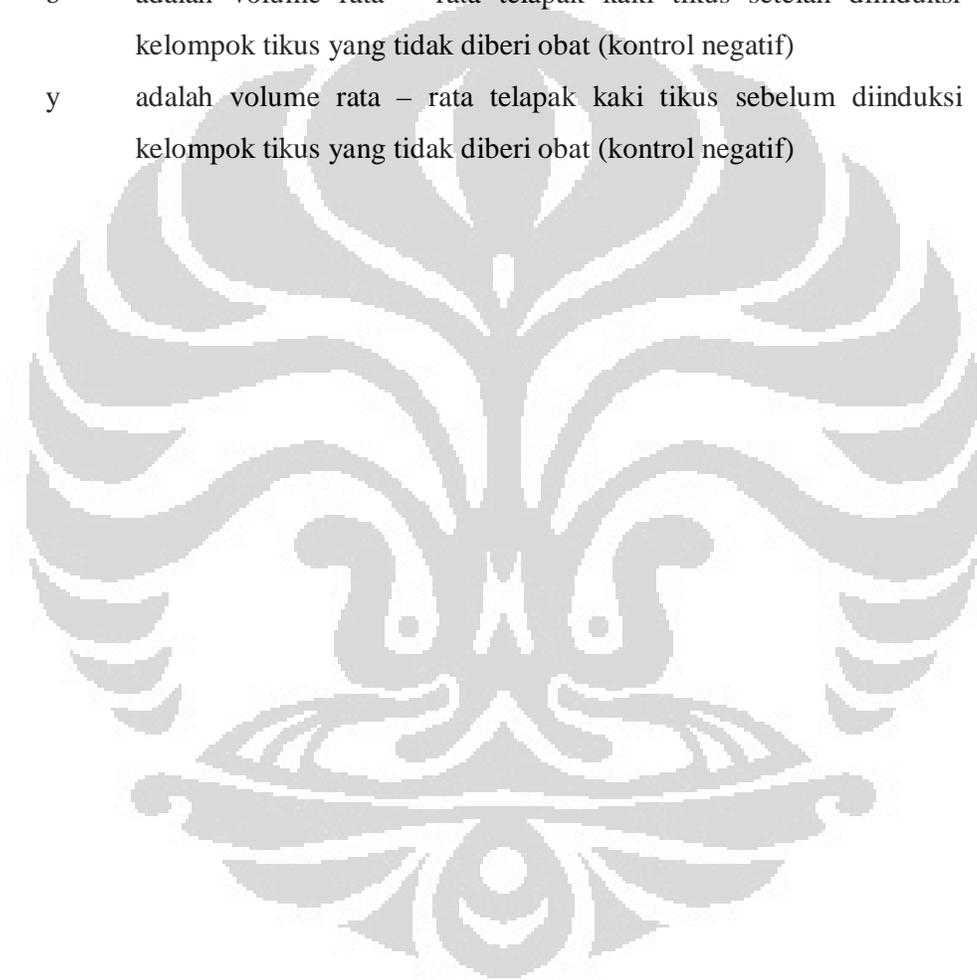
Jika salah satu syarat untuk uji ANAVA tidak terpenuhi, maka dilakukan uji *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui adanya perbedaan. Apabila terdapat perbedaan bermakna, dilakukan uji *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antar tiap kelompok perlakuan (Besral, 2010).

Efek obat antiartritis dinilai berdasarkan persentase penghambatan udem yang ditimbulkan oleh *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) yang dihitung dengan cara sebagai berikut (*Penapisan farmakologi, pengujian fitokimia dan pengujian klinik*, 1993; Raji, Udoh, Oluwadara, Akinsomisoye, Awobajo, & Adheshoga, 2002) :

$$\% \text{ Penghambatan Udem rata - rata} = \left\{ 1 - \frac{[a-x]}{[b-y]} \right\} \times 100 \% \quad (3.2)$$

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)



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Tinjauan Umum

Penelitian ini dilakukan untuk menguji efek antiinflamasi kronik yang memiliki pengaruh terhadap penurunan jumlah osteoklas tulang dalam pengaruhnya dalam proses resorpsi tulang. Pengujian efek antiinflamasi kronik ini dilakukan pada tikus putih jantan yang dibuat artritis reumatoid. Pemilihan tikus putih jantan dilakukan karena pada metode induksi *adjuvant-arthritis* tikus betina lebih bervariasi dalam pencapaian onset dan keparahan keadaan patologis (Bendele, 2001). Selain itu, tikus jantan tidak begitu dipengaruhi oleh efek samping natrium diklofenak dibandingkan tikus betina, yaitu mekanisme penghambatan enzim siklooksigenase yang berefek terhadap tekanan darah (Romanowska, Grotkiewicz, Rewekant, & Makulska-Nowak, 2008).

Pengujian antiarthritis dilakukan dengan mengukur volume udem telapak kaki tikus menggunakan pletismometer dan pengujian terhadap jumlah osteoklas dilakukan dengan pengamatan terhadap histologi tulang *calcaneus* tikus. Bahan uji yang digunakan adalah bahan herbal (Gambar 3.1) yang telah digunakan secara empiris sebagai antiinflamasi kuat di klinik pengobatan herbal di Depok, yaitu tanaman rumput mutiara (Herbal Insani, 2012; wawancara dengan dr. Ipak Ridmah Rikenawaty, 5 Januari 2012). Bahan tersebut diberikan sebagai ekstrak etanol 70%.

Dosis ekstrak etanol rumput mutiara yang digunakan adalah dosis bertingkat yang didasari pada dosis penggunaan herbal yang efektif pada klinik di daerah Depok. Diduga senyawa yang berefek sebagai antiinflamasi adalah senyawa golongan flavonoid sehingga digunakan ekstrak etanol yang dapat menarik senyawa tersebut. Dosis manusia yang telah digunakan secara empiris tersebut dikonversi ke dosis pemberian untuk tikus sehingga didapatkan dosis pemberian 360 mg/ 200 g BB tikus dan 810 mg/ 200 g BB tikus, serta digunakan dosis pertama 160 mg/ 200 g BB tikus yang merupakan pembagian 2,25 kali dari dosis kedua. Kemudian dari ketiga dosis ini ditentukan jumlah dosis ekstrak rumput mutiara yang digunakan dengan menggunakan rendemen yang

didapatkan. Penetapan dosis ini dapat digunakan untuk menentukan dosis optimum untuk efek antiartritis yang kemudian dibandingkan dengan pengaruhnya terhadap jumlah osteoklas pada jaringan tulang *calcaneus* tikus yang diinduksi.

Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah natrium diklofenak. Pemilihan obat ini didasarkan pada penelitian yang menunjukkan bahwa senyawa obat ini dapat bekerja pada jaringan lokal yang meradang. Diklofenak dan metabolitnya memiliki kecenderungan untuk mencapai konsentrasi lebih besar pada telapak kaki dan tengkuk leher yang meradang pada hewan yang diinjeksi karagenan ketika dibandingkan dengan telapak kaki yang tidak meradang dari hewan yang sama atau hewan kontrol. Natrium diklofenak juga dapat mencapai konsentrasi yang tinggi di jaringan sinovial (Schweitzer, Hasler-Nguyen, & Zijlstra, 2009). Selain itu, faktor ekonomis juga menjadi salah satu faktor pemilihan natrium diklofenak sebagai kontrol positif.

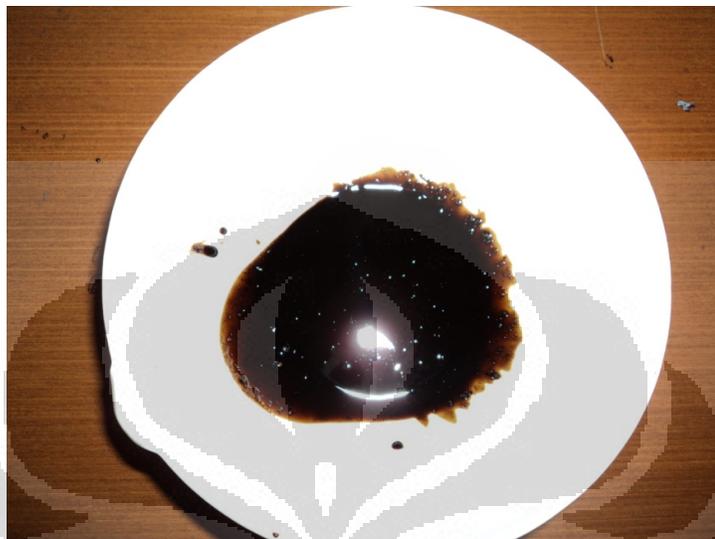
4.2 Penyiapan Ekstrak Etanol

Rumput mutiara diekstraksi dengan cara dingin yaitu maserasi. Hal ini dilakukan agar senyawa aktif rumput mutiara yang diduga sebagai flavonoid tidak teroksidasi pada suhu yang tinggi, yaitu lebih dari 80°C menurut Yaqin, Rui, & Hong (2005) dan menurut He, Xiong, Chen, Ruan, Wang, & Traore (2005) pada suhu tinggi juga dapat terjadi penurunan efisiensi ekstraksi flavonoid. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah etanol 70%. Etanol dipilih sebagai pelarut ekstraksi rumput mutiara karena senyawa aktif yang berperan sebagai antiinflamasi dalam rumput mutiara yang diperkirakan adalah flavonoid mempunyai sifat larut dalam etanol. Etanol juga merupakan pelarut yang kurang toksik dibandingkan pelarut polar lainnya sehingga lebih aman untuk diberikan secara oral pada hewan coba serta merupakan pelarut yang ramah lingkungan (Sathishkumar, Baskar, Shanmugam, Rajasekaran, Sadasivam, & Manikandan, 2008). Selain itu, pelarut etanol mudah diuapkan serta didestilasi sehingga pembuatan ekstrak kental dapat lebih menghemat waktu.

Ekstrak etanol rumput mutiara yang diperoleh kemudian ditentukan organoleptiknya dengan pancaindra untuk mendeskripsikan bentuk, warna, bau,

Universitas Indonesia

dan rasa. Ekstrak yang didapatkan berupa ekstrak kental, berwarna hijau kecoklatan, berbau khas, dan rasanya pahit (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Ekstrak etanol rumput mutiara

4.3 Penetapan Rendemen

Parameter standar umum yang dilakukan pada penelitian ini adalah penetapan rendemen. Ekstrak yang didapat kemudian ditimbang dan dihitung persentase rendemen dalam ekstrak tersebut.

Berdasarkan perhitungan pada Lampiran 1.2, maserasi 250 g serbuk simplisia rumput mutiara menghasilkan 43,85 g ekstrak kental sehingga rendemen ekstrak etanol 70% yang didapat adalah 17,54%. Hasil rendemen yang didapat digunakan sebagai faktor konversi untuk menghitung dosis ekstrak yang digunakan untuk uji antiinflamasi. Rendemen tersebut dihitung dari perbandingan berat ekstrak dibagi berat simplisia kering dalam persentase. Dari rendemen yang didapatkan tersebut didapatkan dosis ekstrak rumput mutiara yang dikonversi dari dosis serbuk simplisia, yaitu dosis I 28,06 mg/200 g BB; dosis II 63,13 mg/200 g BB; dosis III 142,04 mg/200 g BB tikus.

4.4 Hasil Penapisan Fitokimia

Uji kualitatif yang dilakukan pada ekstrak kental rumput mutiara berupa uji untuk senyawa flavonoid, tanin, triterpenoid dan glikosida yang terkandung di

Universitas Indonesia

dalamnya (Depkes RI, 1995). Senyawa yang positif terkandung dalam ekstrak etanol 70% adalah glikosida, flavonoid, dan tanin. Pelarut yang digunakan adalah pelarut yang bersifat polar sehingga terpenoid yang bersifat nonpolar tidak terdapat dalam ekstrak etanol 70% rumput mutiara tersebut.

Tabel 4.1 Hasil penapisan fitokimia pada ekstrak etanol 70% rumput mutiara

Senyawa Uji	Hasil Pengamatan	Kesimpulan
Glikosida	Terbentuk cincin berwarna merah	+
Flavonoid	Warna merah pada buih yang terbentuk	+
Tanin	Larutan menjadi keruh	+
Terpenoid	Warna tetap	-

4.5 Uji Efek Antiartritis

Pada penelitian ini, kelompok yang diuji berjumlah enam kelompok yaitu kontrol normal, kontrol negatif, kontrol positif, dosis I, dosis II, dan dosis III. Pada hari pertama, tikus diinduksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) pada telapak kaki kiri sebanyak 0,1 ml untuk semua kelompok kecuali kontrol normal. Kontrol normal hanya diinduksi larutan salin yaitu larutan natrium klorida 0,9% sebanyak 0,1 ml. CFA efektif meningkatkan respon antibodi selular dan humoral terhadap imunogen yang diinjeksikan secara bermakna. Komponen penting dari respon ini adalah reaksi inflamasi kuat pada lokasi deposisi antigen akibat pembentukan influks leukosit dan interaksinya dengan antigen (OACU, 2011). Pengukuran volume edema yang terjadi akibat inflamasi dilakukan menggunakan pletismometer (Gambar 3.2) dengan cara mengukur volume air yang digantikan. (Woode et al., 2008)

Pengukuran volume udem dilakukan pada hari ke-1 sebelum induksi, hari ke-7, 14, 21, dan 28. Pengamatan ini dilakukan untuk mengamati perubahan volume udem pada hewan coba yang diberi larutan uji maupun yang tidak diberi larutan uji. Dari data volume udem yang didapatkan (Tabel 4.2), dapat dibandingkan persentase penghambatan udem rata-rata pada kelompok yang diberi larutan uji yaitu kelompok kontrol positif, dosis I, dosis II, dan dosis III.

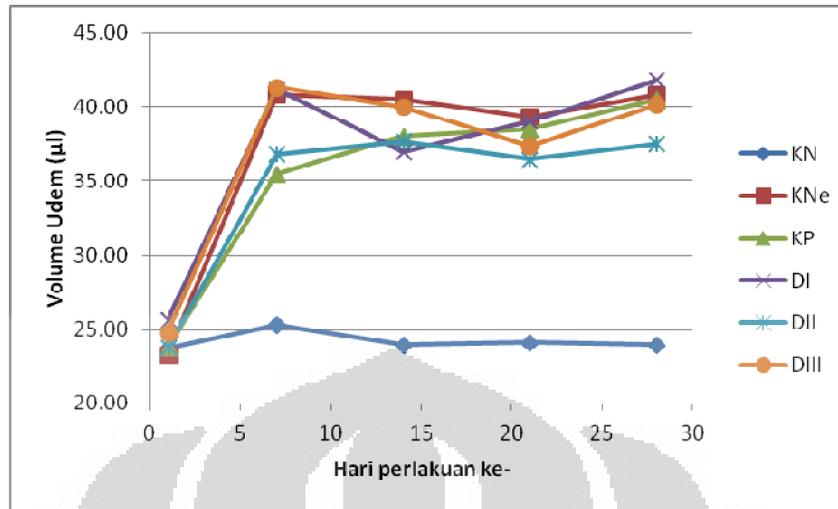
Volume udem rata-rata masing-masing kelompok pada hari ke-1, 7, 14, 21, dan 28 dapat dilihat pada Tabel 4.3. Dari Tabel 4.3, bisa disimpulkan bahwa kelompok kontrol negatif mengalami peningkatan volume udem secara signifikan dari hari ke-7 jika dibandingkan dengan hari ke-1, tetapi pada hari ke-14 sampai hari ke-21 terjadi penurunan volume udem, yang kemudian diikuti dengan peningkatan volume udem kembali pada hari ke-28, yaitu 20,33; 40,83; 40,50; 39,33; dan 40,83 μ l. Pada kelompok dosis I terjadi peningkatan rata-rata volume udem pada hari ke-7, lalu menurun pada hari ke-14, dan meningkat kembali pada hari ke-21 sampai hari ke-28. Sedangkan pada kelompok dosis II rata-rata volume udem meningkat pada hari ke-7 sampai hari ke-14, kemudian menurun pada hari ke-21, dan meningkat kembali pada hari ke-28. Kelompok dosis III juga mengalami peningkatan rata-rata volume udem pada hari ke-7, tetapi mengalami penurunan volume udem pada hari ke-14 hingga hari ke-21 dan mengalami peningkatan kembali pada hari ke-28. Sedangkan pada kontrol positif terjadi peningkatan rata-rata volume udem setiap minggunya, yaitu pada hari ke-7, 14, 21, dan 28. Adanya penurunan rata-rata volume udem yang bervariasi dari hari ke-7 sampai ke-21 pada ketiga kelompok dosis menunjukkan bahwa pemberian bahan uji ekstrak rumput mutiara dapat mengurangi gejala inflamasi, yaitu peningkatan volume udem pada telapak kaki tikus, tetapi penghambatan inflamasi tersebut terjadi secara kronis karena mencapai titik minimum pada hari ke-21. Sedangkan pada kelompok kontrol positif memang terjadi peningkatan volume udem setiap minggunya, tetapi volume udem pada hari ke-7 lebih rendah daripada volume udem pada kelompok dosis sehingga dapat diperkirakan bahwa natrium diklofenak sebagai kontrol positif menghambat udem secara akut, yaitu bekerja pada tahap awal inflamasi. Pada hari ke-28 keempat kelompok tersebut mengalami peningkatan rata-rata volume udem. Hal itu diperkirakan merupakan akibat dari lesi sekunder akibat induksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) yang menyebabkan pembengkakan di bagian sendi mulai hari ke-11 sampai ke-12 setelah induksi (Parmar, N.S. & Prakash, 2006). Efek pemberian bahan uji tidak lagi bermakna antara hari ke-21 sampai hari ke-28 karena tidak mampu menurunkan volume udem telapak kaki meskipun tidak melebihi kontrol negatif.

Perubahan rata-rata volume udem masing-masing kelompok pada hari ke-7, 14, 21, dan 28 dapat dilihat pada Gambar 4.2.

Tabel 4.3 Volume rata-rata telapak kaki tikus pada hari ke-1 sampai 28 setelah diinduksi 0,1 ml *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) pada semua kelompok perlakuan, kecuali kontrol normal

Perlakuan	Volume Rata-rata Telapak Kaki (μ l) \pm Standar Deviasi				
	Hari-1*)	Hari-7	Hari-14	Hari-21	Hari-28
Kontrol Normal	23,83 \pm 0,98	25,33 \pm 2,25	24,00 \pm 1,79	24,17 \pm 1,17	24,00 \pm 0,89
Kontrol Negatif	23,33 \pm 2,34	40,83 \pm 5,27	40,50 \pm 4,37	39,33 \pm 5,99	40,83 \pm 5,34
Kontrol Positif	23,83 \pm 2,14	35,50 \pm 3,33	38,00 \pm 6,69	38,50 \pm 9,89	40,50 \pm 6,69
Dosis I	25,67 \pm 0,82	41,17 \pm 3,25	37,00 \pm 5,02	39,00 \pm 4,43	41,83 \pm 5,34
Dosis II	23,83 \pm 2,32	26,83 \pm 5,42	37,67 \pm 5,01	36,50 \pm 3,21	37,50 \pm 5,68
Dosis III	24,83 \pm 3,13	41,33 \pm 6,25	40,00 \pm 6,00	37,33 \pm 4,63	40,17 \pm 6,97

Keterangan : *) = sebelum induksi; kontrol normal = CMC 0,5%, kontrol negatif = CMC 0,5%, kontrol positif = natrium diklofenak 1 mg/200 g BB, dosis I = bahan uji ekstrak rumput mutiara 28,06 mg/200 g BB, dosis II = bahan uji ekstrak rumput mutiara 63,13 mg/200 g BB, dosis III = bahan uji ekstrak rumput mutiara 142,04 mg/200 g BB



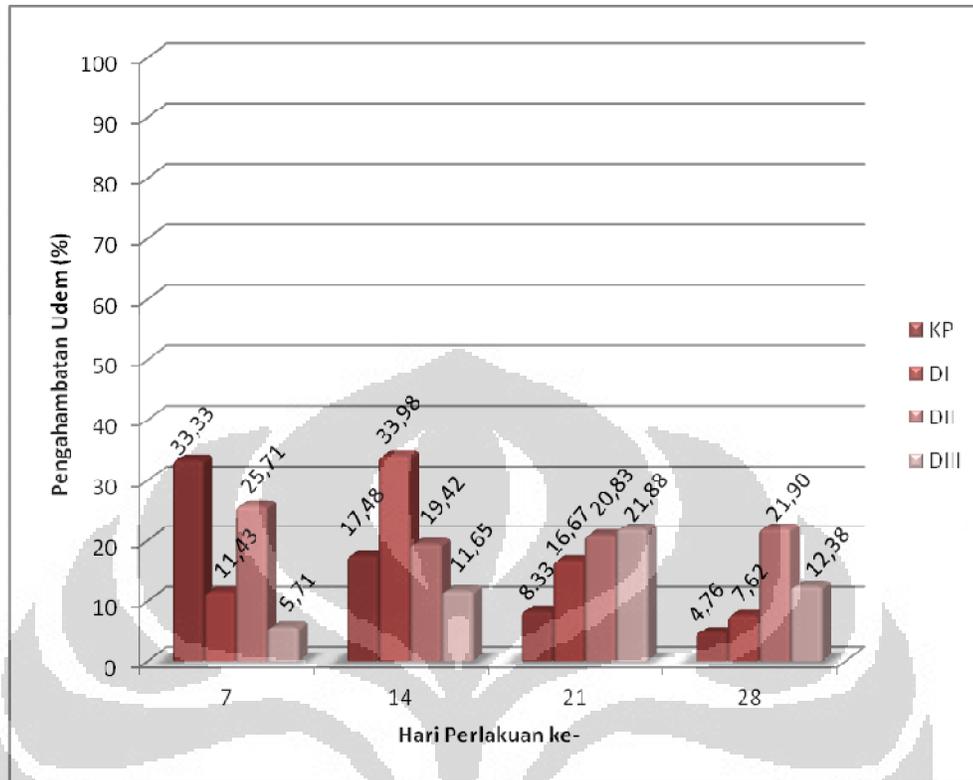
Keterangan: KN = kontrol normal (induksi dengan larutan salin pada hari ke-1 dan pemberian larutan CMC 0,5% pada hari ke-2 sampai 28); KNe = kontrol negatif (induksi dengan CFA pada hari ke-1 dan pemberian larutan CMC 0,5% pada hari ke-2 sampai 28); KP = kontrol positif (induksi dengan CFA pada hari ke-1 dan pemberian suspensi natrium diklofenak 1 mg/200 g BB pada hari ke-2 sampai 28); DI = kelompok dosis I (induksi dengan CFA pada hari ke-1 dan pemberian suspensi bahan uji 28,06 mg/200 g BB pada hari ke-2 sampai 28); DII = kelompok dosis II (induksi dengan CFA pada hari ke-1 dan pemberian suspensi bahan uji 63,13 mg/200 g BB pada hari ke-2 sampai 28); DIII = kelompok dosis III (induksi dengan CFA pada hari ke-1 dan pemberian suspensi bahan uji 142,04 mg/200 g BB pada hari ke-2 sampai 28).

Gambar 4.2 Perbandingan volume rata-rata telapak kaki tikus pada hari ke-1 sampai 28 setelah diinduksi 0,1 ml *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) pada semua kelompok perlakuan

Berdasarkan analisis statistik pada Lampiran 3 sampai 7, data volume udem untuk semua kelompok pada masing-masing hari pengujian menunjukkan data tidak terdistribusi normal dan homogen. Sehingga digunakan uji nonparametrik Kruskal Wallis untuk menguji perbedaan antarkelompok. Kemudian jika terdapat perbedaan yang bermakna, yaitu bila nilai sig. kurang dari 0,05, dilakukan lagi uji Mann-Whitney untuk menguji signifikansi perbedaan setiap dua kelompok. Secara lengkap hasil uji Mann-Whitney bisa dilihat pada Tabel 4.5.

Dari Tabel 4.5, didapatkan bahwa pada hari ke-7, 14, 21, dan 28, seluruh kelompok berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kontrol normal, antara kontrol negatif dengan kontrol negatif dan antara kontrol positif dengan dosis I terdapat perbedaan bermakna pada hari ke-7. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok kontrol positif mempunyai efek antiartritis setelah pemberian 6 hari,

yaitu pada hari ke-7 sejak induksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA). Sedangkan tidak terdapat perbedaan bermakna antara ketiga kelompok dosis selama 28 hari perlakuan. Selain itu, sejak hari ke-14 sudah tidak terdapat perbedaan rata-rata volume udem yang bermakna antara kontrol positif, kontrol negatif, kelompok dosis I, II, dan III. Dari tabel tersebut disimpulkan bahwa kelompok kontrol positif dapat mengurangi besarnya volume telapak kaki tikus akibat pemberian *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) secara subplantar setelah pemberian 6 hari, sementara kelompok dosis I, II, dan III tidak dapat mengurangi volume telapak kaki hingga pemberian 28 hari karena tidak memiliki efek antiarthritis jika dibandingkan dengan rata-rata volume udem kontrol normal. Hal ini dapat disebabkan oleh belum terdapatnya penelitian yang membuktikan mengenai efek bahan uji terhadap inflamasi pada sendi dan jaringan sinovial dengan pemberian secara oral atau dosis yang digunakan belum mencapai dosis optimum sebagai antiarthritis. Selain itu, penggunaan bahan uji secara empiris di masyarakat digunakan dalam bentuk simplisia utuh tanpa proses ekstraksi sehingga hasilnya dapat mengalami perbedaan dengan hasil yang terbukti secara empiris tersebut.



Keterangan: KP = kontrol positif (suspensi natrium diklofenak 1 mg/200 g BB); DI = kelompok dosis I (suspensi bahan uji 28,06 mg/200 g BB); DII = kelompok dosis II (suspensi bahan uji 63,13 mg/200 g BB); DIII = kelompok dosis III (suspensi bahan uji 142,04 mg/200 g BB).

Gambar 4.3 Persentase penghambatan udem pada hari ke-7, 14, 21, dan 28 setelah diinduksi 0,1 ml *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) pada semua kelompok perlakuan kecuali kontrol normal dan kontrol negatif

Secara umum, persentase penghambatan udem rata-rata (Lampiran 2) bervariasi untuk setiap kelompoknya. Persentase penghambatan dosis I (28,06 mg/200 g BB ekstrak) lebih rendah dibandingkan dengan dosis II (63,13 mg/200 g BB ekstrak) dan kontrol positif (natrium diklofenak 1 mg/200 g BB) pada hari ke-7; kemudian mengalami peningkatan hingga maksimum pada hari ke-14, yang berarti persentase penghambatan dosis I lebih tinggi dibandingkan dosis II, dosis III (142,04 mg/200 g BB), dan kontrol positif; lalu menurun pada hari ke-21 sampai hari ke-28 sehingga memiliki persentase penghambatan yang lebih rendah dibandingkan dosis II dan III (Gambar 4.3). Namun berdasarkan analisis statistik volume udem kelompok dosis I tidak berbeda bermakna jika dibandingkan dengan dua kelompok dosis lainnya, kecuali kontrol positif pada hari ke-7 (Tabel 4.5).

Universitas Indonesia

Hal ini menunjukkan bahwa efek antiartritis dosis I setara dengan dosis II, III, dan kontrol positif, kecuali pada hari ke-7, dimana dosis I berbeda bermakna dengan kontrol positif.

Persentase penghambatan dosis II pada hari ke-7 lebih tinggi dibandingkan dosis I dan dosis III; kemudian menurun pada hari ke-14 menjadi lebih rendah dibandingkan dosis I; meningkat kembali pada hari ke-21 melebihi dosis I; dan meningkat melebihi kontrol positif, dosis I, dan dosis III pada hari ke-28 (Tabel 4.3). Jika dibandingkan dengan persentase penghambatan kontrol positif pada hari ke-7, 14, 21, dan 28, persentase penghambatan dosis II melebihi penghambatan oleh kontrol positif (Tabel 4.4). Berdasarkan diagram penghambatan udem rata-rata (Gambar 4.3), persentase penghambatan dosis II terlihat stabil pada keseluruhan hari perlakuan dan cukup tinggi dibandingkan sebagian besar kelompok lainnya. Secara analisis statistik, didapatkan bahwa volume udem kaki tikus kelompok dosis II tidak berbeda bermakna dengan kontrol positif dan kedua kelompok dosis lainnya (Tabel 4.5). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa efek antiartritis dari dosis II setara dengan dosis I, dosis III, dan kontrol positif (natrium diklofenak) pada hari ke-7, 14, 21, dan 28.

Persentase penghambatan udem dosis III (142,04 mg/200 g BB) lebih rendah dibandingkan dosis I, dosis II, dan kontrol positif pada hari ke-7 dan 14 (Tabel 4.4). Sedangkan persentase penghambatan dosis III lebih tinggi dibandingkan kelompok lainnya pada hari ke-21 (Tabel 4.4). Pada hari ke-28 persentase penghambatan dosis III lebih rendah dibandingkan dosis II, tetapi lebih tinggi dibandingkan kontrol positif dan dosis I (Gambar 4.3). Akan tetapi berdasarkan analisis statistik, tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok dosis III dengan dosis I, II, dan kontrol positif sehingga dapat dikatakan bahwa efek antiartritis dosis III sebanding dengan dosis I, II, dan kontrol positif.

Berdasarkan hasil analisis statistik (Tabel 4.5), perbandingan antara kelompok dosis menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara ketiga dosis baik pada hari ke-7, 14, 21, maupun 28. Sedangkan jika hanya dilihat berdasarkan Tabel 4.4 dan Gambar 4.3 sulit menentukan dosis yang terbaik karena efek penghambatan udem yang bervariasi pada setiap hari pengujian. Tidak terdapat perbedaan efek antiartritis yang bermakna antar ketiga dosis secara

statistik. Ketiga dosis tidak berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kontrol positif (natrium diklofenak), kecuali dosis I pada hari ke-7, sehingga secara statistik dapat dikatakan bahwa efek antiartritis kelompok dosis sebanding dengan kontrol positif, tetapi efek antiartritis dosis I pada hari ke-7 lebih baik dibandingkan kontrol positif karena memiliki perbedaan yang bermakna. Meskipun demikian, ketiga kelompok dosis dan kontrol positif juga tidak berbeda bermakna dengan kontrol negatif, kecuali kontrol positif pada hari ke-7, sehingga secara statistik efek antiartritis ketiga kelompok dosis dan kontrol positif tidak berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kontrol negatif.

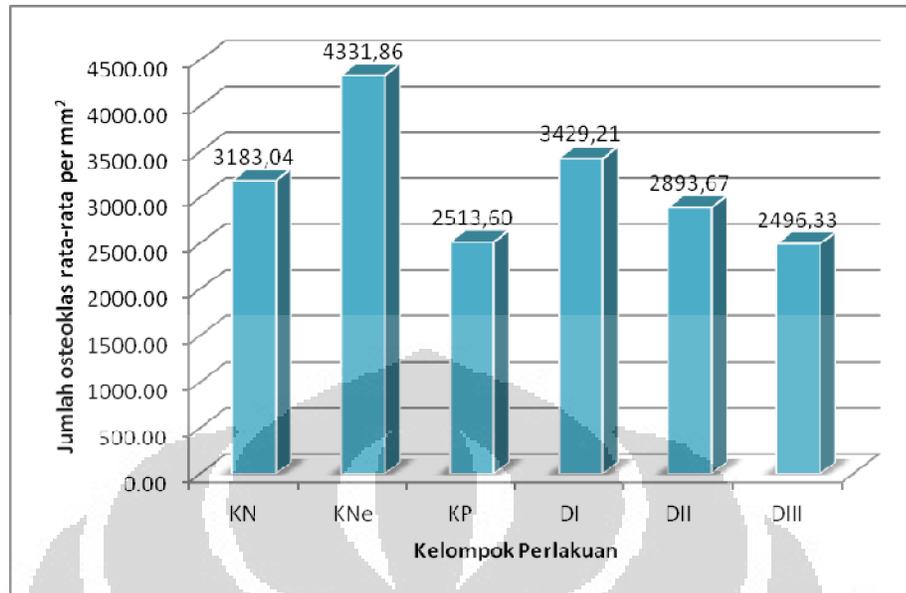
Berdasarkan data persentase penghambatan volume udem rata-rata (Tabel 4.4), efek antiartritis maksimum dicapai kelompok dosis II (63,13 mg/200 g BB ekstrak rumput mutiara) dicapai pada hari ke-14 jika dibandingkan dengan persentase penghambatan rata-rata kontrol positif walaupun kontrol positif memberikan efek penghambatan maksimum pada hari ke-7. Dari hasil penghambatan udem rata-rata ini dapat disimpulkan bahwa kontrol positif (natrium diklofenak), yang merupakan bahan uji sintetis, memiliki efek penghambatan terhadap inflamasi akut, yaitu pada fase awal terjadinya inflamasi. Sedangkan kelompok dosis yang meliputi dosis I berefek antiartritis maksimum pada hari ke-14, dosis II (63,13 mg/200 g BB) pada hari ke-7, dan dosis III (142,04 mg/200 g BB) pada hari ke-21 sehingga dapat disimpulkan bahwa kelompok dosis bekerja terhadap inflamasi secara kronik. Begitu pula dengan dosis II yang walaupun sudah menunjukkan efek antiartritis mulai hari ke-7, tetap mempertahankan efek penghambatannya pada hari ke-14, 21, sampai hari ke-28 (Gambar 4.3). Walaupun persentase penghambatan udem menunjukkan efek antiartritis, secara statistik dapat disimpulkan bahwa ketiga dosis uji tidak memiliki aktivitas antiartritis jika dibandingkan dengan kontrol negatif dan kontrol positif.

Aktivitas antiartritis yang merupakan antiinflamasi kronik diperkirakan dapat terjadi karena sifat antioksidatif dan aktivitas penangkapan radikal; regulasi aktivitas selular dari sel yang mempengaruhi inflamasi; modulasi enzim metabolisme asam arakhidonat (fosfolipase A2, siklooksigenase, lipoksigenase) dan NO sintase (García-Lafuente, Guillamón, Villares, Rostagno, & Martínez,

2009). Senyawa yang diperkirakan memiliki efek antiinflamasi dari ekstrak rumput mutiara adalah senyawa golongan flavonoid. Diperkirakan mekanisme kerja dari bahan uji ekstrak rumput mutiara yang lebih cenderung bekerja secara kronis adalah menghambat atau mengurangi jumlah mediator-mediator inflamasi yang terbentuk pada jaringan. Variasi-variasi yang terjadi juga diperkirakan disebabkan oleh variasi biologis antar-individu tikus.

4.6 Histologi Tulang dan Pengamatan Osteoklas

Setelah perlakuan selama 28 hari, pengaruh efek antiinflamasi rumput mutiara terhadap jumlah osteoklas pada tulang *calcaneus* hewan coba diamati dengan menggunakan histologi jaringan tulang. Dari hasil preparat tulang yang telah diwarnai (Gambar 4.4), dilakukan pengamatan dan penghitungan jumlah osteoklas pada masing-masing kelompok pada setiap lapang pandang, yaitu 38590 μm^2 . Hasil perhitungan per lapang pandang disajikan pada Tabel 4.6 yang kemudian diubah ke dalam satuan jumlah osteoklas per mm^2 luas lapang pandang (Tabel 4.7). Penyajian data dan analisis statistik dilakukan berdasarkan jumlah osteoklas per mm^2 luas lapang pandang yang diamati (Gambar 4.5).



Keterangan: KN = kontrol normal (CMC 0,5%); KNe = kontrol negatif (CMC 0,5%); KP = kontrol positif (natrium diklofenak 1 mg/200 g BB); DI = kelompok dosis I (bahan uji 28,06 mg/200 g BB); DII = kelompok dosis II (bahan uji 63,13 mg/200 g BB); DIII = kelompok dosis III (bahan uji 142,04 mg/200 g BB).

Gambar 4.5 Perbandingan jumlah osteoklas per mm² pada setiap kelompok perlakuan

Berdasarkan data pada Tabel 4.8, jumlah rata-rata osteoklas per mm² menurun secara berturut-turut dimulai dari dosis I, dosis II, kontrol positif, dan dosis III. Dosis III (142,04 mg/200 g BB ekstrak rumput mutiara) merupakan perlakuan dengan jumlah osteoklas terendah sehingga memiliki efek penghambatan terbaik terhadap jumlah osteoklas yang terbentuk akibat gejala inflamasi arthritis reumatoid pada tulang *calcaneus* tikus. Berdasarkan analisis statistik (Lampiran 8), tidak terdapat perbedaan bermakna antara ketiga kelompok dosis dan kontrol positif dengan kontrol normal sehingga dapat dikatakan bahwa efek perlakuan-perlakuan tersebut memiliki efek penghambatan osteoklas hingga mencapai kadar mendekati kelompok normal. Kontrol negatif memiliki perbedaan yang bermakna dibandingkan dengan kelima kelompok perlakuan lainnya; sedangkan jumlah osteoklas kelompok dosis mulai dari yang terkecil jumlahnya adalah dosis III, II, dan I yang memiliki perbedaan bermakna antara dosis I dengan dosis II dan III, tetapi jumlah osteoklas dosis II dan III tidak berbeda bermakna. Jika dilihat dari hasil perhitungan osteoklas, penurunan jumlah

osteoklas sebanding dengan peningkatan dosis yang diberikan sehingga dapat dikatakan bahwa efek penurunan osteoklas dipengaruhi oleh dosis.

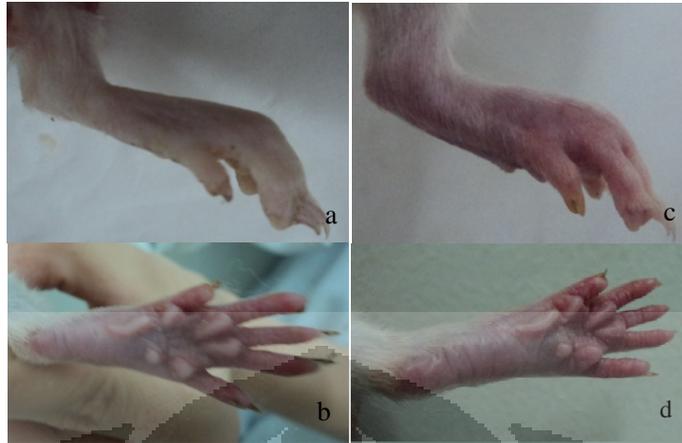
Jumlah osteoklas pada kelompok kontrol positif lebih sedikit dibandingkan dengan dosis II, tetapi masih melebihi jumlah osteoklas dosis III (Tabel 4.7). Berdasarkan analisis statistik, tidak terdapat perbedaan bermakna antara ketiga perlakuan tersebut sehingga dapat disimpulkan bahwa jumlah osteoklas terendah pada histologi jaringan tulang *calcaneus* didapatkan pada kelompok dosis II, dosis III, dan kontrol positif yang menunjukkan efek terbaik dalam menghambat pembentukan osteoklas. Hasil ini juga didukung oleh perbandingan dengan kelompok kontrol normal yang tidak berbeda bermakna serta perbedaan yang bermakna antara dosis II, III, dan kontrol positif dengan kontrol negatif. Karena dosis II dan III tidak memiliki perbedaan yang bermakna dalam jumlah osteoklas, maka dapat disimpulkan bahwa dosis II (63,13 mg/200 g BB) merupakan dosis terbaik untuk mencegah resorpsi tulang berlebihan akibat pembentukan osteoklas berlebih.

4.7 Hubungan antara Penurunan Jumlah Osteoklas Tulang *Calcaneus* dengan Efek Antiartritis Ekstrak Etanol 70% Rumput Mutiara

Pada pembahasan di bagian sebelumnya serta data pada Tabel 4.7, pemberian ekstrak etanol rumput mutiara dengan dosis bervariasi memberikan efek penghambatan terhadap pembentukan osteoklas dan efek terbaik diberikan oleh dosis II (63,13 mg/200 g BB ekstrak). Bahan uji rumput mutiara terbukti secara empiris memiliki efek antiinflamasi yang kuat, tetapi penelitian mengenai bahan uji tersebut sebagai agen antiinflamasi secara umum maupun sebagai antiartritis masih sangat terbatas. Bahan uji ekstrak rumput mutiara tidak menghasilkan perbedaan yang bermakna dengan kontrol negatif, dan masih menghasilkan perbedaan yang bermakna jika dibandingkan dengan kontrol normal sehingga dari pembahasan sebelumnya dapat disimpulkan bahwa ekstrak rumput mutiara tidak memiliki efek antiartritis. Akan tetapi, efek penghambatan terhadap pembentukan osteoklas terbukti secara statistik memiliki efek menurunkan jumlah osteoklas pada jaringan yang mengalami inflamasi.

Berdasarkan pembahasan sebelumnya, dapat disimpulkan bahwa meskipun efek antiinflamasi kronik dari ketiga dosis tidak bermakna secara statistik, efek ketiga dosis terhadap penurunan jumlah osteoklas lebih baik secara statistik dibandingkan kontrol negatif (Lampiran 8.4). Penurunan jumlah osteoklas terjadi karena efek antiinflamasi yang dimiliki oleh ekstrak rumput mutiara dalam menghambat sitokin-sitokin yang mencetuskan inflamasi seperti TNF- α dan interleukin 1 yang juga memiliki peran terhadap diferensiasi dan aktivasi osteoklas (Han et al., 2007). TNF dan sitokin inflamasi lainnya dapat merangsang terbentuknya mediator inflamasi termasuk prostaglandin, hasil konversi oleh enzim siklooksigenase, yang pada akhirnya akan menyebabkan resorpsi tulang akibat interaksi antara RANKL dengan RANK (Tracey, Klareskog, Sasso, Salfeld, & Tak, 2008). RANKL dapat berikatan dengan RANK dan berperan terutama dalam metabolisme tulang sebagai stimulator pembentukan, fusi, diferensiasi, aktivasi, dan kelangsungan hidup dari osteoklas (Kumar, Abbas, & Fausto, 2005). Osteoklas memiliki mekanisme untuk merusak jaringan termineralisasi dan kerusakan jaringan ini menyebabkan terbentuknya resorpsi yang dalam pada tulang (McInnes & Schett, 2011). Oleh karena mediator-mediator inflamasi yang dihambat oleh senyawa antiinflamasi, pembentukan dan pematangan osteoklas pun dapat dihambat sehingga efek antiarthritis juga dapat menurunkan jumlah osteoklas dan mencegah destruksi tulang.

Pada Gambar 4.6, perbandingan kondisi telapak kaki antara tikus yang tidak diinduksi CFA (kontrol normal) dengan tikus yang diinduksi CFA dapat diamati. Gejala arthritis berupa udem dan kemerahan pada telapak kaki yang diinduksi.



Keterangan: Telapak kaki tikus kelompok normal yang tidak diinduksi CFA dilihat dari samping (a) dan bawah (b); Telapak kaki tikus yang diinduksi CFA dilihat dari samping (c) dan bawah (d) menunjukkan gejala inflamasi berupa kemerahan dan udem

Gambar 4.6 Penampakan telapak kaki tikus pada hari ke-28 setelah induksi

Tabel 4.9 Perbandingan jumlah osteoklas dan volume telapak kaki rata-rata pada hari ke-28 semua kelompok perlakuan

Kelompok	Kontrol Normal	Kontrol Negatif	Kontrol Positif	Dosis I	Dosis II	Dosis III
Jumlah Osteoklas Rata-rata per mm ² ± SD	3183,04 ± 984,22	4331,86 ± 190,01	2513,60 ± 271,78	3429,21 ± 279,42	2893,67 ± 317,23	2496,33 ± 337,34
Volume Udem Rata-rata pada Hari-28 (µl) ± SD	24,00 ± 0,89	40,83 ± 5,34	40,50 ± 6,69	41,83 ± 5,34	37,50 ± 5,68	40,17 ± 6,97

Keterangan: kontrol normal = CMC 0,5%, kontrol negatif = CMC 0,5%, kontrol positif = natrium diklofenak 1 mg/200 g BB, dosis I = bahan uji ekstrak rumput mutiara 28,06 mg/200 g BB, dosis II = bahan uji ekstrak rumput mutiara 63,13 mg/200 g BB, dosis III = bahan uji ekstrak rumput mutiara 142,04 mg/200 g BB

Perbandingan antara jumlah osteoklas dan volume udem masing-masing kelompok pada hari ke-28 dapat dilihat pada Tabel 4.9. Selain itu, secara umum pada kelompok dengan rata-rata volume udem yang lebih kecil, jumlah osteoklas per lapangan pandang juga rendah yang berarti pemberian ekstrak memiliki potensi untuk menurunkan jumlah osteoklas pada jaringan tulang, meskipun tidak selalu demikian. Kelompok dosis II (63,13 mg/200 g BB) paling efektif menurunkan jumlah osteoklas karena meskipun jumlah osteoklas kelompok dosis III lebih kecil, kedua dosis tidak berbeda bermakna. Dosis II memiliki persentase

penghambatan volume udem yang paling tinggi pula pada hari ke-7 dan ke-28 dibandingkan kelompok lainnya meskipun secara statistik tidak menunjukkan efek antiarthritis. Efek terhadap penurunan osteoklas yang lebih bermakna diperkirakan karena ekstrak etanol rumput mutiara bekerja lebih kuat dan lebih dini terhadap pembentukan sitokin inflamasi yang bekerja pada reseptor di tulang dibandingkan pada jaringan yang mengalami gejala peradangan. Berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya (Bahtiar et al., 2011), perlakuan dengan bahan uji dilakukan selama 40 hari dan menghasilkan efek antiinflamasi serta penghambatan terhadap penurunan massa tulang yang bermakna. Oleh karena itu, efek antiarthritis yang belum tercapai secara bermakna diperkirakan karena waktu perlakuan yang belum cukup untuk mencapai efek tersebut.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 70% rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk.) memiliki efek menurunkan jumlah osteoklas jaringan tulang *calcaneus* tikus, tetapi belum menghasilkan efek antiartritis yang bermakna ditinjau dari penurunan volume udem telapak kaki tikus putih jantan yang diinduksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA). Efek bergantung kepada peningkatan dosis dengan dosis ekstrak 63,13 mg/200 g BB menunjukkan efek penurunan terbaik terhadap jumlah osteoklas.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk penggunaan ekstrak etanol 70% rumput mutiara terhadap tikus model artritis reumatoid dengan waktu perlakuan yang lebih panjang, yaitu lebih-kurang 40 hari sehingga memungkinkan tercapainya efek antiartritis yang bermakna dan sebanding dengan efek penurunan jumlah osteoklas yang telah dicapai.
2. Perlu digunakan pewarnaan histologi tulang yang dapat menandai aktivitas osteoklas, yaitu menggunakan jenis pewarnaan untuk *Tartrate Resistant-Acid Phosphatase* (TRAP) karena melalui pewarnaan ini dapat diamati tidak hanya penurunan jumlah osteoklas yang terjadi, tetapi juga disertai dengan penurunan aktivitasnya akibat pengobatan antiartritis.
3. Kontrol positif yang dapat digunakan pada penelitian selanjutnya adalah siklosporin yang menekan sistem umum, baik selular maupun humoral.

DAFTAR ACUAN

- Ahmad, R., Alib, A.M., Israf, D.A. & Ismaila, N.H. (2005). Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extracts of some *Hedyotis* species. *Life Sciences* 76, 1953–1964.
- Alawiyah, Lusiana. (2007). Ekstrak Etanol Rumput Mutiara (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lam) sebagai Antihepatotoksik pada Tikus Putih yang Diinduksi Parasetamol. Bogor: *Undergraduate* Tesis Sarjana Sains Institut Pertanian Bogor. 20 Januari 2012.
<http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/13917>.
- Bahtiar, Anton, et al. (2011). The I-Ser analog #290 promotes bone recovery in OP and RA mice. *Pharmacological Research* 64, 203-209.
- Bendele, A.M. (2001). Animal models of rheumatoid arthritis. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interaction*. 1(4), 377-385.
- Bendele, A.M., et al. (1999). Animal Models of Arthritis: Relevance to Human Disease. *Toxicologic Pathologists* 27, 134-142.
- Biradar, S., et al. (2010). Anti-inflammatory, anti-arthritic, analgesic, and anticonvulsant activity of cyperus essential oil. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2(4), 112-115.
- Boers, M., et al. (1997). Randomised comparison of combined step-down prednisolone, methotrexate and sulphasalazine with sulphasalazine alone in early rheumatoid arthritis. *The Lancet* 350, 309-318.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337–342.
- Calguneri, M., et al. (1999). Combination therapy versus monotherapy for the treatment of patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 17, 699–704.
- Cha, Y.I., Solnica-Krezel, L. and DuBois, R.N. (2006). Fishing for prostanoids: Deciphering the developmental functions of cyclooxygenase derived prostaglandins. *Developmental Biology* 298,263–72.
- Chauduri, K & Paul, A. (2008). Glucocorticoids and rheumatoid arthritis - a reappraisal. *Indian Journal of Rheumatology* 3(1), 21–28.

- Choy, E.H.S., & Panayi, G.S. (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *The New England journal of Medicine* 344, 907–916.
- Choy, E.H., Kingsley, G.H., Khosha, B., Pipitone, N., & Scott, D.L. (2005). A two year controlled trial of intramuscular depot steroids in patients with established rheumatoid arthritis who have shown an incomplete response to disease modifying anti-rheumatic drugs. *Annals of Rheumatic Diseases* 64, 1288 - 1293.
- Corwin, Elizabeth J. (2001). *Buku Saku Patofisiologi* (pp. 307-309). Jakarta: EGC.
- David & Arkeman, Hanslavina. (2008). Evaluation of the oral toxicity of formaldehyde in rats. *Université de la Méditerranée* 27, 106-112.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Materia Medika Indonesia Jilid VI* (pp. 119-120). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat* (pp. 13-18). Jakarta: Bakti Husada.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2008). *Farmakope Herbal Indonesia (ed. 1)* (pp. 174-175). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Department of Chronic Diseases and Health Promotion Chronic Respiratory Diseases and Arthritis World Health Organization. (2012). *Chronic Rheumatic Conditions*. 6 Januari 2012. <http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>.
- Dermond, O., & Ruegg, C. (2001). Inhibition of tumor angiogenesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs: emerging mechanisms and therapeutic perspectives. *Drug Resistance. Updates* 4(5), 314–21.
- Erben, R.G. (1997). Embedding of Bone Samples in Methylmethacrylate: An Improved Method Suitable for Bone Histomorphometry, Histochemistry, and Immunohistochemistry. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 45(2), 307–313.
- Federer, W.T. (1991). *Statistics and society: data collection and interpretation 2nd ed.* New York: Marcel Dekker.
- Fitriyah, Nurul. (2011). Efek Ekstrak Etanol 70% Rimpang Jahe Merah (*Zingiber Officinale* Rosc.) Terhadap Peningkatan Kepadatan Tulang Tikus Putih

Jantan RA (Rheumatoid Arthritis) yang Diinduksi oleh *Complete Freund's Adjuvant*. Depok: Skripsi Sarjana Farmasi Universitas Indonesia.

- García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M.A., & Martínez, J.A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research* 58, 537–552.
- Han, Kyoung-Youn, et al. (2007). Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by sauchinone. *Biochemical Pharmacology* 74, 911-923.
- He, G.Q., Xiong, H.P., Chen, Q.H., Ruan, H., Wang, Z.Y., & Traore, L. (2005). Optimization of conditions for supercritical fluid extraction of flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Zhejiang University Science* 6B(10), 999-1004.
- Herbal Insani. (2012). *Rumput Mutiara*. 10 Januari 2012. <http://www.herbalinsani.com/component/content/article/82-rumput-mutiara>.
- Henderson, Brian, Henderson, B., & Edwards, J.C.W. (1995). *Mechanisms and Model in Rheumatoid Arthritis* (pp. 472-474). Academic Press.
- Ilavarasan, R., Mallika, K., & Venkataraman. (2005). Anti-inflammatory and antioxidant activities of Cassia Fistula Linn Bark extracts. *Africa Journal Traditional CAM*. 2, 70-85
- Karakawa, et al. (2011). Diclofenac Sodium Inhibits NFκB Transcription in Osteoclasts. *Scritto da Administrator Mercoledì* 13, 25.
- Kumar, V., Abbas, A.K., & Fausto, N. (2005). *Robbins and Cotran Pathologic Basic of Disease 7th Edition Volume 2* (pp. 1305-1309). Philadelphia: Elsevier.
- Lee, C.K., Lee, E.Y., Chung, S.M, Mun, S.H., Yoo, B., & Moon, H.B. (2004). Effects of disease-modifying antirheumatic drugs and antiinflammatory cytokines on human osteoclastogenesis through interaction with receptor activator of nuclear factor kb, osteoprotegerin, and receptor activator of nuclear factor kb ligand. *Arthritis & Rheumatism* 50(12), 3831–3843.
- Lee, J., Jin, H., Shim, H., Kim, H., Ha, H. & Lee, Z.H. (2010). Epigallocatechin-3-gallate Inhibits Osteoclastogenesis by Down-Regulating c-Fos Expression and Suppressing the Nuclear Factor-κB Signal. *Molecular Pharmacology* 77, 17-25.
- Lucinda da Silva, R.M., Couto, A.G., & Bresolin, T.M.B. (2012). Medicinal plants and pharmaceutical technology. Dalam: Chechinel-Filho, V. (ed.). 2012. *Plant Bioactives and Drugs Discovery Priciples, Practices, and Perspectives Fourth Edition* (pp. 365). New Jersey: John Wiley & Sons.

- Lukas, C., Combe, B., & Morel, J. (2007). Rheumatoid arthritis and the evolution of therapy: from symptomatic to bench-to bedside biological drugs. *Future Rheumatology* 2(2), 143–152.
- McInnes, I.B., & Schett, G. (2011). Mechanisms of Disease The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *The New England Journal of Medicine* 365, 2205–2219.
- Miao, D., & Scutt, A. (2002). Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50(3), 333–340.
- Mishra, K., Dash, A.P., Swain, B.K., & Dey, N. (2009). Anti-malarial activities of *Andrographis paniculata* and *Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk. extracts and their combination with curcumin. *Malaria Journal* 8(26).
- Mori, S., Sawai, T., Teshima, T., & Kyogoku, M. (1988). A new decalcifying technique for immunohistochemical studies of calcified tissue, especially applicable to cell surface marker demonstration. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 36, 111–114.
- Mottonen, T., et al, for the FIN-RACo trial group. (1999). Comparison of combination therapy with single-drug therapy in early rheumatoid arthritis: a randomised trial. *The Lancet* 353, 1568–1573.
- Murphy, J.F. (2008). Cyclooxygenase-2 in Cardiovascular Biology. *Clinical Medicine: Cardiology* 2, 257–262.
- Nasution, Jani. (2011). Pola Aktivitas Pasien Rheumatoid Arthritis di Poliklinik Penyakit Dalam Rumah Sakit Umum Pusat Haji Adam Malik Medan. Medan: Skripsi Sarjana Keperawatan Universitas Sumatera Utara. 10 Januari 2011. <http://repository.usu.ac.id/bitstream/.../24610/.../Cover>.
- Noguchi, M., Kimoto, A., Sasamata, M., Miyata, K. (2008). Micro-CT imaging analysis for the effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, on inflammatory bone destruction in adjuvant arthritis rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 26, 461–468.
- Office of Animal Care and Use. (2011). *Guidelines for the Research Use of Adjuvants*. 18 Januari 2012. oacu.od.nih.gov/ARAC/freunds.pdf.
- Parmar, N.S., & Prakash, Siv. (2006). *Screening Methods in Pharmacology*. Oxford: Alpha Science International Ltd.
- Penapisan farmakologi, pengujian fitokimia dan pengujian klinik*. (1993). Jakarta: Pengembangan dan Pemanfaatan Obat Bahan Alam. 43–45.

- Pullar, T., Hunter, J.A., & Capell, H.A. (1987). Effect of sulphasalazine on the radiological progression of rheumatoid arthritis. *Annals of Rheumatic Diseases* 46, 398–402.
- Qian, K.K., LaBreck, J.C., Gruber, H.E., and Yuehuei, H.A. Histological Techniques for Decalcified Bone and Cartilage. Dalam: Yuehuei, H.A., & Martin, Kylie L. (2003). *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage* (pp. 209-218). New Jersey: Humana Press.
- Raji, Udoh, U.S., Oluwadara, O.O., Akinsomisoye, O.S., Awobajo, O., & Adheshoga, K. (2002). Anti-inflammatory and analgesic properties of the rhizome extract of *Zingiber officinale*. *African Journal of Biomedical Research* 5, 121-124.
- Rich, E., Moreland, L.W., & Alarcon, G.S. (1999). Paucity of radiographic progression in rheumatoid arthritis treated with methotrexate as the first disease modifying antirheumatic drug. *The Journal of Rheumatology* 26, 259–61.
- Richards, P.J., Williams, B.D., & Williams, A.S. (2001). Suppression of chronic streptococcal cell wall-induced arthritis in lewis rats by liposomal clodronate. *Rheumatology* 20, 978-987.
- Romanowska, K., Grotkiewicz, M., Rewekant, M., & Makulska-Nowak, H.E. (2008). Sex dependent antinociceptive activity and blood pressure changes in SHR, WKY and WAG rat strains after diclofenac treatment. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 65(6), 723-729.
- Sanchez, S., Alarcon De La Lastra, S., Ortiz, P., Motilva, V., & Martin, M. J. (2002). Gastrointestinal Tolerability of Metamizol, Acetaminophen, and Diclofenac in Subchronic Treatment in Rats. *Digestive Diseases and Sciences* 47(12), 2791–2798.
- Sandoz Limited. (2009). Diclofenac Sodium. Datapharm Communication Ltd. 2 April 2012.
http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/22653/SPC#PHARMACOKINETIC_PROPS
- Sathishkumar, T., Baskar, R., Shanmugam, S., Rajasekaran, P., Sadasivam, S., & Manikandan, V. (2008). Optimization of flavonoids extraction from the leaves of *Tabernaemontana heyneana* Wall. using L₁₆ Orthogonal design. *Nature and Science*, 6(3), 10-21.
- Schett, G., Coates, L.C., Ash, Z.R., Finzel, S., & Conaghan, P.G. (2011). Structural damage in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis: traditional views, novel insights gained from TNF blockade, and concepts for the future. *Arthritis Research & Therapy* 13(Suppl 1), S4.

- Schweitzer, A., Hasler-Nguyen, N., & Zijlstra, J. (2009). Preferential uptake of the non steroid anti-inflammatory drug diclofenac into inflamed tissues after a single oral dose in rats. *BMC Clinical Pharmacology* 9,5.
- Siddalingappa, C.M., Rajesh, T., Kudagi, B.L., Krishnakanthk, K., & Sujith, T.R. (2011). Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Tinospora cordifolia* in rodents. *International Journal of Basic Medical Science* 2(5), 306-311.
- Skinner, R. Decalcification of Bone Tissue. Dalam: An, Yuehuei H. dan Martin, Kylie L. (2003). *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage* (pp. 167-177). New Jersey: Humana Press.
- Soenanto, H., & Kuncoro, S. (2005). *Hancurkan Batu Ginjal Dengan Tanaman Herbal* (pp. 32). Jakarta: Puspa Swara.
- Suematsu, Ayako, et al. (2007). Scientific basis for the efficacy of combined use of antirheumatic drugs against bone destruction in rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatology* 17, 17–23.
- Tak, P.P., Smeets, T.J.M., Daha, M. R., Kluin, P.M., Meijers, K.A.E., Brand, R. (1997). Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity. *Arthritis & Rheumatism* 40, 217–225.
- Tracey, D., Klareskog L., Sasso E.H., Salfeld J.G., & Tak, P.P. (2008). Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics* 117, 244–279.
- Trihendradi, C. (2011). *Langkah Mudah Melakukan Analisis Statistik Menggunakan SPSS 19* (pp. 59-65, 131-140). Yogyakarta: Penerbit Andi.
- Ulfgren, A. K., Lindblad, S., Klareskog, L., Andersson, J., & Andersson, U. (1995). Detection of cytokine producing cells in the synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis. *Annals of Rheumatic Diseases* 54, 654–661.
- Ulfgren, A. K., Andersson, U., Engström, M., Klareskog, L., Maini, R. N., & Taylor, P. C. (2000). Systemic anti-tumor necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis down-regulates synovial tumor necrosis factor alpha synthesis. *Arthritis & Rheumatism* 43, 2391–2396.
- United States Department of Agriculture. (2012). *Plants Profile Oldenlandia corymbosa* L. 17 Januari 2012. <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=OLCO>.
- University of Iowa. *Recommendations for Use and Alternatives to Freund's Complete Adjuvant*. 18 Januari 2012.

<http://research.uiowa.edu/animal/?get=adjuvant>.

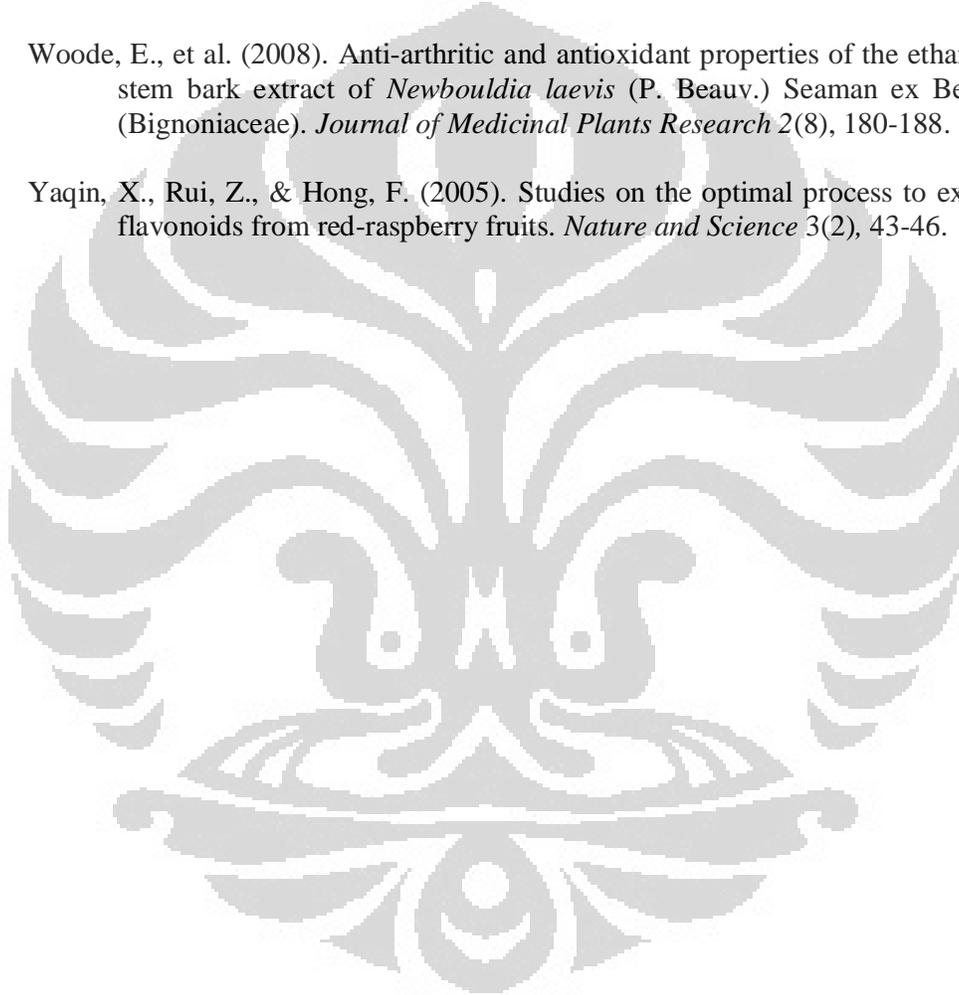
Wawancara dengan dr. Ipak Ridmah Rikenawaty, dokter herbal di Klinik dan Apotek Pala Farma, Depok, 5 Januari 2012.

Wells, B. J., et al. (2009). *Pharmacotherapy Handbook Seventh Edition* (pp. 31-41). USA: The McGraw-Hill Companies.

Wijayakusuma, Hembing. (2008). *Tumpas Hepatitis dengan Ramuan Herbal* (pp. 70-73). Jakarta: Pustaka Bunda.

Woode, E., et al. (2008). Anti-arthritic and antioxidant properties of the ethanolic stem bark extract of *Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seaman ex Bureau (Bignoniaceae). *Journal of Medicinal Plants Research* 2(8), 180-188.

Yaqin, X., Rui, Z., & Hong, F. (2005). Studies on the optimal process to extract flavonoids from red-raspberry fruits. *Nature and Science* 3(2), 43-46.

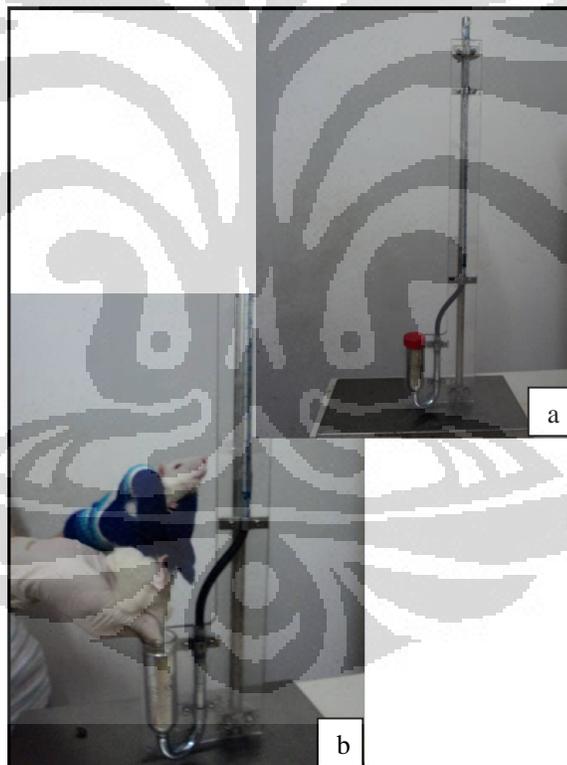






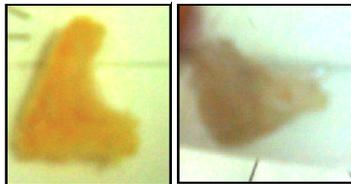
[Sumber: Mishra, Dash Swain, & Dey, 2009, telah diolah kembali]
 Keterangan: (a) rumpun tanaman rumput mutiara; (b) tanaman rumput mutiara yang berbunga

Gambar 3.1 Tanaman rumput mutiara



Keterangan: (a) alat plethysmometer dan (b) posisi pengukuran volume udem tikus

Gambar 3.2 Plethysmometer dan pengukuran volume kaki tikus



Keterangan: bagian tulang *calcaneus* tikus (kiri) dan bagian tulang *calcaneus* saat diletakkan dalam kantung dekalsifikasi (kanan)

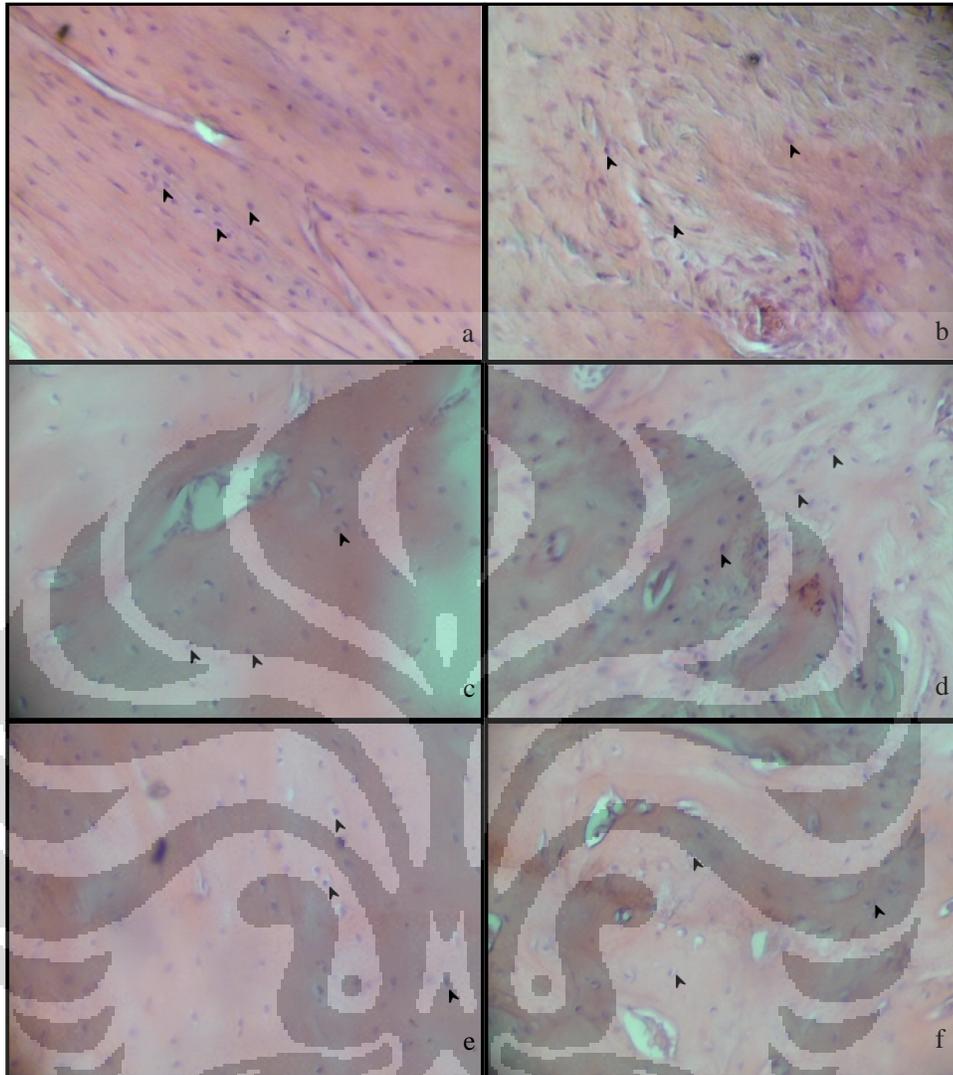
Gambar 3.3 Bagian tulang yang diisolasi



Gambar 3.4 Proses dekalsifikasi tulang *calcaneus* menggunakan larutan Na_2EDTA dengan pengadukan konstan

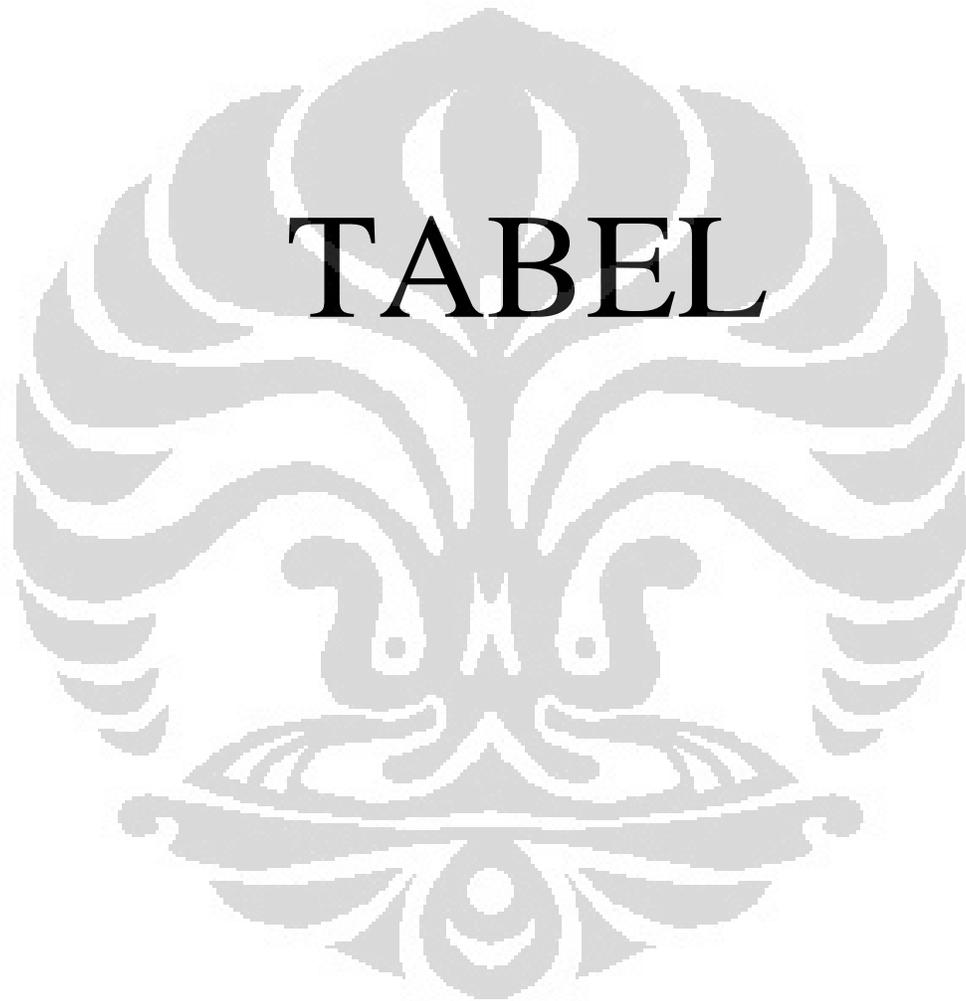


Gambar 3.5 *Rotary microtome* untuk memotong jaringan



Keterangan: (a) kontrol normal (CMC 0,5%), (b) kontrol negatif (CMC 0,5%), (c) kontrol positif (natrium diklofenak 1 mg/200 g BB), (d) kelompok dosis I (bahan uji ekstrak rumput mutiara 28,06 mg/200 g BB), (e) kelompok dosis II (bahan uji ekstrak rumput mutiara 63,13 mg/200 g BB), (f) kelompok dosis III (bahan uji ekstrak rumput mutiara 142,04 mg/200 g BB); osteoklas tersebar pada lapang pandang ($38590 \mu\text{m}^2$) yang ditunjukkan dengan mata panah

Gambar 4.4 Histologi tulang *calcaneus* dengan menggunakan pewarnaan hematoksilin dan eosin, pengamatan dengan mikroskop optik, perbesaran 100x



Tabel 4.2 Volume telapak kaki tikus pada hari ke-1 sampai 28 setelah diinduksi 0,1 ml *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) pada semua kelompok perlakuan kecuali kontrol normal

Perlakuan	N (Ulangan Tikus)	Volume Telapak Kaki (μ l)				
		Hari-1	Hari-7	Hari-14	Hari-21	Hari-28
Kontrol Normal	1	24,0	28,0	24,0	25,0	24,0
	2	25,0	27,0	25,0	24,0	25,0
	3	25,0	27,0	27,0	26,0	25,0
	4	23,0	24,0	23,0	24,0	24,0
	5	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0
	6	23,0	23,0	22,0	23,0	23,0
	Rata-rata	23,83	25,33	24,00	24,17	24,00
	Standar Deviasi	0,98	2,25	1,79	1,17	0,89
Kontrol Negatif	1	23,0	43,0	46,0	48,0	51,0
	2	25,0	50,0	46,0	43,0	41,0
	3	27,0	41,0	38,0	42,0	40,0
	4	21,0	38,0	38,0	35,0	37,0
	5	23,0	38,0	39,0	36,0	36,0
	6	21,0	35,0	36,0	32,0	40,0
	Rata-rata	23,33	40,83	40,50	39,33	40,83
	Standar Deviasi	2,34	5,27	4,37	5,99	5,34
Kontrol Positif	1	27,0	35,0	35,0	43,0	47,0
	2	25,0	37,0	43,0	52,0	43,0
	3	21,0	35,0	36,0	28,0	34,0
	4	24,0	41,0	49,0	46,0	49,0
	5	24,0	34,0	34,0	33,0	35,0
	6	22,0	31,0	31,0	29,0	35,0
	Rata-rata	23,83	35,50	38,00	38,50	40,50
	Standar Deviasi	2,14	3,33	6,69	9,89	6,69
Dosis I	1	26,0	43,0	42,0	43,0	48,0
	2	26,0	43,0	42,0	43,0	48,0
	3	26,0	43,0	38,0	41,0	43,0
	4	26,0	37,0	38,0	40,0	39,0
	5	24,0	37,0	30,0	33,0	36,0
	6	26,0	44,0	32,0	34,0	37,0
	Rata-rata	25,67	41,17	37,00	39,00	41,83
	Standar Deviasi	0,82	3,25	5,02	4,43	5,34

(lanjutan)

Dosis II	1	25,0	35,0	28,0	34,0	49,0
	2	20,0	27,0	37,0	36,0	36,0
	3	26,0	38,0	39,0	34,0	36,0
	4	22,0	38,0	40,0	34,0	35,0
	5	25,0	41,0	40,0	41,0	34,0
	6	25,0	42,0	42,0	40,0	35,0
	Rata-rata	23,83	36,83	37,67	36,50	37,50
	Standar Deviasi	2,32	5,42	5,01	3,21	5,68
Dosis III	1	25,0	42,0	45,0	37,0	40,0
	2	25,0	38,0	38,0	37,0	37,0
	3	29,0	47,0	47,0	44,0	50,0
	4	23,0	48,0	39,0	36,0	43,0
	5	20,0	31,0	30,0	30,0	29,0
	6	27,0	42,0	41,0	40,0	42,0
	Rata-rata	24,83	41,33	40,00	37,33	40,17
	Standar Deviasi	3,13	6,25	6,00	4,63	6,97

Keterangan: kontrol normal = CMC 0,5%, kontrol negatif = CMC 0,5%, kontrol positif = natrium diklofenak 1 mg/200 g BB, dosis I = bahan uji ekstrak rumput mutiara 28,06 mg/200 g BB, dosis II = bahan uji ekstrak rumput mutiara 63,13 mg/200 g BB, dosis III = bahan uji ekstrak rumput mutiara 142,04 mg/200 g BB

Tabel 4.4 Persentase penghambatan udem rata-rata pada hari ke-7, 14, 21, dan 28 setelah diinduksi 0,1 ml *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) pada semua kelompok perlakuan kecuali kontrol normal

Perlakuan	Persentase Penghambatan Udem Rata-rata (%)			
	Hari ke-7	Hari ke-14	Hari ke-21	Hari ke-28
Kontrol Normal	0	0	0	0
Kontrol Negatif	0	0	0	0
Kontrol Positif	33,33	17,48	8,33	4,76
Dosis I	11,43	33,98	16,67	7,62
Dosis II	25,71	19,42	20,83	21,90
Dosis III	5,71	11,65	21,88	12,38

Keterangan: kontrol normal = CMC 0,5%, kontrol negatif = CMC 0,5%, kontrol positif = natrium diklofenak 1 mg/200 g BB, dosis I = bahan uji ekstrak rumput mutiara 28,06 mg/200 g BB, dosis II = bahan uji ekstrak rumput mutiara 63,13 mg/200 g BB, dosis III = bahan uji ekstrak rumput mutiara 142,04 mg/200 g BB

Tabel 4.5 Perbandingan ada tidaknya perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan berdasarkan hasil uji Mann-Whitney

Kelompok		Hari-7	Hari-14	Hari-21	Hari-28
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 = natrium diklofenak 1 mg/200 g BB, dosis I = bahan uji ekstrak rumput mutiara 28,06 mg/200 g BB, dosis II = bahan uji ekstrak rumput mutiara 63,13 mg/200 g BB, dosis III = bahan uji ekstrak rumput mutiara 142,04 mg/200 g BB

Tabel 4.6 Jumlah osteoklas setiap kelompok perlakuan pada pengamatan histologi tulang *calcaneus*

N (Ulangan Tikus)	Jumlah Osteoklas per Lapang Pandang (38590 μm^2)					
	Kontrol Normal	Kontrol Negatif	Kontrol Positif	Dosis I	Dosis II	Dosis III
1	132	159	89	143	101	79
2	77	169	103	141	103	82
3	83	171	108	122	125	97
4	167	158	80	120	103	109
5	117	177	103	126	129	108
6	161	169	99	142	109	103
Rata-rata	122,83	167,17	97,00	132,33	111,67	96,33
Standar Deviasi	37,98	7,33	10,49	10,78	12,24	13,02

Keterangan: kontrol normal = CMC 0,5%, kontrol negatif = CMC 0,5%, kontrol positif = natrium diklofenak 1 mg/200 g BB, dosis I = bahan uji ekstrak rumput mutiara 28,06 mg/200 g BB, dosis II = bahan uji ekstrak rumput mutiara 63,13 mg/200 g BB, dosis III = bahan uji ekstrak rumput mutiara 142,04 mg/200 g BB

Tabel 4.7 Jumlah osteoklas setiap kelompok perlakuan pada pengamatan histologi tulang *calcaneus* per mm^2

N (Ulangan Tikus)	Jumlah Osteoklas per mm^2					
	Kontrol Normal	Kontrol Negatif	Kontrol Positif	Dosis I	Dosis II	Dosis III
1	3420.58	4120.24	2306.30	3705.62	2617.26	2047.16
2	1995.34	4379.37	2669.09	3653.80	2669.09	2124.90
3	2150.82	4431.20	2798.65	3161.44	3239.18	2513.60
4	4327.55	4094.32	2073.08	3109.61	2669.09	2824.57
5	3031.87	4586.68	2669.09	3265.09	3342.83	2798.65
6	4172.07	4379.37	2565.43	3679.71	2824.57	2669.09
Rata-rata	3183,04	4331,86	2513,60	3429,21	2893,67	2496,33
Standar Deviasi	984,22	190,01	271,78	279,42	317,23	337,34

Keterangan: kontrol normal = CMC 0,5%, kontrol negatif = CMC 0,5%, kontrol positif = natrium diklofenak 1 mg/200 g BB, dosis I = bahan uji ekstrak rumput mutiara 28,06 mg/200 g BB, dosis II = bahan uji ekstrak rumput mutiara 63,13 mg/200 g BB, dosis III = bahan uji ekstrak rumput mutiara 142,04 mg/200 g BB

Tabel 4.8 Jumlah osteoklas rata-rata setiap kelompok perlakuan

Kelompok	Rata-rata Jumlah Osteoklas/lapang pandang (38590 μm^2)	Rata-rata Jumlah Osteoklas/mm^2
Kontrol normal	122,83 \pm 37,98	3183,04 \pm 984,22
Kontrol negatif	167,17 \pm 7,33	4331,86 \pm 190,01
Kontrol positif	97,00 \pm 10,49	2513,60 \pm 271,78
Dosis I	132,33 \pm 10,78	3429,21 \pm 279,42
Dosis II	111,67 \pm 2,24	2893,67 \pm 317,23
Dosis III	96,33 \pm 13,02	2496,33 \pm 337,34

Keterangan: kontrol normal = CMC 0,5%, kontrol negatif = CMC 0,5%, kontrol positif = natrium diklofenak 1 mg/200 g BB, dosis I = bahan uji ekstrak rumput mutiara 28,06 mg/200 g BB, dosis II = bahan uji ekstrak rumput mutiara 63,13 mg/200 g BB, dosis III = bahan uji ekstrak rumput mutiara 142,04 mg/200 g BB



LAMPIRAN

Lampiran 1. Penentuan dosis dan pembuatan bahan uji

1.1 Penentuan dosis dan pembuatan suspensi natrium diklofenak

Dosis natrium diklofenak untuk uji antiartritis adalah 5 mg/kg BB tikus setiap hari secara oral (Ilavarasan et.al., 2005, Fitriyah, 2011; Siddalingappa, Rajesh, Kudagi, Krishnakanthk, & Sujith, 2011). Oleh karena itu, pada penelitian ini ditentukan dosis yang akan dipakai adalah 5 mg/kg BB tikus.

$$5 \text{ mg/kg BB} = 10 \text{ mg}/1000 \text{ g} \times 200 \text{ g} = 1 \text{ mg}/200 \text{ g BB tikus}$$

Dalam 2 ml suspensi mengandung 1 mg natrium diklofenak.

Untuk membuat 50 ml suspensi natrium diklofenak 1 mg/200 g BB, dibutuhkan natrium diklofenak, $50/2 \text{ ml} \times 1 = 25 \text{ mg}$, maka sebanyak 25 mg natrium diklofenak, suspensikan dalam CMC 0,5% sampai 50 ml.

1.2 Penentuan dosis dan pembuatan suspensi ekstrak rumput mutiara

Dosis uji yang digunakan pada penelitian ini adalah sesuai dosis yang telah terbukti berefek secara empiris yang kemudian dikonversi ke dalam dosis tikus (Herbal Insani, 2012; wawancara dengan dr. Ipak Ridmah Rikenawaty, 2012), yaitu :

$$\text{Dosis I} = 160 \text{ mg}/200 \text{ g BB tikus}$$

$$\text{Dosis II} = 360 \text{ mg}/200 \text{ g BB tikus}$$

$$\text{Dosis III} = 810 \text{ mg}/200 \text{ g BB tikus}$$

Pembuatan bahan uji dosis I, II, dan III dari ekstrak yang sudah diperoleh adalah sebagai berikut :

$$\text{Berat serbuk kering} : 250 \text{ g}$$

$$\text{Berat ekstrak kental yang diperoleh} : 43,85 \text{ g}$$

$$\text{Rendeman ekstrak yang diperoleh} = 43,85 \text{ g} / 250 \text{ g} \times 100\% = 17,54\%, \text{ maka :}$$

$$\text{Dosis I ekstrak rumput mutiara} = 160 \text{ mg}/200 \text{ g BB}$$

$$\text{Berat dosis yang ditimbang} = 160 \text{ mg} \times 17,54 / 100 = 28,06 \text{ mg}$$

Volume pemberian untuk ekstrak rumput mutiara adalah 2 ml/200 g BB

$$\text{Maka, } 28,06 \text{ mg}/2 \text{ ml} = 14,03 \text{ mg/ml}$$

(lanjutan)

Volume dosis I rumput mutiara yang akan dibuat sebanyak 20 ml. Berat ekstrak rumput mutiara yang ditimbang $20 \text{ ml} \times 14,03 \text{ mg/ml} = 280,6 \text{ mg}$. Suspensikan 280,6 mg ekstrak rumput mutiara dengan larutan CMC 0,5% hingga 20 ml.

Dosis II ekstrak rumput mutiara = $360 \text{ mg}/200 \text{ g BB}$

Berat dosis yang ditimbang = $360 \text{ mg} \times 17,54 / 100 = 63,13 \text{ mg}$

Volume pemberian untuk ekstrak rumput mutiara adalah $2 \text{ ml}/200 \text{ g BB}$

Maka, $63,13 \text{ mg}/2 \text{ ml} = 31,565 \text{ mg/ml}$

Volume dosis I rumput mutiara yang akan dibuat sebanyak 20 ml. Berat ekstrak rumput mutiara yang ditimbang $20 \text{ ml} \times 31,565 \text{ mg/ml} = 631,3 \text{ mg}$. Suspensikan 631,3 mg ekstrak rumput mutiara dengan larutan CMC 0,5% hingga 20 ml.

Dosis III ekstrak rumput mutiara = $810 \text{ mg}/200 \text{ g BB}$

Berat dosis yang ditimbang = $810 \text{ mg} \times 17,54 / 100 = 142,04 \text{ mg}$

Volume pemberian untuk ekstrak rumput mutiara adalah $2 \text{ ml}/200 \text{ g BB}$

Maka, $142,04 \text{ mg}/2 \text{ ml} = 71,02 \text{ mg/ml}$

Volume dosis I rumput mutiara yang akan dibuat sebanyak 20 ml. Berat ekstrak rumput mutiara yang ditimbang $20 \text{ ml} \times 71,02 \text{ mg/ml} = 1420,4 \text{ mg}$. Suspensikan 1420,4 mg ekstrak rumput mutiara dengan larutan CMC 0,5% hingga 20 ml.

Lampiran 2. Penentuan persentase penghambatan volume udem rata-rata

2.1 Cara memperoleh persentase penghambatan volume udem rata-rata

Rumus % penghambatan udem rata-rata :

$$\% \text{ Penghambatan Udem rata - rata} = \left\{ 1 - \frac{[a-x]}{[b-y]} \right\} \times 100 \% \quad (3.2)$$

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)

Contoh perhitungan persentase penghambatan udem rata-rata pada kelompok dosis I hari ke-7 :

$$a = 41,17 ; x = 25,67 \rightarrow a-x = 15,47$$

$$b = 40,83 ; y = 23,33 \rightarrow b-x = 17,50$$

$$\text{maka, \% penghambatan udem} = [1 - (15,47/17,50)] \times 100\%$$

$$= (1-0,884) \times 100\% = 11,60 \%$$

Lampiran 3. Uji statistik volume telapak kaki tikus seluruh kelompok uji pada hari ke-1

3.1 Uji normalitas (Uji Shapiro-Wilk) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-1

- a. Tujuan : untuk mengetahui kenormalan data sebagai syarat uji ANAVA
- b. Hipotesis :
 - Ho = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi normal
 - Ha = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi normal
- c. Kriteria Uji :
 - Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak
 - Sig. > 0,05 berarti Ho diterima
- d. Hasil :

Kelompok		Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Hari-1	Kontrol normal	.775	6	.035
	Kontrol negatif	.908	6	.421
	Kontrol positif	.967	6	.875
	Dosis 1	.496	6	.000
	Dosis 2	.823	6	.094
	Dosis 3	.978	6	.939

- e. Kesimpulan : Ho ditolak, berarti data volume telapak kaki tikus tidak terdistribusi normal.

(lanjutan)

3.2 Uji homogenitas (Uji Levene) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-1

a. Tujuan : untuk mengetahui homogenitas data sebagai syarat uji ANAVA

b. Hipotesis :

Ho = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi homogen

Ha = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi homogen

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil:

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.727	5	30	.159

e. Kesimpulan: Ho diterima, berarti data volume telapak kaki tikus terdistribusi homogen.

(lanjutan)

3.3 Uji analisis Kruskal Wallis terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-1

- a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari volume telapak kaki tikus tiap perlakuan
- b. Hipotesis :
 - Ho = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus tiap kelompok perlakuan
 - Ha = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus tiap kelompok perlakuan
- c. Kriteria Uji :
 - Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak
 - Sig. > 0,05 berarti Ho diterima
- d. Hasil :

Udem hari ke-1	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
	6,549	5	.256

- e. Kesimpulan: Ho diterima, berarti tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar perlakuan pada hari ke-1.

Lampiran 4. Uji statistik volume telapak kaki tikus seluruh kelompok uji pada hari ke-7

4.1 Uji normalitas (Uji Shapiro-Wilk) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-7

a. Tujuan : untuk mengetahui kenormalan data sebagai syarat uji ANAVA

b. Hipotesis :

Ho = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi normal

Ha = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi normal

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil :

kelompok		Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Hari-7	Kontrol normal	.836	6	.121
	Kontrol negatif	.922	6	.519
	Kontrol positif	.953	6	.724
	Dosis 1	.724	6	.011
	Dosis 2	.874	6	.243
	Dosis 3	.927	6	.558

e. Kesimpulan : Ho ditolak, berarti data volume telapak kaki tikus tidak terdistribusi normal.

(lanjutan)

4.2 Uji homogenitas (Uji Levene) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-7

a. Tujuan : untuk mengetahui homogenitas data sebagai syarat uji ANAVA

b. Hipotesis :

Ho = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi homogen

Ha = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi homogen

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil:

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.877	5	30	.508

e. Kesimpulan: Ho diterima, berarti data volume telapak kaki tikus terdistribusi homogen.

(lanjutan)

4.3 Uji Kruskal Wallis terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-7

- a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari volume telapak kaki tikus tiap perlakuan
- b. Hipotesis :
 Ho = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus tiap kelompok perlakuan
 Ha = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus tiap kelompok perlakuan
- c. Kriteria Uji :
 Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak
 Sig. > 0,05 berarti Ho diterima
- d. Hasil :

Udem hari ke-7	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
	20.031	5	.001

- e. Kesimpulan: Ho ditolak, berarti terdapat perbedaan yang bermakna antar perlakuan pada hari ke-7.

(lanjutan)

4.4 Uji Mann-Whitney terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-7

a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari volume telapak kaki tikus antara enam kelompok perlakuan

b. Hipotesis :

Ho = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus antara enam kelompok perlakuan

Ha = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus antara enam kelompok perlakuan

c. Kriteria Uji :

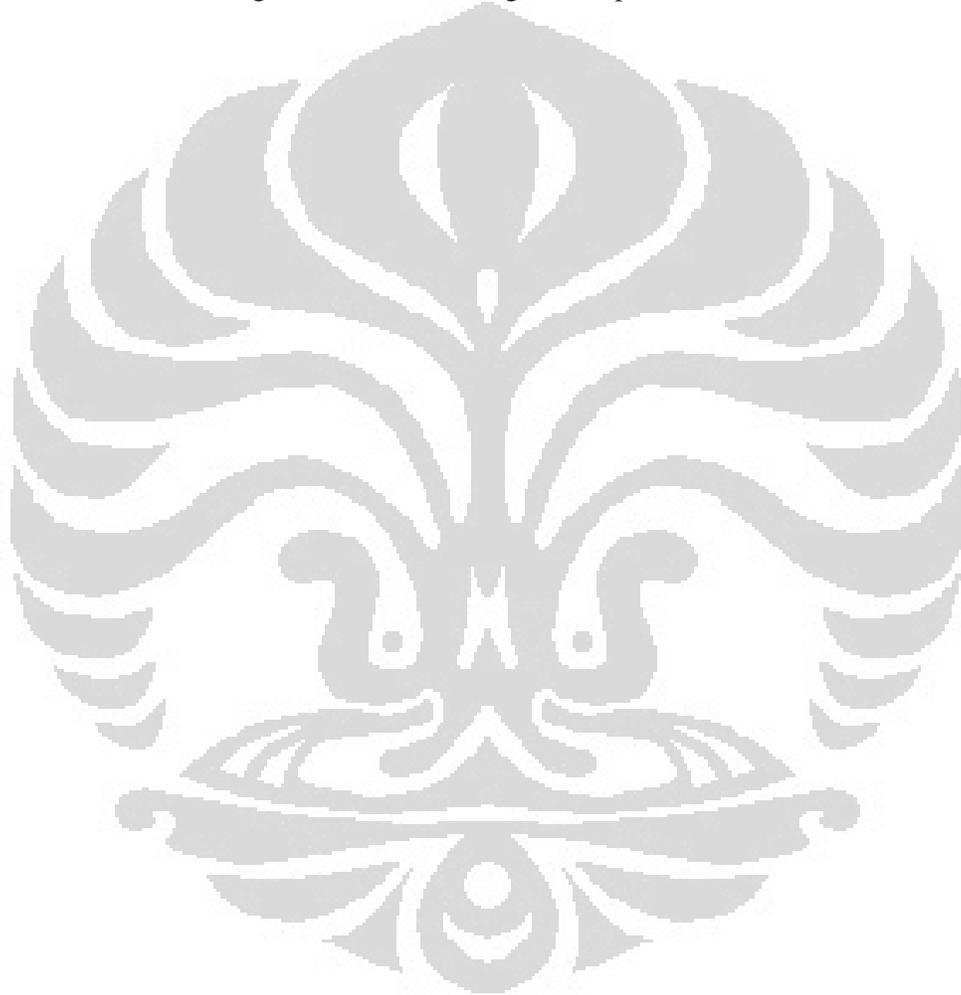
Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil:

Kelompok		Asymp. Sig. (2 tailed)
Kontrol normal	Kontrol negatif	.004
	Kontrol positif	.004
	Dosis 1	.004
	Dosis 2	.004
	Dosis 3	.004
Kontrol negatif	Kontrol positif	.043
	Dosis 1	.683
	Dosis 2	.326
	Dosis 3	.747
Kontrol positif	Dosis 1	.015
	Dosis 2	.293
	Dosis 3	.064
Dosis 1	Dosis 2	.106
	Dosis 3	1.000
Dosis 2	Dosis 3	.144

- e. Kesimpulan: H_0 ditolak pada perbandingan antara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya; antara kontrol positif dengan kontrol negatif dan dosis I. Hal ini berarti pada hari ke-7 terdapat perbedaan bermakna antara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya; antara kontrol positif dengan kontrol negatif dan dosis I. Namun, tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok dosis I, II, dan III dengan kontrol negatif serta antara ketiga kelompok dosis.



Lampiran 5. Uji statistik volume telapak kaki tikus seluruh kelompok uji pada hari ke-14

5.1 Uji normalitas (Uji Shapiro-Wilk) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-14

a. Tujuan : untuk mengetahui kenormalan data sebagai syarat uji ANAVA

b. Hipotesis :

Ho = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi normal

Ha = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi normal

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil :

Kelompok		Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Hari-14	Kontrol normal	.933	6	.607
	Kontrol negatif	.804	6	.064
	Kontrol positif	.141	6	.366
	Dosis 1	.879	6	.264
	Dosis 2	.787	6	.045
	Dosis 3	.949	6	.735

e. Kesimpulan : Ho ditolak, berarti data volume telapak kaki tikus tidak terdistribusi normal.

(lanjutan)

5.2 Uji homogenitas (Uji Levene) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-14

a. Tujuan : untuk mengetahui homogenitas data sebagai syarat uji ANAVA

b. Hipotesis :

Ho = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi homogen

Ha = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi homogen

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil:

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.412	5	30	.248

e. Kesimpulan: Ho diterima, berarti data volume telapak kaki tikus terdistribusi homogen.

(lanjutan)

5.3 Uji analisis nonparametrik Kruskal Wallis terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-14

- a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari volume telapak kaki tikus tiap perlakuan
- b. Hipotesis :
 Ho = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus tiap kelompok perlakuan
 Ha = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus tiap kelompok perlakuan
- c. Kriteria Uji :
 Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak
 Sig. > 0,05 berarti Ho diterima
- d. Hasil :

Udem hari ke-14	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
	15.818	5	.007

- e. Kesimpulan: Ho ditolak, berarti terdapat perbedaan yang bermakna antar perlakuan pada hari ke-14.

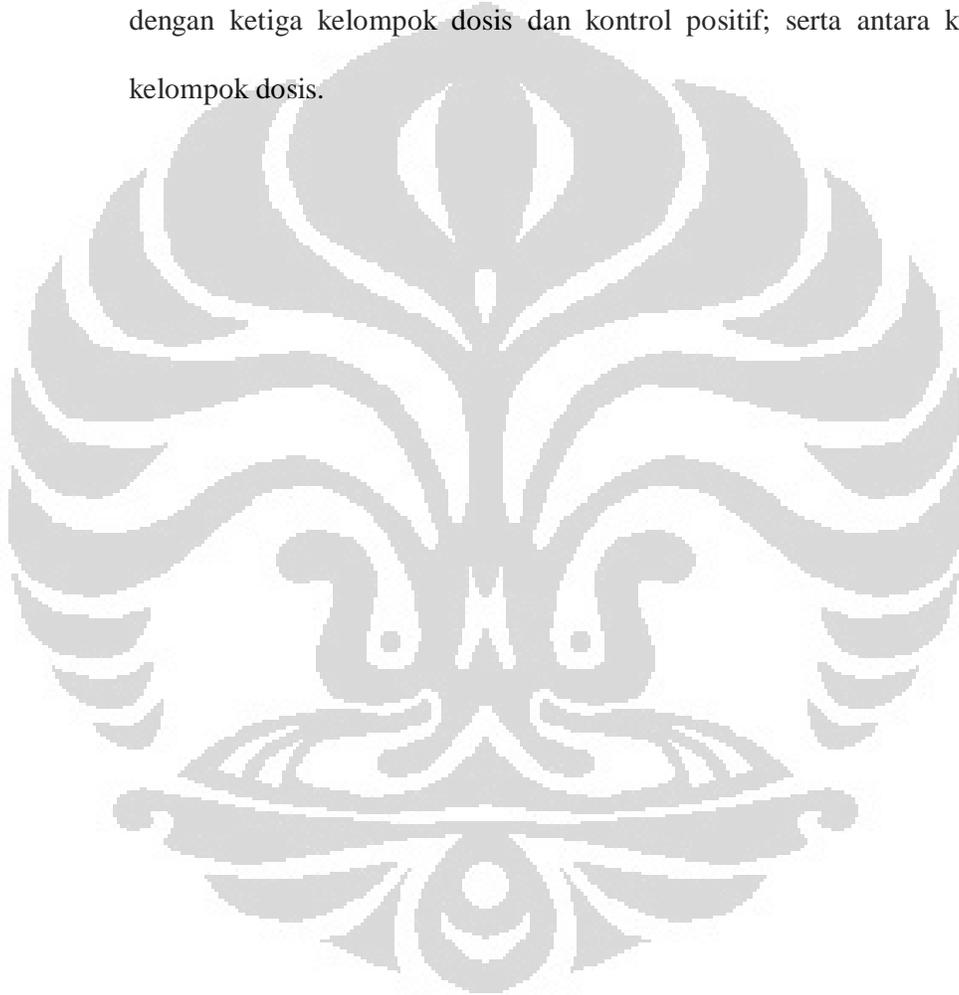
(lanjutan)

5.4 Uji Mann-Whitney terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-14

- a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari volume telapak kaki tikus antara tujuh kelompok perlakuan
- b. Hipotesis :
 - Ho = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus antara enam kelompok perlakuan
 - Ha = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus antara enam kelompok perlakuan
- c. Kriteria Uji :
 - Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak
 - Sig. > 0,05 berarti Ho diterima
- d. Hasil :

Kelompok		Asymp. Sig. (2 tailed)
Kontrol normal	Kontrol negatif	.004
	Kontrol positif	.004
	Dosis 1	.004
	Dosis 2	.004
	Dosis 3	.004
Kontrol negatif	Kontrol positif	.227
	Dosis 1	.326
	Dosis 2	.809
	Dosis 3	.808
Kontrol positif	Dosis 1	.872
	Dosis 2	.748
	Dosis 3	.522
Dosis 1	Dosis 2	.871
	Dosis 3	.373
Dosis 2	Dosis 3	.470

- e. Kesimpulan: H_0 ditolak pada perbandingan antara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya. Hal ini berarti pada hari ke-14 terdapat perbedaan bermakna antara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya. Namun, tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kontrol positif dengan ketiga kelompok dosis dan kontrol negatif; kontrol negatif dengan ketiga kelompok dosis dan kontrol positif; serta antara ketiga kelompok dosis.



Lampiran 6. Uji statistik volume telapak kaki tikus seluruh kelompok uji pada hari ke-21

6.1 Uji normalitas (Uji Shapiro-Wilk) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-21

- a. Tujuan : untuk mengetahui kenormalan data sebagai syarat uji ANAVA
- b. Hipotesis :
 - Ho = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi normal
 - Ha = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi normal
- c. Kriteria Uji :
 - Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak
 - Sig. > 0,05 berarti Ho diterima
- d. Hasil :

Kelompok		Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Hari ke-21	Kontrol normal	.908	6	.421
	Kontrol negatif	.951	6	.752
	Kontrol positif	.908	6	.425
	Dosis 1	.835	6	.118
	Dosis 2	.786	6	.044
	Dosis 3	.955	6	.781

- e. Kesimpulan : Ho ditolak, berarti data volume telapak kaki tikus tidak terdistribusi normal.

(lanjutan)

6.2 Uji homogenitas (Uji Levene) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-21

a. Tujuan : untuk mengetahui homogenitas data sebagai syarat uji ANAVA

b. Hipotesis :

Ho = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi homogen

Ha = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi homogen

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil:

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7.428	5	30	.000

e. Kesimpulan: Ho ditolak, berarti data volume telapak kaki tikus tidak terdistribusi homogen.

(lanjutan)

6.3 Uji analisis nonparametrik Kruskal Wallis terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-21

- a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari volume telapak kaki tikus tiap perlakuan
- b. Hipotesis :
 Ho = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus tiap kelompok perlakuan
 Ha = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus tiap kelompok perlakuan
- c. Kriteria Uji :
 Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak
 Sig. > 0,05 berarti Ho diterima
- d. Hasil :

Udem hari ke-21	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
	15.326	5	.009

- e. Kesimpulan: Ho ditolak, berarti terdapat perbedaan yang bermakna antar perlakuan pada hari ke-21.

(lanjutan)

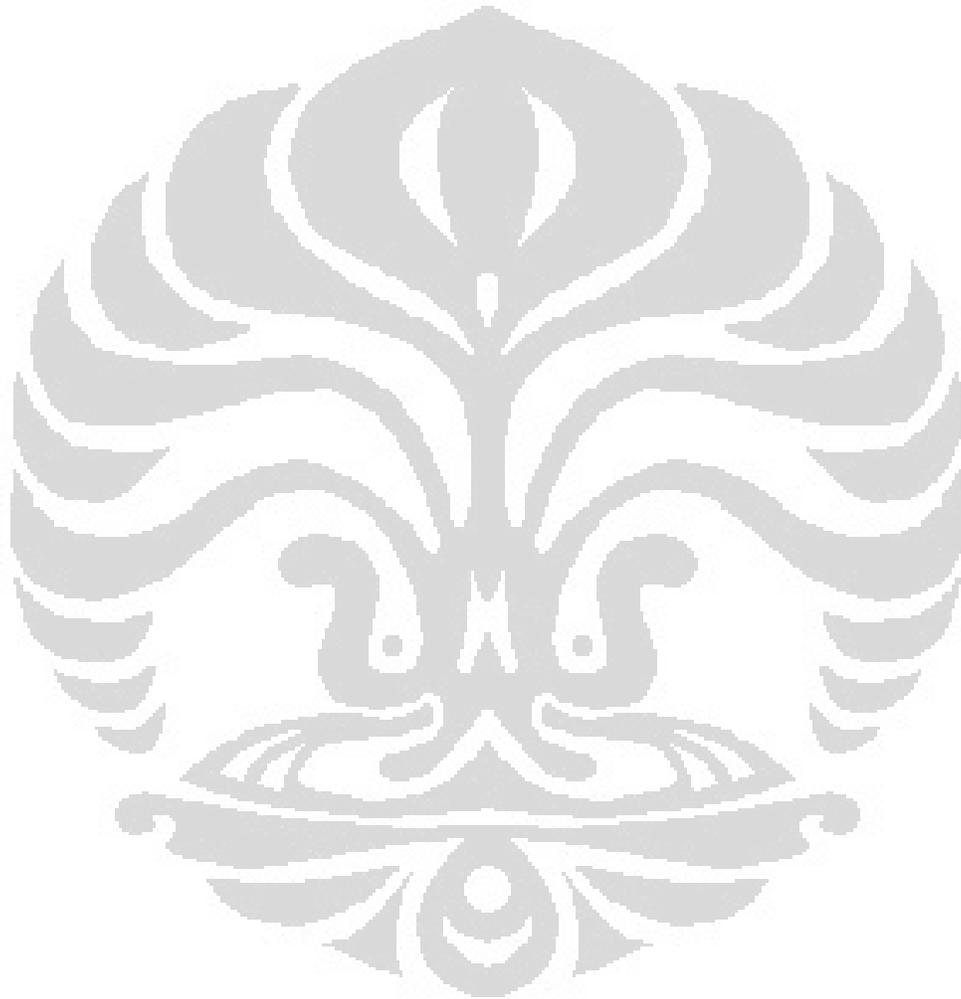
6.4 Uji Mann-Whitney terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-21

- a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari volume telapak kaki tikus antara enam kelompok perlakuan
- b. Hipotesis :
 - Ho = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus antara enam kelompok perlakuan
 - Ha = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus antara enam kelompok perlakuan
- c. Kriteria Uji :
 - Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak
 - Sig. > 0,05 berarti Ho diterima
- d. Hasil :

Kelompok		Asymp. Sig. (2 tailed)
Kontrol normal	Kontrol negatif	.004
	Kontrol positif	.004
	Dosis 1	.004
	Dosis 2	.004
	Dosis 3	.004
Kontrol negatif	Kontrol positif	.810
	Dosis 1	.872
	Dosis 2	.294
	Dosis 3	.810
Kontrol positif	Dosis 1	.936
	Dosis 2	1.000
	Dosis 3	1.000
Dosis 1	Dosis 2	.367
	Dosis 3	.573
Dosis 2	Dosis 3	.648

- e. Kesimpulan: Ho ditolak pada perbandingan antara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya. Hal ini berarti pada hari ke-21 terdapat

perbedaan bermakna antara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya. Namun, tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kontrol negatif dengan ketiga kelompok dosis dan kontrol positif dengan ketiga kelompok dosis.



Lampiran 7. Uji statistik volume telapak kaki tikus seluruh kelompok uji pada hari ke-28

7.1 Uji normalitas (Uji Shapiro-Wilk) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-28

- a. Tujuan : untuk mengetahui kenormalan data sebagai syarat uji ANAVA
- b. Hipotesis :
 - Ho = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi normal
 - Ha = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi normal
- c. Kriteria Uji :
 - Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak
 - Sig. > 0,05 berarti Ho diterima
- d. Hasil :

Kelompok		Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Hari ke-28	Kontrol normal	.853	6	.167
	Kontrol negatif	.812	6	.075
	Kontrol positif	.842	6	.136
	Dosis 1	.871	6	.232
	Dosis 2	.621	6	.001
	Dosis 3	.972	6	.905

- e. Kesimpulan : Ho ditolak, berarti data volume telapak kaki tikus tidak terdistribusi normal.

(lanjutan)

7.2 Uji homogenitas (Uji Levene) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-28

a. Tujuan : untuk mengetahui homogenitas data sebagai syarat uji ANAVA

b. Hipotesis :

Ho = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi homogen

Ha = data volume telapak kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi homogen

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil:

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.942	5	30	.117

e. Kesimpulan: Ho diterima, berarti data volume telapak kaki tikus terdistribusi homogen.

(lanjutan)

7.3 Uji analisis nonparametrik Kruskal Wallis terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-28

- a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari volume telapak kaki tikus tiap perlakuan
- b. Hipotesis :
 Ho = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus tiap kelompok perlakuan
 Ha = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus tiap kelompok perlakuan
- c. Kriteria Uji :
 Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak
 Sig. > 0,05 berarti Ho diterima
- d. Hasil :

Udem hari ke-28	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
	17.184	5	.004

- e. Kesimpulan: Ho ditolak, berarti terdapat perbedaan yang bermakna antar perlakuan pada hari ke-28.

(lanjutan)

7.4 Uji Mann-Whitney terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-28

a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari volume telapak kaki tikus antara enam kelompok perlakuan

b. Hipotesis :

Ho = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus antara enam kelompok perlakuan

Ha = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus antara enam kelompok perlakuan

c. Kriteria Uji :

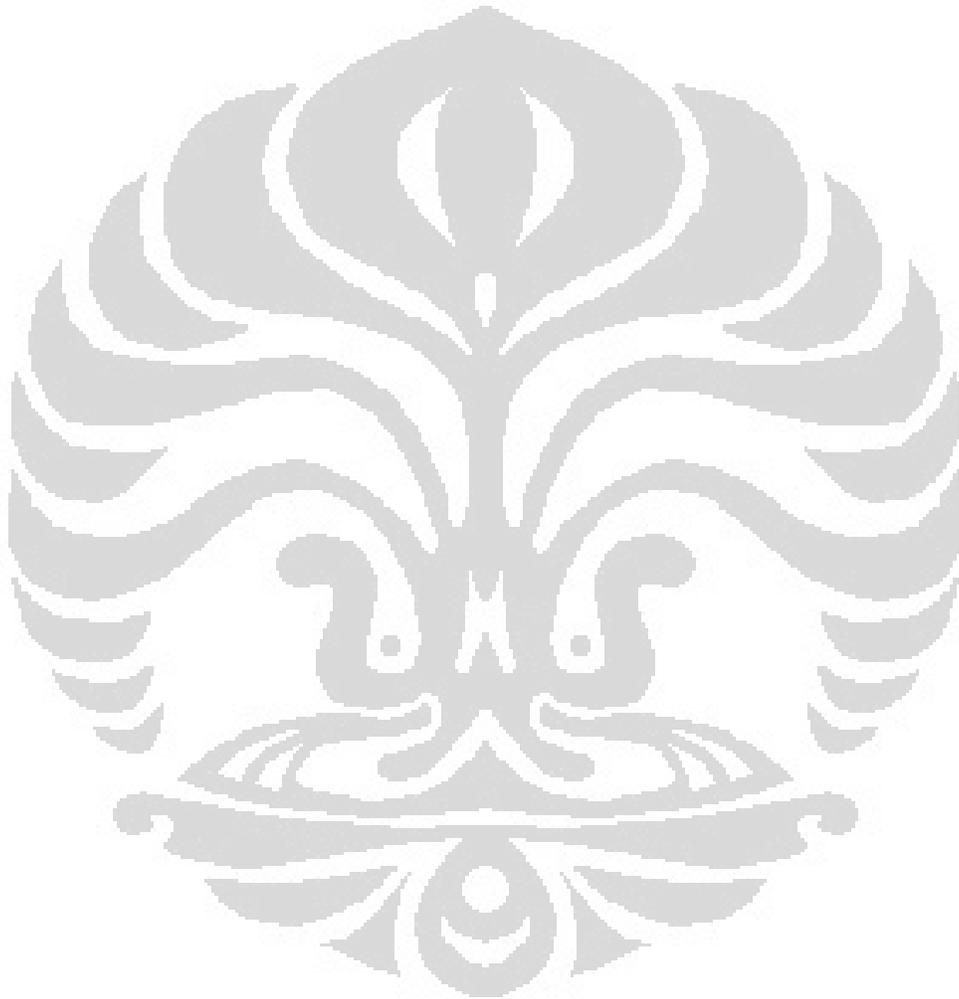
Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil :

Kelompok		Asymp. Sig. (2 tailed)
Kontrol normal	Kontrol negatif	.004
	Kontrol positif	.004
	Dosis 1	.004
	Dosis 2	.004
	Dosis 3	.004
Kontrol negatif	Kontrol positif	.630
	Dosis 1	.872
	Dosis 2	.052
	Dosis 3	.809
Kontrol positif	Dosis 1	.469
	Dosis 2	.743
	Dosis 3	.936
Dosis 1	Dosis 2	.075
	Dosis 3	.872
Dosis 2	Dosis 3	.199

- e. Kesimpulan: H_0 ditolak pada perbandingan antara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya. Hal ini berarti pada hari ke-28 terdapat perbedaan bermakna antara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya. Namun, tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kontrol negatif dengan ketiga kelompok dosis dan kontrol positif; serta kontrol positif dengan ketiga kelompok dosis.



Lampiran 8. Uji statistik jumlah osteoklas histologi tulang *calcaneus* tikus seluruh kelompok uji

8.1 Uji normalitas (Uji Shapiro-Wilk) terhadap seluruh kelompok uji

- a. Tujuan : untuk mengetahui kenormalan data sebagai syarat uji ANAVA
- b. Hipotesis :
 Ho = data jumlah osteoklas histologi tulang *calcaneus* tikus berasal dari populasi yang terdistribusi normal
 Ha = data jumlah osteoklas histologi tulang *calcaneus* tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi normal
- c. Kriteria Uji :
 Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak
 Sig. > 0,05 berarti Ho diterima
- d. Hasil :

Kelompok	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Kontrol normal	.912	6	.447
Kontrol negatif	.904	6	.395
Kontrol positif	.903	6	.392
Dosis 1	.944	6	.075
Dosis 2	.945	6	.079
Dosis 3	.868	6	.218

- e. Kesimpulan : Ho diterima, berarti data jumlah osteoklas histologi tulang *calcaneus* tikus terdistribusi normal.

(lanjutan)

8.2 Uji homogenitas (Uji Levene) terhadap seluruh kelompok uji

a. Tujuan : untuk mengetahui homogenitas data sebagai syarat uji ANAVA

b. Hipotesis :

Ho = data jumlah osteoklas histologi tulang *calcaneus* tikus berasal dari populasi yang terdistribusi homogen

Ha = data jumlah osteoklas histologi tulang *calcaneus* tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi homogen

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil:

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6.741	5	30	.000

e. Kesimpulan: Ho ditolak, berarti data jumlah osteoklas histologi tulang *calcaneus* tikus tidak terdistribusi homogen.

(lanjutan)

8.3 Uji analisis nonparametrik Kruskal Wallis terhadap seluruh kelompok uji

- a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari jumlah osteoklas histologi tulang *calcaneus* tikus tiap perlakuan
- b. Hipotesis :
 - Ho = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah osteoklas histologi tulang *calcaneus* tikus tiap kelompok perlakuan
 - Ha = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah osteoklas histologi tulang *calcaneus* tikus tiap kelompok perlakuan
- c. Kriteria Uji :
 - Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak
 - Sig. > 0,05 berarti Ho diterima
- d. Hasil :

Chi-Square	Df	Asymp. Sig.
21.905	5	.001

- e. Kesimpulan: Ho ditolak, berarti terdapat perbedaan jumlah osteoklas yang bermakna antar perlakuan.

(lanjutan)

8.4 Uji Mann-Whitney terhadap seluruh kelompok uji

a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari jumlah osteoklas histologi tulang *calcaneus* tikus antara enam kelompok perlakuan

b. Hipotesis :

Ho = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah osteoklas histologi tulang *calcaneus* tikus antara enam kelompok perlakuan

Ha = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah osteoklas histologi tulang *calcaneus* tikus antara enam kelompok perlakuan

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil :

Kelompok		Asymp. Sig. (2 tailed)
Kontrol normal	Kontrol negatif	.025
	Kontrol positif	.261
	Dosis 1	.631
	Dosis 2	.521
	Dosis 3	.200
Kontrol negatif	Kontrol positif	.004
	Dosis 1	.004
	Dosis 2	.004
	Dosis 3	.004
Kontrol positif	Dosis 1	.004
	Dosis 2	.073
	Dosis 3	.936
Dosis 1	Dosis 2	.037
	Dosis 3	.004
Dosis 2	Dosis 3	.125

- e. Kesimpulan: H_0 ditolak pada perbandingan antara kontrol negatif dengan kelima kelompok lainnya; kontrol positif dengan kelompok dosis I; serta dosis I dengan dosis II dan dosis III. Hal ini berarti pada hasil perhitungan jumlah osteoklas pada histologi tulang *calcaneus* terdapat perbedaan bermakna antara kelompok-kelompok tersebut. Namun, tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kontrol normal dengan ketiga kelompok dosis dan kontrol positif; kontrol positif dengan kelompok dosis II dan III; serta antara kelompok dosis II dengan dosis III.



Lampiran 9. Sertifikat analisis natrium diklofenak dari PT. Kimia Farma

PT. KIMIA FARMA
 Plant Jakarta
 KF Plant Jakarta Jl. Rawasalem V No.1 Kawasan Industri Pulosari Jakarta Timur
 Phone : 021-4603354 Fax : 021-4603143

14 JAN 2011

Hasil Pemeriksaan Laboratorium

BAHAN BAKU

No. BTBS	: GRA1-11000006 <i>1/c</i>	No. LA / HPL	: QA11-11000006 ✓
Tgl. BTBS	: 03/01/2011	Tgl. Sampling	: 04/01/2011
Gudang / Lokasi	: Plant Jakarta Bahan	Tgl. Mulai Periksa	: 12/01/2011
Nama Barang	: 1000203 NATRII DICLOFENAC	Tgl. Selesai Periksa	: 12/01/2011
		Diperiksa Oleh	: Putri
		Tgl. Periksa Ulang	: 12/01/2012
Merek/Produsen	: Yung Zip Chemical Ind Co. Ltd, Taiwan	MFD	: 28/04/2010
Jumlah Barang	: 11 Box @ 10 kg = 110 kg	ED	: 28/04/2015
Jumlah Sample	: 40 Gram	Pemasok	: PT. GLOBAL CHEMINDO
	: 4 x 10 g (1 - 4)	No. Batch/lot	: DCS0410001
Diambil Oleh	: M. Rusdi		

Pemeriksaan	Hasil	Syarat	Unit	Metode
Pemerian	1 - 4 = Serbuk kristal berwarna putih, tidak berbau	Serbuk kristal berwarna putih atau hampir putih, higroskopik		USP 32
Identifikasi	1 - 4 = Memenuhi Pengujian pH (1 % b/v dalam air) : 7.27	Memenuhi Pengujian	7 - 8.5	USP 32 (MIF0006)
Suara Pengeringan (105 derajat C, 3 Jam)	0.06		< 0.5 %	USP 32
Kadar	100.04			% USP 32
Kadar Terhadap Zat Kering	100.1	99 - 101	%	USP 32
Kesimpulan	Diluluskan			
Note	Analisa @			

Authorization	In Charge / Position	Signature	Date Time	Notes
Prepare by	Lucia Hendriks Supervisor Pemeriksaan Bahan Baku	<i>[Signature]</i>	12/1/11	
Verified by	Drs. Hedi Mardoko Asisten Pengawasan Mutu	<i>[Signature]</i>	13/1/11	
Approved by	Dra. Lisa Murningsih Manajer Pemeriksaan Mutu	<i>[Signature]</i>	13/1/11	

Lampiran 10. Sertifikat analisis *Complete Freund's Adjuvant (CFA)* dari Sigma-Aldrich

Page 1 of 1

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name	Freund's Adjuvant, Complete, cell suspension	
Product Number	F5881	
Product Brand	SIGMA	

TEST	SPECIFICATION	LOT 070M8705 RESULTS
Appearance (Color)	Light Yellow to Yellow	Light Yellow
Appearance (Form)	Liquid with particulates	Liquid
Appearance (Turbidity)	Clear	Clear
emulsification assay	Pass	Pass
	Forms emulsion with 0.85% NaCl	

Note

Each mL contains 1 mg mycobacterium tuberculosis(H 37RA, ATCC 25177), heat killed and dried, 0.85 mL mineral oil and 0.15 mL mannide monooleate.

Specification Date:	JUL 2010
Date of QC Release:	AUG 2010
Print Date:	AUG 03 2010

Rodney Burbach
 Rodney Burbach, Manager
 Quality Control
 St. Louis, Missouri USA

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/CertOfAnalysisPage.do?symbol=F5881&LotNo=070M8705&bran...> 1/21/2011

Lampiran 11. Sertifikat determinasi tanaman rumput mutiara dari Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada



UNIVERSITAS GADJAH MADA
FAKULTAS BIOLOGI
LABORATORIUM TAKSONOMI TUMBUHAN
Jalan Teknika Selatan Sekip Utara Yogyakarta 55281 Telpon 6492262/6492272 Fax: 0274580839

SURAT KETERANGAN
Nomor: 0321/T.Tb/II/2012

Yang bertanda tangan dibawah ini, Kepala Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, menerangkan dengan sesungguhnya bahwa,

Nama : Margaretha SMU
NIM : 0806327862
Asal instansi : Fakultas MIPA Universitas Indonesia

telah melakukan identifikasi tumbuhan dengan hasil sebagai berikut,

SAMPEL	FAMILIA	GENUS	SPECIES	SYNONYM	NAMA DAERAH
1.	Rubiaceae	<i>Hedyotis</i>	<i>Hedyotis corymbosa</i> (L.) Lamk.	<i>Oldenlandia corymbosa</i> L.	Rumput Mutiara

Identifikasi tersebut dibantu oleh Drs. Heri Sujadmiko, M.Si.
Demikian surat keterangan ini diberikan untuk dapat dipergunakan seperlunya

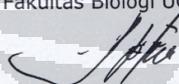
Yogyakarta, 28 Februari 2012

Mengetahui,
Dekan Fakultas Biologi
Universitas Gadjah Mada



Dr. Retno Peni Sañcayaningsih, M.Sc
NIP. 195509291982032002

Kepala Laboratorium
Taksonomi Tumbuhan
Fakultas Biologi UGM



Drs. Heri Sujadmiko, M.Si
NIP. 19640209 199103 1001

(lanjutan)

KUNCI DETERMINASI MENUJU SPECIES

Species : *Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk

Genus : Hedyotis

1b. 2a. 3a. 4c. 5a. 6a.

Familia : Rubiaceae

1b. 66b. 79b. 80b. 81a. 82b. 83a. Hedyotis

Nama Lokal: Rumpun Mutiara

Daftar Pustaka:

Flora of Java (Spermatophytes only) By C.A. Becker, D.Sc.(Utrecht) and
RC. Bakhuizen Van den Brink Jr. Ph.D.

Lampiran 12. Sertifikat hewan uji



**BAGIAN PRODUKSI TERNAK DAGING KERJA DAN ANEKA TERNAK
DEPARTEMEN ILMU PRODUKSI DAN TEKNOLOGI FETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

Sekretariat : Jl. Agatis, Kampus IPB, Dramaga, Bogor 16680
Telepon : (0251) 8624774, Fax. (0251) 8624774

SURAT KETERANGAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Prof. Dr. Ir. Pollung H. Siagian, MS
Jabatan : Kepala Bagian Produksi Ternak Daging Kerja Dan Aneka Ternak
Alamat : Jl. Agatis kampus IPB Darmaga-Bogor
Telp. 0251-8624774, Fax. 0251-8624774

Menyatakan bahwa tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Sprague Dawley* (SD) yang dikembangkan di Laboratorium Non Ruminansia dan Satwa Harapan, Fakultas Peternakan IPB, telah memenuhi syarat sebagai hewan uji untuk penelitian atau kegiatan praktikum.

Demikian surat keterangan ini dibuat dengan sebenar-benarnya.

Bogor, 10 Januari 2012
Kepala



Prof. Dr. Ir. Pollung H. Siagian, MS
NIP. 19460825 197711 1 001

Lampiran 13. Skema kerja pelaksanaan uji antiartritis dan pengerjaan histologi tulang

