



UNIVERSITAS INDONESIA

**EFEK EKSTRAK ETANOL 70% RIMPANG JAHE MERAH
(*Zingiber officinale* Rosc. Var. Rubrum) TERHADAP
PENINGKATAN KEPADATAN TULANG TIKUS PUTIH BETINA RA
(Rheumatoid Arthritis) YANG DIINDUKSI OLEH COMPLETE
FREUND'S ADJUVANT**

SKRIPSI

**NURUL FITRIYAH
0706264910**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**EFEK EKSTRAK ETANOL 70% RIMPANG JAHE MERAH
(*Zingiber officinale* Rosc. Var. Rubrum) TERHADAP
PENINGKATAN KEPADATAN TULANG TIKUS PUTIH BETINA RA
(Rheumatoid Arthritis) YANG DIINDUKSI OLEH COMPLETE
FREUND'S ADJUVANT**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

**NURUL FITRIYAH
0706264910**

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

ii

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Nurul Fitriyah

NPM : 0706264910

Tanda Tangan : 

Tanggal : Januari 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Nurul Fitriyah
NPM : 0706264910
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Efek Ekstrak Etanol 70% Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* Rosc. Var. Rubrum) terhadap Peningkatan Kepadatan Tulang Tikus Putih Betina RA (Rheumatoid Arthritis) yang Diinduksi oleh Complete Freund's Adjuvant

Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains 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. Katrin, MS (.....)

Penguji I : Dra. Azizahwati, M.S., Apt. (.....)

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

Penguji III : Drs. Umar Mansur, M.Sc. (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 25 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Segala puji, keagungan, dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat, kasih sayang, dan karuniaNya 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, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam 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, sulit rasanya penulis sampai pada tahap penyelesaian skripsi ini. Oleh karena itu, penulis ingin sekali mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Dr. Anton Bahtiar, M.Biomed, Apt. dan Ibu Dr. Katrin, MS, selaku pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktunya untuk memberikan arahan, bimbingan, nasehat, dan saran dalam melaksanakan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S, selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk melaksanakan penelitian ini.
3. Ibu 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. Bapak Dr. Iskandarsyah, MS, selaku pembimbing akademik yang telah memberikan saran dan ijin untuk dapat melaksanakan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
5. Ibu Dr. Dra. Berna Elya, Apt., M.S., selaku koordinator pendidikan S1 Reguler Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan ijin, kesempatan dan nasehat untuk menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

6. Bapak dan Ibu staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
7. P.T Kimia Farma atas pemberian natrium diklofenak untuk penelitian ini.
8. Ayah dan Ibu, yang telah memberikan doa, arahan, motivasi, nasihat dan dukungan penuh selama masa perkuliahan, penelitian, penyusunan skripsi, dan seluruh keluarga besar untuk kasih sayang, kesabaran, dukungan, dan doa yang tiada hentinya.
9. Teman-teman Farmasi UI 2007 yang telah membantu dan menemani dari masa perkuliahan sampai penelitian, dan teman-teman selain di Farmasi, terima kasih atas dukungan dan kasih sayang yang sudah diberikan.

Akhirnya hanya doa dan harapan yang bisa penulis panjatkan kepada Allah SWT untuk membalas segala kebaikan pihak-pihak yang telah membantu penyelesaian skripsi ini. Meskipun 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 : Nurul Fitriyah
NPM : 0706264910
Program Studi : Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

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% Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* Rosc. Var. Rubrum) terhadap Peningkatan Kepadatan Tulang Tikus Putih Betina RA (Rheumatoid Arthritis) yang Diinduksi oleh Complete Freund's Adjuvant

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 : Januari 2012
Yang menyatakan



(Nurul Fitriyah)

vii

ABSTRAK

Nama : Nurul Fitriyah
Program Studi : Farmasi
Judul : Efek Ekstrak Etanol 70% Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* Rosc. Var. Rubrum) terhadap Peningkatan Kepadatan Tulang Tikus Putih Betina RA (Rheumatoid Arthritis) yang Diinduksi oleh Complete Freund's Adjuvant

Jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc. Var. Rubrum) dapat digunakan untuk mengurangi gejala inflamasi baik akut maupun kronik, terutama untuk penyakit inflamasi kronik pada artritis reumatoid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antiarthritis ekstrak etanol 70% rimpang jahe merah ditinjau dari penurunan volume udem telapak kaki tikus yang diinduksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) menggunakan pletismometer dan pengaruhnya terhadap peningkatan kepadatan tulang tikus ditinjau dari kadar kalsium tulang kaki tikus dengan spektrofotometri serapan atom. Penelitian ini menggunakan modifikasi metode *adjuvant-induced arthritis*, dilakukan pada 36 tikus putih betina galur *Sprague Dawley*, dibagi menjadi 6 kelompok. Kelompok I sebagai kontrol normal, kelompok II sebagai kontrol negatif, keduanya diberikan CMC 0,5%, kelompok III, IV, dan V diberikan ekstrak jahe merah dosis bervariasi, berturut-turut, 14; 28; dan 56 mg/200 g bb tikus disuspensikan dalam CMC 0,5%, dan kelompok VI sebagai kontrol positif diberikan suspensi natrium diklofenak dalam CMC 0,5%. Keenam kelompok diinduksi 0,1 ml *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) pada hari ke-1 kecuali kontrol normal hanya diinduksi larutan salin pada telapak kaki kiri. Bahan uji diberikan satu kali sehari secara oral pada hari ke-2 sampai 21. Pengukuran volume telapak kaki dilakukan pada hari ke-7, 14, dan 21 setelah induksi, dan pengukuran kadar kalsium dilakukan pada akhir perlakuan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dosis 56 mg/200 g bb tikus ekstrak jahe merah memiliki persentase penghambatan udem terbesar, setara dengan natrium diklofenak dosis 1 mg/200 g bb tikus, dan ketiga dosis ekstrak jahe merah memiliki efek dalam meningkatkan kadar kalsium tulang setara dengan natrium diklofenak dosis 1 mg/200 g bb tikus dan kontrol normal.

Kata kunci : antiarthritis, *Complete Freund's Adjuvant* (CFA), inflamasi, jahe merah, natrium diklofenak, kepadatan tulang, kadar kalsium, *Zingiber officinale* Rosc Var. Rubrum.
xiv+77 halaman : 12 gambar; 14 tabel; 12 lampiran
Daftar Pustaka : 47 (1987-2011)

ABSTRACT

Name : Nurul Fitriyah
Program Study : Pharmacy
Title : The Effect of 70% Ethanol Extract of Red Ginger Rhizome (*Zingiber officinale* Rosc. Var. Rubrum) in increasing Bone Density in RA (Rheumatoid Arthritis) Female Rats Induced by Complete Freund's Adjuvant

Red ginger (*Zingiber officinale* Rosc. Var. Rubrum) can be used to decrease the symptom of acute and chronic inflammation, especially in inflammatory disease in rheumatoid arthritis. The aim of this study was to determine antiarthritis effect of 70% ethanol extract of red ginger rhizome by evaluating from the decrease paw edema volume of rats *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) induced used plethysmometer and its influence in increasing bone density by evaluating from bone calcium content in rats by Atomic Absorption Spectrophotometry. This study used *adjuvant-induced arthritis* method that had modified at 36 *Sprague Dawley* female rats which had been divided into 6 groups. Group I as a normal control, group II as a negative control, both had been given with CMC 0.5%, group III, IV, and V had been given with the increasing dose of red ginger, 14; 28; dan 56 mg/200 g bb rats respectively, were suspended in CMC 0,5%, group VI as a positive control had been given with suspension of diclofenac sodium in CMC 0,5%. All group was induced by *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) 0,1 ml on day 1 except normal control only saline solution induced. Each of them orally administered once daily from day 2 to day 21. The paw volume was measured on day 7, 14, and 21 after injection, and bone calcium content measured on day 21 after adjuvant injection. The results showed that ethanol extract of red ginger rhizome (56 mg/200 g BW) have the largest percentage inhibition of paw edema and this effect was comparable to positive control (diclofenac sodium 1 mg/200 g BW), and all of extract dose of red ginger had effect in enhancing of bone calcium content and this effect was comparable to positive control (diclofenac sodium 1 mg/200 g BW) and normal control.

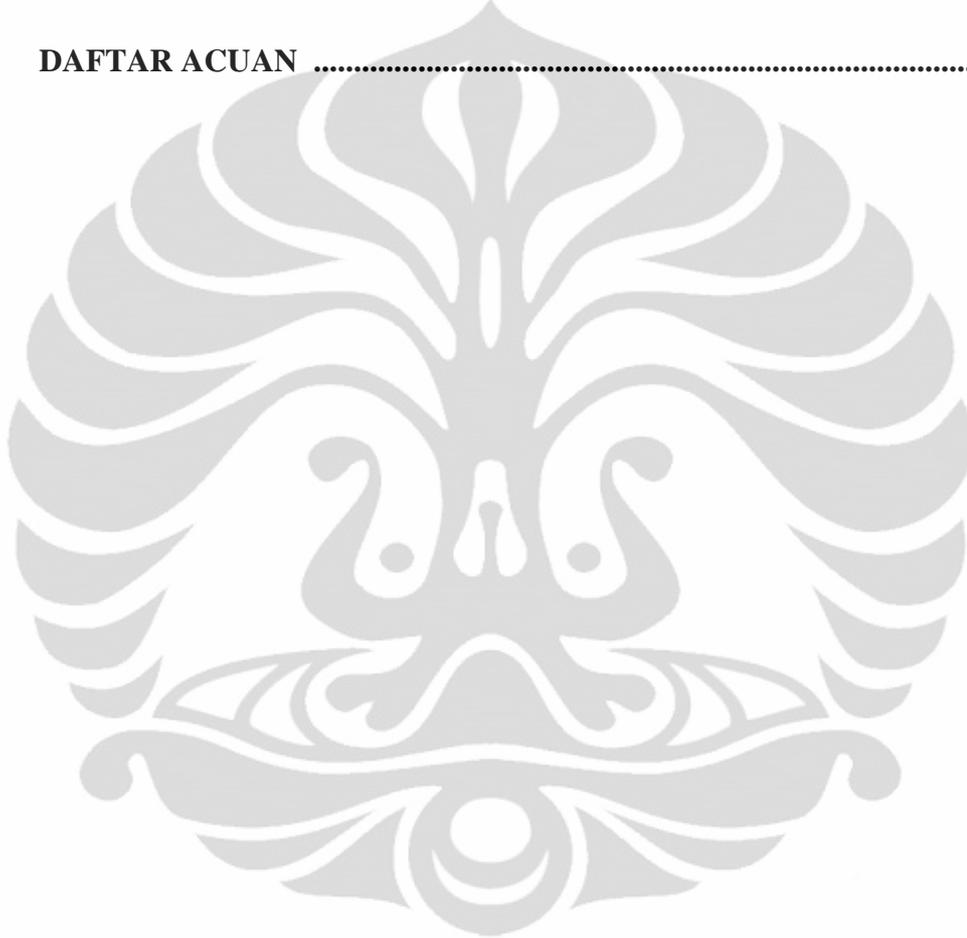
Key word : antiarthritis, *Complete Freund's Adjuvant*, inflammation, red ginger, diclofenac sodium, bone density, calcium content, *Zingiber officinale* Rosc. Var. Rubrum,
xiv + 77 pages ; 12 pictures ; 14 tables; 12 appendix
Bibliography : 46 (1987 - 2011)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
1.3 Hipotesis	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Jahe Merah (<i>Zingiber officinale</i> Rosc. Var. Rubrum).....	4
2.1.1 Klasifikasi	4
2.1.2 Nama Daerah dan Nama Asing	4
2.1.3 Deskripsi Tanaman	4
2.1.4 Kandungan Kimia	5
2.1.5 Kegunaan Tanaman	5
2.2 Inflamasi	6
2.3 Arthritis Reumatoid	7
2.4 Pengobatan Arthritis Reumatoid	10
2.4.1 Obat Antiinflamasi Nonsteroid (AINS)	10
2.4.2 Kortikosteroid	11
2.4.3 DMARD (<i>Disease modifying antirheumatoid drugs</i>)	12
2.5 Metode Uji Antiartritis	12
2.5.1 <i>Adjuvant-induced arthritis</i>	12
2.5.2 <i>Antigen arthritis</i>	12
2.5.3 <i>Collagen-induced arthritis</i>	13
2.5.4 <i>Carragenan-induced arthritis</i>	13
2.5.5 <i>Formaldehyde induced arthritis</i>	13
2.5.6 <i>MRL/I arthritis</i>	13
2.5.7 <i>Streptococcal cell wall-induced arthritis</i>	14
2.6 <i>Complete freund's adjuvant</i> (CFA)	14
2.7 Metode Ekstraksi	15

2.7.1	Cara Dingin	15
2.7.2	Cara Panas	16
2.8	Parameter dan Metode untuk Menentukan Kepadatan Tulang.....	17
2.9	Penetapan Kadar Kalsium denganSpektrofotometri Serapan Atom	18
BAB 3. METODE PENELITIAN		19
3.1	Tempat dan Waktu	19
3.2	Alat	19
3.3	Bahan	19
3.3.1	Bahan Uji.....	19
3.3.2	Bahan Kimia.....	19
3.3.3	Hewan Uji.....	20
3.4	Cara Kerja	20
3.4.1	Pengumpulan, Penyiapan, dan Pembuatan Serbuk Simplicia.....	20
3.4.2	Pembuatan Ekstrak Etanol 70% Rimpang Jahe Merah	20
3.4.3	Penetapan Rendeman, Susut Pengeringan, Kadar Abu Total, dan Kadar Abu yang tidak Larut dalam Asam	21
3.4.4	Penentuan Dosis Bahan Uji	22
3.4.5	Penyiapan Bahan Uji	22
3.4.6	Pemeliharaan Hewan Coba.....	22
3.4.7	Pembuatan Larutan CMC 0,5%	22
3.4.8	Pembuatan Suspensi Natrium Diklofenak.....	23
3.4.9	Isolasi Tulang Kaki Tikus	23
3.4.10	Destruksi Sampel Tulang untuk Penetapan Kadar Kalsium.....	23
3.4.11	Penyiapan Larutan Standar Kalsium	24
3.5	Metode	24
3.5.1	Rancangan Penelitian	24
3.5.2	Prinsip Metode.....	24
3.5.3	Prosedur Uji Antiartritis	26
3.5.4	Penetapan Kadar Kalsium Tulang Kaki Tikus	27
3.5.5	Pengolahan Data	27
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN		29
4.1	Tinjauan Umum.....	29
4.2	Penyiapan Serbuk Simplicia.....	30
4.3	Penyiapan Ekstrak Etanol.....	30
4.4	Penetapan Rendeman, Susut Pengeringan, Kadar Abu Total, dan Kadar Abu yang tidak Larut dalam Asam	31
4.5	Uji Efek Antiartritis.....	32
4.6	Penyiapan Sampel Tulang	38

4.7	Pembuatan Kurva Kalibrasi.....	40
4.8	Perbandingan Kadar Kalsium Kelompok Perlakuan.....	41
4.9	Hubungan antara Antiinflamasi kronik-antiartritis dengan Peningkatan Kepadatan Tulang	44
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN		47
5.1	Kesimpulan	47
5.2	Saran	47
DAFTAR ACUAN		48



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1.1 Penampakan Tulang dengan Micro-CT yang Menunjukkan <i>L-Ser analog #290</i> Mengurangi Kerusakan Tulang pada Tikus RA	53
Gambar 2.1 Proses Terjadinya Aktifasi Osteoklas.....	9
Gambar 2.2 Lokasi Kerusakan Sendi karena Aktifitas Osteoklas.....	10
Gambar 3.1 Rimpang Jahe Merah.....	53
Gambar 3.3 Bagian Tulang yang Diisolasi	53
Gambar 3.3 Pletismometer dan Cara Pengukuran Volume Kaki Tikus.....	54
Gambar 3.4 Spektrofotometer Serapan Atom (Shimadzu AA 6300).....	54
Gambar 4.1 Ekstrak Etanol Jahe Merah	31
Gambar 4.2 Grafik Volume Rata-rata Telapak Kaki Tikus pada Hari ke-1 sampai 21 setelah Diinduksi 0,1 ml <i>complete freund's adjuvant</i> (CFA) pada Semua Kelompok Perlakuan kecuali Kontrol Normal	35
Gambar 4.3 Grafik Persentase Penghambatan Udem pada Hari ke-7, 14, dan 21 setelah Diinduksi 0,1 ml <i>complete freund's adjuvant</i> (CFA) pada Semua Kelompok Perlakuan kecuali Kontrol Normal.....	35
Gambar 4.4 Kurva Kalibrasi Larutan Standar Kalsium	41
Gambar 4.5 Penampakan Telapak Kaki Tikus Dilihat dari Permukaan Telapak Kaki dan Sisi Mendatar Kaki pada Hari ke-21.....	45

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 3.1 Kelompok Perlakuan Uji Antiartritis dengan Metode <i>adjuvant-induced arthritis</i>	25
Tabel 4.1 Hasil penetapan rendemen, susut pengeringan, kadar abu total dan dan kadar abu tidak larut dalam asam	31
Tabel 4.2 Volume Rata-rata Telapak Kaki Tikus pada Hari ke-1 Sampai 21 setelah Diinduksi 0,1 ml <i>complete freund's adjuvant</i> (CFA) pada Semua Kelompok Perlakuan Kecuali Kontrol Normal	33
Tabel 4.3 Persentase Penghambatan Udem Rata-rata pada Hari ke-7, 14, dan 21 setelah Diinduksi 0,1 ml <i>complete freund's adjuvant</i> (CFA) pada Semua Kelompok Perlakuan kecuali Kontrol Normal.....	34
Tabel 4.4 Data Kurva Kalibrasi Larutan Standar Kalsium	40
Tabel 4.5 Kadar Kalsium Masing-masing Kelompok Diukur dengan Spektrofotometri Serapan Atom pada Akhir Perlakuan.....	42
Tabel 4.6 Perbandingan Kadar Kalsium dan Volume Telapak Kaki Rata-rata pada Hari ke-21 Semua Kelompok Perlakuan	46
Tabel 4.7 Penetapan Susut Pengeringan Ekstrak Etanol 70% Jahe Merah.	55
Tabel 4.8 Penetapan Kadar Abu Total Ekstrak Etanol 70% Jahe Merah....	55
Tabel 4.9 Penetapan Kadar Abu tidak Larut dalam Asam Ekstrak Etanol Jahe Merah	55
Tabel 4.10 Volume Telapak Kaki Tikus pada Hari ke-1 sampai 21 setelah diinduksi 0,1 ml <i>complete freund's adjuvant</i> (CFA) pada Semua Kelompok Perlakuan Kecuali Kontrol Normal	56
Tabel 4.11 Perbandingan Ada Tidaknya Perbedaan Bermakna Antar Kelompok Perlakuan Berdasarkan Hasil uji BNT (Beda Nyata Terkecil)	57
Tabel 4.12 Bobot Kering Tulang yang Ditimbang setelah Pengeringan untuk Masing-masing Kelompok pada Akhir Perlakuan (mg) ...	58
Tabel 4.13 Absorbansi yang Dihasilkan pada Pengukuran Kadar Kalsium dengan Spektrofotometri Serapan Atom pada Panjang Gelombang 422,7 nm (A).....	58

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Penentuan Dosis dan Pembuatan Bahan Uji	59
Lampiran 2. Penentuan % Penghambatan Volume udem Rata-rata dan Kadar Kalsium Tulang Kaki Tikus.....	61
Lampiran 3. Uji Statistik Volume Telapak Kaki Tikus Seluruh Kelompok Uji pada Hari ke-1	63
Lampiran 4. Uji Statistik Volume Telapak Kaki Tikus Seluruh Kelompok Uji pada Hari ke-7	65
Lampiran 5. Uji Statistik Volume Telapak Kaki Tikus Seluruh Kelompok Uji pada jam ke-14	66
Lampiran 6. Uji Statistik Volume Telapak Kaki Tikus Seluruh Kelompok Uji pada Hari ke-21	73
Lampiran 7. Uji Statistik Kadar Kalsium Tulang Kaki Tikus Seluruh Kelompok Uji Pada Akhir Perlakuan.....	74
Lampiran 8. Sertifikat Analisis Natrium Diklofenak dari PT. Kimia Farma.....	81
Lampiran 9. Sertifikat Analisis <i>Complete Freund's Adjuvant</i> (CFA) dari Sigma-Aldrich	82
Lampiran 10. Sertifikat Analisis Tanaman Jahe Merah dari LIPI Cibinong	83
Lampiran 11. Sertifikat Hewan Uji.....	84
Lampiran 12. Skema Kerja Pelaksanaan Uji Antiartritis dan Penetapan Kadar Kalsium.....	85

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit pada sendi dikenal di Indonesia sebagai penyakit rematik. Ada lebih dari 100 jenis penyakit rematik, namun yang umumnya diderita masyarakat saat ini adalah artritis reumatoid dan osteoartritis. Perhatian dari masyarakat terhadap penyakit ini besar karena hampir diderita oleh sebagian besar mereka yang berusia 30 tahun ke atas dan tergolong sebagai penyakit geriatrik dengan prevalensi tinggi. Artritis reumatoid lebih banyak diderita oleh kaum muda usia 30 sampai 50 tahun meskipun tidak semua kasus demikian. Sementara osteoartritis umumnya terjadi pada usia 50 tahun ke atas (Isbagio, 1995).

Artritis reumatoid merupakan penyakit inflamasi sistemik kronik yang bisa menyerang seluruh persendian dengan gejala nyeri, bengkak pada jari-jari, lutut, dan pergelangan (Mulyaningsih & Darmawan, 2006). Artritis reumatoid bersifat lebih progresif dan cepat dalam menyebabkan deformitas sendi dari pada osteoartritis. Artritis reumatoid menyebabkan kebutuhan energi meningkat akibat peningkatan katabolisme karena sistem kekebalan tubuh terganggu, sehingga menyebabkan penurunan berat badan dan daya kerja tubuh penderita (Isbagio, 1995; Mulyaningsih & Darmawan, 2006).

Penyakit artritis reumatoid terjadi karena faktor inflamasi kronik yang terbentuk, menyebabkan aktivitas osteoklas meningkat. Osteoklas adalah sel yang bekerja di permukaan tulang sendi yang menyebabkan tulang mengalami resorpsi atau penyerapan tulang, sementara osteoblas adalah sel yang berfungsi membentuk matriks tulang baru. Pada kasus artritis reumatoid, osteoklas yang meningkat tidak diimbangi dengan pengaktifan osteoblas, sehingga proses destruksi tulang lebih cepat dari pada konstruksinya, menyebabkan terjadinya gangguan sendi dan berkurangnya kandungan penyusun tulang (Herman, Kronke, & Schett, 2008; Noguchi, Kimoto, Sasamata, & Miyata, 2008).

Pengobatan untuk penderita artritis reumatoid saat ini sudah banyak dikembangkan baik sintetis maupun herbal. Penggunaan obat herbal dikategorikan tinggi apalagi masyarakat semakin tahu bahwa obat sintetis menimbulkan efek samping lain yang tidak diinginkan. Obat-obat sintetis untuk

Universitas Indonesia

arthritis reumatoid yang saat ini digunakan seperti obat golongan DMARD (*Disease Modifying Anti Rheumatic Drugs*) yaitu metotreksat, leflunomida, sulfasalazin, dan azatriopin memiliki efek samping antara lain mual, ulkus saluran cerna, gangguan fungsi ginjal, dan menurunkan daya tahan tubuh (Wilmana, PF & Gan, Sulistia, 2007). Obat-obat tersebut memiliki sifat antiradang yang sangat kuat dan penggunaan umumnya dikombinasi dengan obat golongan antiinflamasi nonsteroid untuk memperkuat efeknya namun efek samping yang ditimbulkan juga semakin berbahaya. Untuk itu, pemakaian obat herbal untuk mengurangi atau mencegah penyakit arthritis reumatoid kini banyak dikonsumsi masyarakat terutama orang tua karena efek samping yang lebih ringan (Lusia, 2006 ; Mulyaningsih & Darmawan, 2006).

Telah dilakukan penelitian bahwa penggunaan obat sintetis penghambat siklooksigenase dapat meningkatkan kepadatan tulang tikus, terutama obat yang bekerja di siklooksigenase 2 lebih efektif dari pada siklooksigenase 1 dalam menghambat kerusakan tulang akibat RA (*Rheumatoid Arthritis*). (Noguchi, Kimoto, Sasamata, & Miyata, 2008). Penelitian lain menyebutkan, *L-Ser analog #290*, sebuah analog serin, yang berfungsi menghambat pembentukan osteoklas, dapat mengurangi reaksi inflamasi dan mencegah kerusakan tulang pada tikus RA (*Rheumatoid Arthritis*) dan OA (*Osteoarthritis*) (Gambar 1.1) (Bahtiar, Nakamura, Kishida, Katsura, & Nitta, 2011).

Peningkatan aktivitas inflamasi kronik akan meningkatkan degradasi tulang akibat stimulasi osteoklas sehingga kepadatan tulang menurun. Jika proses inflamasi dihambat maka reseptor pengaktif osteoklas akan berhenti dan proses degradasi tidak terjadi sehingga kepadatan tulang meningkat atau kembali normal (Herman, Kronke, & Schett, 2008). Untuk itu, obat-obat antiinflamasi baik sintetis atau herbal akan memiliki efek pada peningkatan kepadatan tulang karena mekanismenya dalam menghambat proses inflamasi.

Penggunaan obat herbal yang memiliki efek antiinflamasi diharapkan dapat mencegah dan mengobati terjadinya penyakit arthritis reumatoid. Deformitas sendi akibat arthritis reumatoid tentu berakibat pada berkurangnya komponen penyusun tulang atau kepadatan tulang. Untuk mencegah atau mengatasi kerusakan tulang tersebut, pemilihan obat herbal antiinflamasi yang tepat perlu

dilakukan. Salah satu contoh tanaman yang sudah teruji secara empiris maupun ilmiah memiliki efek antiinflamasi adalah jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc. Var. Rubrum).

Ekstrak etanol jahe merah terbukti memiliki efek pada pengobatan inflamasi baik akut maupun kronik. Kitagatha-cho, 2007, menyebutkan dosis 10 mg/kg yang diberikan pada tikus, terbukti memiliki efek antiarthritis yang diukur berdasarkan volume udem dan pengurangan destruksi tulang dilihat dari penampakan *X-Ray* serta dari gambaran histologis jaringan tulang secara mikroskopi. Penelitian lain menyebutkan pemberian ekstrak etanol 70% jahe merah dapat mengatasi gejala inflamasi akut pada tikus yang diinduksi karagenan (Retno, 2011).

Pada penelitian ini akan diteliti efek ekstrak etanol 70% rimpang jahe merah sebagai antiinflamasi yang berpengaruh terhadap peningkatan kepadatan tulang tikus putih betina RA (*Rheumatoid Arthritis*) yang diinduksi *complete freund's adjuvant* (CFA). Pengamatan dilakukan berdasarkan penghambatan terhadap volume udem untuk uji antiarthritis dan pengukuran kadar kalsium tulang kaki tikus untuk uji peningkatan kepadatan tulang. Penelitian ini diharapkan dapat menunjukkan adanya korelasi antara penggunaan antiinflamasi dengan peningkatan kepadatan tulang sehingga dapat dimanfaatkan untuk pencegahan dan pengobatan penyakit arthritis reumatoid.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak etanol 70% rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc. Var. Rubrum) terhadap peningkatan kepadatan tulang tikus putih betina RA (*Rheumatoid Arthritis*) yang diinduksi oleh *complete freund's adjuvant* (CFA).

1.3 Hipotesis

Ekstrak etanol 70% rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc. Var. Rubrum) meningkatkan kepadatan tulang yang berkorelasi dengan efek antiinflamasinya pada tikus putih betina RA (*Rheumatoid Arthritis*).

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jahe Merah (*Zingiber officinale* Rosc. Var. *Rubrum*)

2.1.1 Klasifikasi Tanaman (Tjitrosoepomo, 1991)

Dunia	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledonae
Bangsa	: Zingiberales
Suku	: Zingiberaceae
Marga	: Zingiber
Jenis	: <i>Zingiber officinale</i> Rosc. Var. <i>Rubrum</i> (<i>Monografi ekstrak</i> , 2004)

2.1.2 Nama Lain

Tanaman jahe memiliki beberapa sebutan, antara lain gember (Aceh), halia (Gayo), goraka (Manado), halia, sipadas (Minangkabau), lai (Sunda), jahe (Jawa), jae (Madura), lia tana', lia (Gorontalo), gihoro, gisoro (Ternate). (Heyne, 1987). Di luar negeri dikenal dengan nama ginger, red ginger (Inggris), sunthi (Kanada), Adrak, sunthi (Hindi) Djahe (Belanda). (Khare, 2007 ; Ross, 1999).

2.1.3 Deskripsi Tanaman

Jahe merah adalah tumbuhan tahunan dengan tinggi 50-100 cm. Tumbuhan ini memiliki rimpang tebal berwarna coklat kemerahan. Daunnya sempit berbentuk lanset dengan panjang 5-25 cm dan lebar 8-20 mm. Ujung daunnya runcing, pangkal tumpul dan bertepi rata. Berbunga majemuk dengan bentuk bulat telur, muncul dari rimpang, dengan panjang tangkai 10-25 cm dan terdapat daun kecil pada dasar bunga. Mahkota bunga bentuk corong, panjang 2-2,5 cm, berwarna ungu tua dengan bercak krem-kuning. Kelopak bunga kecil, berbentuk tabung dan bergerigi tiga. (Ross, 1999).

Jahe merah merupakan salah satu dari tiga jenis keanekaragaman *Zingiber officinale* Rosc., jenis lainnya adalah jahe putih besar dan jahe putih kecil. Jahe

putih besar rimpangnya lebih besar dan ruas rimpangnya lebih menggembung dari kedua jenis jahe lainnya. Jahe putih kecil ruasnya kecil agak rata dan sedikit menggembung, sementara jahe merah rimpangnya berwarna merah dan lebih kecil dari jahe putih kecil (Depkes RI, 1978).

2.1.4 Kandungan Kimia

Jahe merah mengandung minyak atsiri (1-3%), oleoresin, dan protease. Oleoresin jahe merah mengandung banyak zat aktif dan sebagian besar memberikan efek rasa pedas, yaitu gingerol, shogaol, eugenol, asam miristat, paradol, zingiberen dan zingeron (*Monografi ekstrak*, 2004; Singh, Kapoor, Singh, P., Heluani, Lampasona, & Catalan, 2008). Minyak atsirinya terdiri dari monoterpen seperti geranial (citral a) dan neral (citral b) dan sesquiterpen seperti bisabolone, zingiberen dan sesquithujen. Gingerol, shogaol, dan paradol merupakan senyawa identitas dalam jahe merah yang dikenal memiliki berbagai macam aktivitas biologis termasuk sebagai antinflamasi. Shogaol dan zingeron banyak terdapat pada jahe merah yang sudah menjadi serbuk, sebaliknya jumlahnya sedikit pada jahe merah yang masih segar. Gingerol memiliki gugus fenol yang bersifat termolabil, sehingga bila terkena panas dan udara maka akan berubah menjadi shogaol dan zingeron. Shogaol bisa berubah menjadi paradol. (Singh, A., Kapoor, Singh, P., Heluani, Lampasona, & Catalan, 2008; *Standard of ASEAN*, 1993).

2.1.5 Kegunaan

Jahe merah memiliki banyak kegunaan. Penelitian untuk menguji aktivitas farmakologi maupun untuk mengisolasi komponen aktif sudah banyak dilakukan dan semakin berkembang. Pada pengobatan tradisional China dan India, jahe merah digunakan untuk mengatasi penyakit batuk, diare, mual, asma, gangguan pernapasan, sakit gigi, dan artritis reumatoid, *dyspepsia*, dan *morning sickness*. Beberapa efek farmakologi yang sudah diuji baik pada hewan coba maupun secara *in vitro* adalah antioksidan, antiemetik, antikanker, antiinflamasi akut maupun kronik, antipiretik, dan analgesik (Joanne, Anderson, Phillipson, 2007 ; Ross, 1999).

2.2 Inflamasi

Inflamasi adalah respon pertahanan tubuh terhadap invasi benda asing, kerusakan jaringan, atau keduanya. Penyebab inflamasi antara lain substansi yang bersifat antigenik berupa mikroorganisme, trauma mekanis, zat-zat kimia, dan pengaruh fisika. Respon inflamasi bertujuan menarik protein plasma dan fagosit ke tempat yang mengalami cedera atau terinfeksi agar keduanya dapat mengisolasi, menghancurkan, atau menginaktivkan agen yang masuk; membersihkan debris dan mempersiapkan jaringan untuk proses penyembuhan. Gejala respon inflamasi meliputi, *rubor* (kemerahan), *kalor* (panas), *dolor* (nyeri), dan *turgor* (pembengkakan). Respon inflamasi dapat bersifat akut maupun kronik. Inflamasi akut terjadi segera setelah terjadi cedera, sedangkan inflamasi kronik merupakan inflamasi yang berlangsung lebih dari dua minggu dan dapat timbul setelah inflamasi akut, misalnya karena infeksi yang tidak sembuh (Corwin, 2008).

Inflamasi dimulai saat sel mast berdegranulasi dan melepaskan bahan-bahan kimianya seperti histamin, serotonin dan bahan kimia lainnya. Histamin yang merupakan mediator kimia utama inflamasi juga dilepaskan oleh basofil dan trombosit. Akibat pelepasan histamin ini adalah vasodilatasi pembuluh darah sehingga terjadi peningkatan aliran darah dan terjadinya peningkatan permeabilitas kapiler pada awal inflamasi (Corwin, 2008).

Respon inflamasi dimulai segera setelah jaringan mengalami cedera. Arteriol di daerah tersebut berdilatasi, aliran darah meningkat ke tempat cedera, sehingga timbul gejala *rubor* (kemerahan) dan *kalor* (panas). Vasodilatasi terjadi karena pelepasan bahan kimia dari degranulasi sel mast dan pelepasan mediator-mediator kimia lain selama inflamasi. Dilatasi lokal tersebut menyebabkan meningkatnya tekanan cairan di dalam kapiler darah sehingga meningkatkan perpindahan filtrat plasma ke ruang interstisium. Hal ini menyebabkan pembengkakan dan edema ruang interstisium (Corwin, 2000).

Pada waktu yang bersamaan, histamin dan mediator kimia yang dibebaskan selama inflamasi seperti serotonin, bradikinin, prostaglandin, dan leuokotrin menyebabkan membesarnya pori-pori kapiler (ruang antar sel endotel), sehingga permeabilitas kapiler meningkat. Protein plasma yang dalam keadaan normal tidak dapat keluar dari pembuluh darah dapat lolos ke ruang interstisium.

Peningkatan tekanan osmotik koloid di ruang interstisium yang disebabkan oleh kebocoran protein plasma dan peningkatan tekanan darah kapiler akibat peningkatan aliran darah lokal dapat menimbulkan udem lokal yang disebut juga *turgor* (pembengkakan) dan *eritema* (kemerahan) (Corwin, 2000).

Saat membran sel mengalami kerusakan, fosfolipid akan diubah menjadi asam arakidonat dikatalisis oleh fosfolipase A₂. Asam arakidonat ini selanjutnya akan dimetabolisme oleh lipooksigenase dan siklooksigenase (COX). Pada jalur siklooksigenase inilah prostaglandin disintesis. Prostaglandin dapat meningkatkan aliran darah ke tempat yang mengalami inflamasi, meningkatkan permeabilitas kapiler dan merangsang reseptor nyeri. Sintesis prostaglandin ini dapat dihambat oleh golongan obat AINS. Leukotrien merupakan produk akhir dari metabolisme asam arakidonat pada jalur lipooksigenase. Senyawa ini dapat meningkatkan permeabilitas kapiler dan meningkatkan adhesi leukosit pada pembuluh kapiler selama cedera atau infeksi (Corwin, 2008).

Inflamasi kronis melibatkan keluarnya mediator yang tidak menonjol dalam respon akut. Mediator tersebut antara lain : interleukin, *Granulocyte-macrophag colony-stimulating factor*, *tumor necrosis alpha*, interferon, dan *platelet-derived growth factor*. Salah satu dari kondisi patofisiologi yang melibatkan mediator tersebut adalah artritis reumatoid. Individu yang mengidap penyakit ini diawali dengan pembentukan antibodi yang menetap di kapsul sendi, yang disebut faktor reumatoid (FR). FR menimbulkan peradangan kronik dan destruksi jaringan yang menimbulkan gejala sakit pada sendi dan terjadinya kerusakan tulang di sekitar jaringan yang terinduksi FR (Corwin, 2000; Dipiro, Talbert, Gary, Weels, & Posey, 2006).

2.3 Artritis Reumatoid

Penyakit artritis reumatoid adalah penyakit yang disebabkan oleh peradangan kronik dengan mengakibatkan jaringan ikat mengalami degenerasi. Membran sinovium yang melapisi sendi akan mengalami kerusakan awal dan peradangan terus-menerus terjadi sehingga menyebar ke struktur-struktur sendi di sekitarnya, antara lain kapsul fibrosa sendi dan tulang rawan sendi yang mengakibatkan meradangny ligamentum dan tendon (Corwin, 2000).

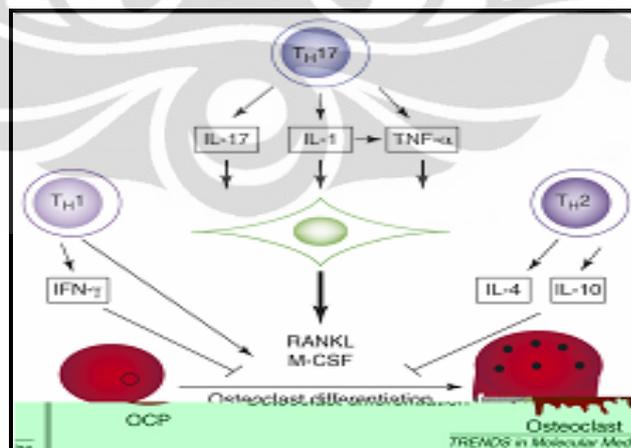
Inflamasi kronik yang menjadi awal terjadinya artritis reumatoid disebabkan oleh reaksi imunologis. Fagositosis kompleks imun oleh sel radang, akan disertai pembentukan dan pembebasan radikal oksigen bebas, leukotrien, prostaglandin, dan protease neutral (kolagenase dan stromelysin) yang menyebabkan erosi rawan sendi dan tulang. Radikal oksigen bebas dapat menyebabkan terjadinya penurunan viskositas cairan sendi dan merusak kolagen serta proteoglikan rawan sendi (Corwin, 2000). Selain itu, prostaglandin E2 (PGE2) yang dihasilkan memiliki sifat vasodilator yang kuat. PGE2 dengan bantuan IL-1 (interleukin-1) dan *tumor necrosis factor alpha* dapat merangsang pengaktifan osteoklas yang meningkatkan destruksi tulang (Noguchi, Kimoto, Sasamata, & Miyata, 2008).

Artritis reumatoid adalah reaksi autoimun tubuh terhadap faktor pencetus atau antigen yang terkadang sulit diketahui asal mulanya. Faktor tersebut antara lain berupa virus, bakteri, dan mikoplasma yang menginfeksi sendi. Respon imun yang terjadi menyebabkan terbentuknya antibodi lain yang berpengaruh terhadap komponen tubuh yang disebut faktor reumatoid. Faktor ini akan menetap di kapsul sendi yang menimbulkan peradangan kronik dan kerusakan sendi (Corwin, 2000).

Berbeda dengan artritis reumatoid (RA), osteoartritis (OA) merupakan penyakit tulang degeneratif yang ditandai dengan hilangnya tulang rawan sendi (artikular) yang akan mengiritasi bagian tulang lainnya sehingga menyebabkan degenerasi sendi. Penyebab osteoartritis tidak diketahui pasti, namun biasanya timbul setelah trauma dan *stress* berulang yang berkaitan dengan deformitas tulang sendi. Pada OA, gejala inflamasi tidak mendominasi perjalanan penyakit, inflamasi akan terjadi jika serpihan rawan sendi masuk ke dalam rongga sendi, dan dibutuhkan waktu bertahun-tahun untuk tercapainya gejala deformitas sendi tersebut. Sementara pada RA, gejala inflamasi menjadi awal timbulnya deformitas sendi akibat terjadi peradangan di membran sinovium. Berbagai komponen destruktif yang dapat merusak sendi dilepaskan ke dalam rongga sendi dengan ditandai penebalan pada bagian membran sinovium. Progresivitas penyakit RA jauh lebih cepat dari pada OA, ditandai dengan deformitas sendi yang dapat terjadi dalam waktu relatif lebih singkat pada RA. Secara patogenesis, kedua

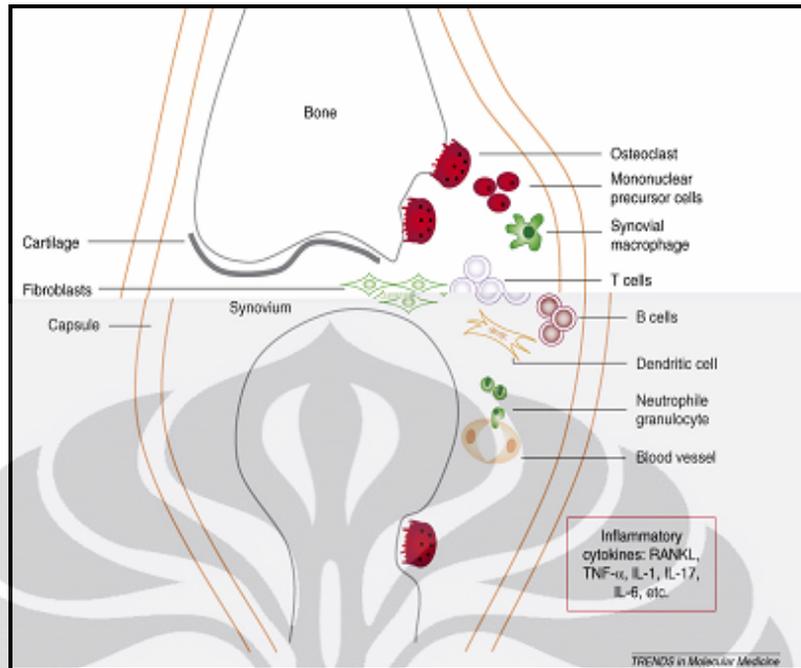
penyakit menunjukkan perbedaan pada kelainan primer yang ditimbulkan, yaitu penyakit OA mempunyai kelainan primer pada rawan sendi, sementara RA pada membran sinovium. Pada stadium awal timbulnya gejala gangguan sendi, kedua penyakit memang sulit dibedakan, sehingga diperlukan pengamatan klinik, laboratorik, dan radiologik yang lebih cermat (Isbagio, 1995).

Dalam satu dekade terakhir, penelitian mengenai mekanisme spesifik terjadinya artritis reumatoid dan hubungannya dengan kerusakan tulang sendi semakin meningkat. Dari beberapa jurnal diketahui bahwa faktor penting terjadinya degenerasi tulang berupa deformitas karena inflamasi kronik adalah terbentuknya sel perusak tulang yang disebut osteoklas. Osteoklas diaktifkan oleh *reseptor activator of nuclear factor κ B-ligand* (RANKL) dan *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF). RANKL dan M-CSF teracetus akibat sinyal dari adanya faktor-faktor inflamasi kronik seperti tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1, IL-17, dan lainnya (gambar 2.1). RANKL dan M-CSF merupakan protein yang menyebabkan osteoklas berdiferensiasi dari yang awalnya *immature* menjadi *mature*. Pengaktifan osteoklas ini lah yang menyebabkan terjadinya destruksi tulang sendi melalui permukaan (gambar 2.2) (Herman, Kronke, & Schett, 2008).



[Sumber : Herman, Kronke, & Schett, 2008]

Gambar 2.1. Proses Terjadinya Aktivasi Osteoklas



[Sumber : Herman, Kronke, & Schett, 2008]

Gambar 2.2. Lokasi Kerusakan Sendi karena Aktivitas Osteoklas

2.4 Pengobatan Arthritis Reumatoid

Ada tiga macam obat yang dapat mengatasi arthritis reumatoid, antara lain:

2.4.1 Obat Antiinflamasi Nonsteroid (AINS)

Obat-obat ini memiliki aktivitas antinflamasi, analgesik, dan antipiretik. Golongan obat ini menghambat siklooksigenase yang menyebabkan terhambatnya sintesis asam arakidonat menjadi prostaglandin, prostasiklin, dan tromboksan, yang berperan dalam menimbulkan reaksi peradangan, namun tidak menghambat biosintesis leukotrien yang diketahui ikut berperan dalam proses inflamasi. Siklooksigenase terdapat dalam dua bentuk, yaitu COX-1 dan COX-2. COX-1 penting dalam pemeliharaan berbagai organ dan jaringan khususnya ginjal, saluran cerna dan trombosit. Jika aktivitas COX-1 dihambat oleh AINS maka akan timbul efek samping pada berbagai organ dan jaringan tersebut. Sedangkan jika aktivitas COX-2 dihambat oleh AINS maka inflamasi akan berkurang (Wilmana, PF & Gan, Sulistia, 2007).

Berdasarkan mekanisme penghambatan siklooksigenase, AINS dikelompokkan menjadi AINS non-selektif dan AINS selektif penghambat COX-2. AINS selektif penghambat COX-2 antara lain selekoksib, rofekoksib, dan

Universitas Indonesia

etorikoksib. Sedangkan AINS non-selektif antara lain aspirin, indometasin, diflunisal, naproksen, natrium diklofenak, dan ketoprofen. Efek samping berdasarkan penghambatan pada prostaglandin yang terjadi pada lambung, usus, ginjal seperti mual, muntah, tuka lambung usus, nyeri lambung, perpanjangan masa pendarahan, dan terganggunya keseimbangan air dan elektrolit. AINS selektif penghambat COX-2 terbukti kurang menyebabkan gangguan saluran cerna dibanding AINS non-selektif tetapi tidak ada yang secara klinis terbukti lebih efektif dari AINS-non selektif (Wilmana, PF & Gan, Sulistia, 2007).

Satu diantara obat golongan AINS yang sering digunakan untuk mengatasi inflamasi dan nyeri adalah natrium diklofenak. Obat ini memiliki aktivitas analgesik dan antipiretik serta memiliki potensi efek antiinflamasi kuat dengan efek samping iritasi terhadap saluran cerna yang lebih rendah jika dibandingkan dengan indometasin, naproxen dan piroxikam. Diklofenak diabsorpsi cepat dan sempurna setelah pemberian peroral. Konsentrasi plasma obat ini tercapai dalam 2-3 jam. Pemberian bersama makanan akan memperlambat laju absorpsi tetapi tidak mengubah jumlah yang diabsorpsi. Bioavailabilitasnya sekitar 50% akibat metabolisme lintas pertama yang cukup besar. Obat ini 99% terikat pada protein plasma dan waktu paruhnya berada pada rentang 1-3 jam. Diklofenak diakumulasi di cairan sinovial setelah pemberian oral. Hal ini menjelaskan bahwa efek terapi di sendi jauh lebih panjang daripada waktu paruhnya (Wilmana, PF & Gan, Sulistia, 2007).

2.4.2 Kortikosteroid

Obat golongan ini diberikan pada pasien artritis reumatoid yang lebih progresif dengan pembengkakan dan nyeri sendi yang lebih parah. Mekanisme kerjanya dengan menghambat fosfolipase A2 yang bertanggung jawab terhadap pembentukan asam arakidonat yang merupakan prekursor berbagai mediator inflamasi. Contoh obat golongan ini adalah : prednison (oral), triamsinolon asetonida, triamsinolon heksasetonida, dan metilprednisolon asetat (intramuskular). Efek samping obat golongan ini perlu diperhatikan karena jika dihentikan mendadak pemberiannya maka akan terjadi insufisiensi adrenal akut seperti demam, mialgia, atralgia, dan malaise. Selain itu reaksi pendarahan juga

bisa terjadi pada pasien tukak peptik, osteoporosis, dan hiperlipidemia (Wilmana, PF & Gan, Sulistia, 2007).

2.4.3 DMARD (*Disease Modifying Antirheumatic Drugs*)

Aktivitas antiinflamasi DMARD sangat kuat. Obat golongan ini memiliki daya antierosif yang dapat menghentikan atau memperlambat kerusakan tulang rawan, namun tidak memiliki aktivitas analgesik sehingga penggunaannya seringkali dikombinasikan dengan obat antiinflamasi nonsteroid. Contoh obat golongan ini adalah metotreksat, leflunomida, sulfasalazin, aziotripin, emas (auranofin), hidrosiklorokuin, dan penisilamin. Efek samping yang ditimbulkan antara lain : mual, muntah, diare, rash, supresi sumsum tulang dan kelainan darah yang berbahaya (Isbagio, 1993; Schwinghammer, 2003). Obat yang sering digunakan pada penyakit artritis reumatoid adalah hidrosiklorokuin, garam emas, penisilamin, dan salazopirin (Isbagio, 1995).

2.5 Metode Uji Antiartritis

Metode untuk uji antiartritis yang dilakukan pada hewan percobaan dapat dilakukan dengan beberapa metode, antara lain :

2.5.1 *Adjuvant-induced arthritis*

Metode yang paling sering digunakan adalah dengan menggunakan *complete freund's adjuvant* (CFA) yang mengandung *Mycobacterium* atau dinding-dinding sel bakteri sebagai zat penginduksinya. Suspensi adjuvant disuntik ke daerah sublantar kaki. Proses inflamasi terjadi pada hari 9-10 setelah penyuntikan dan volume udem yang terbentuk diukur menggunakan alat pletismometer sederhana (Mulyaningsih & Darmawan, 2006; Woode et.al., 2008; Sari, 2010).

2.5.2 *Antigen arthritis*

Methylated bovine serum albumin (m-BSA) dalam *complete freund's adjuvant* digunakan sebagai antigen dalam metode ini. Zat ini dapat diberikan

secara intradermal atau subkutan. Antigen ini kemudian akan menstimulasi terjadinya proses inflamasi akut dan destruksi sendi (Bendele, 2001).

2.5.3 *Collagen-induced arthritis*

Bovine tipe II kolagen dalam *incomplete freund's adjuvant* yang digunakan sebagai antigen diberikan secara intradermal. Onset artritis terjadi pada hari ke-10 sampai 13. Proses artritis berkembang hingga 1 atau 2 bulan dengan tanda-tanda terjadinya destruksi pada sendi dan tulang. Prinsip metode ini adalah adanya reaksi otoimun terhadap kolagen (Utsinger, Zvaifler, & Ehrlich, 1985; Bendele, 2001).

2.5.4 *Carragenan-induced arthritis*

Metode ini merupakan metode sederhana untuk pembentukan inflamasi artritis. Karagenin 1% diinjeksikan pada daerah subplantar telapak kaki tikus sebanyak 0,1 ml. Volume telapak kaki diukur sebelum dan 1,2,3,4,6,10, dan 12 jam setelah penyuntikan karagenin dengan alat petismometer sederhana (Li Wen-Guang, Zhang Xiao Yu, Wu Yong Jie, & Tian Xuan, 2001; & Biradar, Kangralkal, Mandavkar, Thokur, & Chougule, 2010).

2.5.5 *Formaldehyde induced arthritis*

Metode ini cukup sederhana. Secara subkutan sebanyak 0,1 ml formaldehid 2% (v/v) diinjeksikan pada telapak kaki tikus pada hari pertama dan ketiga selama percobaan. Agen antiartritis diberikan secara berturut-turut selama 10 hari. Perubahan volume telapak kaki berupa udem dapat diukur dengan pletismometer (Biradar, Kangralkal, Mandavkar, Thokur, & Chougule, 2010).

2.5.6 *MRL/I arthritis*

Retrovirus murin diinjeksikan ke dalam hewan coba sehingga menghasilkan imunoglobulin G kompleks faktor reumatoid. Proses pembentukan artritis ini berlangsung sekitar 3-4 bulan. Sekitar bulan ke-5 sampai 6, sebanyak 75% dari hewan coba MRL/I memperlihatkan tanda-tanda adanya kerusakan sendi

seperti proliferasi sel synovial, infiltrasi sinovium oleh limfosit dan sel plasma (Utsinger, Zvaifler, & Ehrlich, 1985).

2.5.7 *Streptococcal cell wall-induced arthritis*

Metode ini menghasilkan artritis kronik dengan menginokulasi dinding sel streptococcal secara intraperitoneal. Dalam waktu 2 hari terbentuk tanda-tanda pembentukan artritis akut hewan coba yang kemudian berkembang menjadi artritis kronik. *Radioimmunoassay* dapat digunakan untuk mendeteksi produk di sendi dan jaringan pada tikus artritis yang diinokulasi dengan dinding sel streptococcal (Utsinger, Zvaifler, & Ehrlich, 1985).

2.6 *Complete Freund's Adjuvant (CFA)*

Complete freund's adjuvant (CFA) merupakan zat penginduksi artritis untuk uji antiartritis yang digunakan secara luas sebagai model laboratorium dalam penelitian yang mengarah pada penyakit artritis reumatoid. Zat ini berisi *Mycobacterium tuberculosis* kering yang telah dimatikan atau komponen dari dinding sel nya. Mekanismenya dengan reaksi inflamasi secara imunologis yang melibatkan respon antibody (Guidelines for the research use of adjuvant, 2005; Parmar, N.S. & Prakash, 2006). CFA menghasilkan respon inflamasi lokal dan granuloma kronik pada daerah infeksi karena komponen di dalamnya yang menyebabkan influks dan proliferasi leukosit sehingga terbentuk proses inflamasi (Guidelines for the research use of adjuvant, 2005). Respon inflamasi berupa tanda 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, N.S. & Prakash, 2006).

CFA disuntikan di telapak kaki (sublantar) hewan uji ataupun secara intraperitoneal (ip). Rute pemberian CFA pada telapak kaki dapat menyebabkan artritis kronik dan secara intraperitoneal menyebabkan peritonitis. Pada penyuntikan di telapak kaki, volume injeksi maksimum yang direkomendasikan sebesar 0,01-0,05 ml untuk mencit dan 0,1 ml untuk tikus. Jika diberikan secara ip, volume injeksi maksimum dari emulsi antigen CFA adalah 0,2 ml pada mencit

(Guidelines for the research use of adjuvant, 2005; Parmar, N.S. & Prakash, 2006).

2.7 Metode Ekstraksi

Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tumbuhan memerlukan cara yang khusus dan spesifik untuk menariknya agar diperoleh senyawa yang lebih murni. Cara penarikan senyawa khusus dan spesifik tersebut dinamakan ekstraksi.

Ekstraksi adalah kegiatan menarik kandungan kimia yang dapat larut dalam pelarut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut. Hasil dari ekstraksi adalah terbentuknya sediaan ekstrak yang dapat berupa serbuk kering, kental, dan cair. Pembuatan sediaan ekstrak dimaksudkan agar zat berkhasiat yang terdapat dalam simplisia bisa diperoleh dengan kadar yang tinggi sehingga mempermudah dalam hal penentuan dosis khasiatnya (Anief, 1997). Beberapa metode ekstraksi yang sering digunakan untuk menarik senyawa aktif tersebut antara lain (Depkes RI, 2000) :

2.7.1 Cara Dingin

a. 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.

b. 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.

2.7.2 Cara Panas

a. Refluks

Refluks adalah proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut pada temperature 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.

b. 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.

c. Digesti

Digesti adalah proses maserasi dengan pengadukan kontinyu pada suhu yang lebih tinggi dari suhu ruangan yang pada umumnya dilakukan pada suhu 40-50°C.

d. Infus

Infus adalah proses ekstraksi dengan pelarut air pada suhu air mendidih (96-98°C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

e. Dekok

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

2.8 Parameter dan Metode untuk Menentukan Kepadatan Tulang

Tulang dewasa terdiri dari 30% bahan organik dan 70% endapan garam. Bahan organik terdiri dari serat kolagen dan proteoglikan. Endapan garam yang utama adalah kalsium dan fosfat, dengan sedikit natrium, kalium karbonat, serta ion magnesium. Garam-garam menutupi matriks dan berikatan dengan serat kolagen melalui proteoglikan. Adanya bahan organik membuat tulang memiliki kekuatan terhadap tarikan yang meregang dan adanya garam-garam menyebabkan tulang memiliki kekuatan menahan tekanan (Corwin, 2000).

Parameter kepadatan tulang bisa dilihat dari kandungan komponen-komponen penyusun tulang seperti kalsium (Ca), besi (Fe), Tembaga (Cu), dan Seng (Zn) (Brzoska, Majewska, & Moniuszko-Jakoniuk, 2005; Shuid, Ping, Muhammad, & Muhamed, 2011). Pada tikus yang diovariektomi terjadi penurunan kandungan kalsium akibat defisiensi estrogen. Estrogen mempengaruhi osteoklas yang merupakan sel pembentuk tulang. Osteoklas juga diaktifkan oleh faktor inflamasi kronik atau sekunder. Sehingga pada penurunan kepadatan tulang yang berhubungan dengan respon inflamasi maka parameter yang bisa digunakan adalah kadar kalsiumnya (Shuid, Ping, Muhammad, & Muhamed, 2011).

Metode yang sering dipakai akhir-akhir ini pada beberapa penelitian luar negeri yang meneliti tentang penyakit tulang adalah *Micro-computed tomography* (Micro-CT) dan *dual-energy X-ray absorptiometry* (DXA) (Bahtiar, Nakamura, Kishida, Katsura, & Nitta, 2011; Noguchi, Kimoto, Sasamata, & Miyata, 2008). Sementara penelitian lainnya menyebutkan untuk menentukan kadar kalsium yang terkandung di dalam tulang dapat ditentukan dengan spektrofotometri serapan atom (SSA) (Nurrochmad, Leviana, Wulancarsari, & Lukitaningsih, 2010). Selain SSA, kalsium juga dapat ditetapkan kadarnya dengan menggunakan alat Spektrofotometer Emisi Nyala (SEN), dan secara elektrokimia dengan *Ion Selective Electrode* (ISE).

2.9 Penetapan Kadar Kalsium dengan Spektrofotometri Serapan Atom (SSA)

Spektrofotometri serapan atom merupakan metode yang digunakan untuk menentukan kadar logam dalam suatu sampel. Keuntungan dari metode spektrofotometri serapan atom adalah waktu pengerjaan yang cepat, alatnya yang sensitif, dan sangat spesifik untuk unsur yang akan dianalisis. Spektrofotometri serapan atom dapat menentukan kadar logam dengan konsentrasi yang sangat kecil, yaitu sampai *part permillion* (ppm).

Prinsip umum metode ini adalah berdasarkan penguraian molekul menjadi atom (atomisasi) dengan energi dari api atau arus listrik. Radiasi dari sumber cahaya (*hollow cathode lamp*) yang memiliki energi yang sesuai dengan energi yang dibutuhkan oleh atom-atom dari unsur yang diperiksa untuk melakukan transmisi elektronik, dipancarkan melalui nyala, pada nyala tersebut atom-atom dari zat yang diperiksa akan meresap radiasi tadi sesuai dengan konsentrasi zat tersebut, yaitu sesuai populasi atom-atom pada level energi terendah (*ground state*) (Harmita, 2006).

Metode penetapan kadar kalsium yang umum digunakan untuk sampel dengan kadar sangat rendah adalah Spektrofotometri Serapan Atom. Suatu sampel mula-mula harus dilarutkan terlebih dahulu, proses pelarutan ini dikenal sebagai destruksi. Tujuannya agar unsur logam menjadi ion bebas. Ada dua cara, yaitu destruksi basah dan kering. Destruksi basah yaitu dengan melarutkan sampel dengan asam-asam oksidator, jika perlu dengan sedikit pemanasan. Destruksi basah lebih sering digunakan. Destruksi kering yaitu sampel langsung dipanaskan untuk diabukan (Shuid, Ping, Muhammad, & Muhamed, 2010; Harmita, 2006).

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia Departemen Farmasi FMIPA UI, Laboratorium Farmakologi Departemen Farmasi FMIPA UI, dan Laboratorium Afiliasi Kimia FMIPA UI selama lebih kurang 3 (tiga) bulan yaitu dari bulan Oktober sampai Desember 2011.

3.2 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah pletismometer, jarum suntik 27 G1/2 (Terumo), spuit 1; 5 ml (Terumo), kandang hewan, timbangan hewan, timbangan analitik (Mettler Toledo), alat-alat gelas, shaker, rotary evaporator (Buchi), alkoholmeter, oven (Hotpack), kertas saring *Whatman*, krus silikat (Jangkar), lemari pendingin, tanur (Thermolyne), dan spektrofotometer serapan atom (Shimadzu AA 6300).

3.3 Bahan

3.3.1 Bahan Uji

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc. Var. *Rubrum*) yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (BALITRO) (gambar 3.1).

3.3.2 Bahan Kimia

Pelarut dan bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah : *complete freund's adjuvant* (CFA) yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* (Sigma-Aldrich, USA); natrium klorida 0,9% ; Natrium Diklofenak (Kimia Farma); etanol 70 dan 96%; Karboksimetilselulosa (CMC); asam nitrat pekat 65% (Merck); asam klorida encer P dan asam klorida pekat P (Merck); eter; aquabidest dan aquadest.

3.3.3 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* yang berusia 3 bulan dengan berat badan 180 – 250 gram dari Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pengumpulan, Penyiapan, dan Pembuatan Serbuk Simplisia

Rimpang jahe merah yang telah dikumpulkan, dipilih yang kondisinya baik, dengan usia kira-kira menjelang panen, lebih kurang 10 bulan. Rimpang lalu dibersihkan menggunakan air mengalir sampai bersih lalu ditiriskan. Rimpang yang diperoleh sebanyak 1680 gram, lalu diiris tipis-tipis, setelah itu diangin-anginkan di dalam ruangan terbuka, kemudian dikeringkan di dalam lemari pengering pada suhu 40-50⁰C hingga kering. Rimpang yang telah kering diserbukkan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan mesh 25, kemudian ditimbang.

3.4.2 Pembuatan Ekstrak Etanol 70% Rimpang Jahe Merah

Metode yang digunakan untuk membuat ekstrak etanol jahe merah adalah maserasi. Serbuk kering jahe merah yang diperoleh sebanyak 240 g, dimasukkan ke dalam botol coklat, lalu ditambahkan 1 L etanol 70% (Penna, Medeiros, Aimbire, Faria, Sertie, & Lopes, 2003), dikocok selama 6 jam dengan menggunakan *shaker*, kemudian didiamkan sampai 24 jam (*Monografi ekstrak*, 2004). Ampasnya dipisahkan dengan cara disaring dengan kertas saring. Proses diulangi beberapa kali sampai filtrat menjadi tidak berwarna. Semua filtrat yang diperoleh dicampur dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* bertekanan rendah pada suhu 50⁰C dengan kecepatan putar 30 rpm. Selanjutnya, filtrat pekat diuapkan diatas penangas air pada suhu 50⁰C hingga menjadi ekstrak kental.

3.4.3 Penetapan Rendemen, Susut Pengeringan, Kadar Abu Total, dan Kadar Abu yang tidak Larut dalam Asam

a. Penetapan Rendemen

Masing-masing ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan dibandingkan bobotnya dengan serbuk simplisia awal yang digunakan. Perbandingan tersebut dinyatakan dalam % (persen) (Depkes RI, 2000).

b. Penetapan Susut Pengeringan

Ekstrak ditimbang secara seksama sebanyak 1 gram sampai 2 gram dan dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal bertutup yang telah dipanaskan pada suhu 105°C hingga selama 30 menit dan telah ditara. Ekstrak diratakan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol, hingga merupakan lapisan setebal lebih kurang 5 mm sampai 10 mm. Kemudian dimasukkan ke dalam oven, tutup dibuka dan dikeringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Sebelum setiap pengeringan, botol dibiarkan dalam keadaan tertutup mendingin dalam desikator hingga suhu kamar (Depkes RI, 1995).

c. Penetapan Kadar Abu Total

Lebih kurang 2 gram sampai 3 gram ekstrak dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, lalu diratakan. Kemudian dipijar perlahan-lahan hingga arang habis, didinginkan dan ditimbang. Jika arang tidak dapat dihilangkan, ditambah air panas, dan disaring dengan kertas saring bebas abu. Sisa abu dan kertas saring dipijarkan dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus, diuapkan dan dipijarkan hingga bobot tetap dan ditimbang. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1995).

d. Penetapan Kadar Abu Total yang tidak Larut dalam Asam

Abu yang telah diperoleh pada penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, dan disaring melalui kertas saring bebas abu, dan dipijar hingga bobot tetap, kemudian ditimbang. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1995).

3.4.4 Penentuan Dosis Bahan Uji

Dosis ekstrak jahe merah yang dipakai pada penelitian ini sebagai antiinflamasi berdasarkan penelitian sebelumnya adalah 14 mg/200 g bb; 28 mg/200 g bb dan 56 mg/200 g bb tikus secara oral (Retno, 2011). Dosis natrium diklofenak untuk uji antiartritis adalah 5 mg/kg bb tikus setiap hari secara oral. Perhitungan selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 1.

3.4.5 Penyiapan Bahan Uji

Ekstrak sebanyak 194,4 mg disuspensikan menggunakan CMC (*Carboxymethylcellulose*) 0,5% sebagai bahan pensuspensi. Sebanyak 400 mg serbuk CMC ditaburkan pada lumpang berisi aquadest panas bersuhu 70⁰C dengan volume 10 ml. Kemudian CMC dibiarkan mengembang selama kurang lebih 10 menit. CMC yang telah mengembang tersebut digerus bersama ekstrak, dan ditambahkan perlahan-lahan dengan aquadest 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.

3.4.6 Pemeliharaan Hewan Coba

Aklimatisasi hewan coba selama 2 minggu dengan tujuan mengadaptasikan hewan coba dengan lingkungannya yang baru. Pada tahap ini dilakukan pengamatan terhadap keadaan umum hewan coba, meliputi berat badan dan keadaan fisiknya. Hewan coba yang sakit tidak diikutsertakan dalam pengujian.

3.4.7 Pembuatan Larutan CMC 0,5%

Sebanyak 500 mg CMC ditimbang lalu dikembangkan dengan aquadest hangat (70⁰C) dengan volume lebih kurang 10 ml. Setelah mengembang, CMC digerus dan ditambahkan aquadest sambil dihomogenisasi hingga mencapai volume suspensi 100 ml.

3.4.8 Pembuatan Suspensi Natrium Diklofenak

Ditimbang sebanyak 16,7 mg serbuk Natrium diklofenak kemudian digerus dengan penambahan suspensi CMC 0,5% sampai homogen dan dicukupkan volumenya hingga 50 ml.

3.4.9 Isolasi Tulang Kaki Tikus

Pada akhir perlakuan, semua hewan coba dimatikan untuk diambil tulang sendi kaki kirinya. Pembedahan dilakukan menggunakan alat bedah dengan membersihkan tulang dari jaringan dan lemak yang menempel. Jika sudah bersih sampai bagian sendi atas, maka dipotong mulai dari sendi telapak kaki sampai sendi bagian atas kaki. Bagian tulang yang diisolasi bisa dilihat pada gambar 3.2.

3.4.10 Destruksi Sampel Tulang untuk Penetapan Kadar Kalsium

Tulang yang sudah diisolasi kemudian dikeringkan dalam oven bersuhu 100⁰C selama 24 jam. Setelah kering, lalu ditimbang untuk mendapatkan bobot kering tulang. Kemudian diabukan dalam tanur dengan suhu 700⁰C selama 4 jam. Tulang yang sudah menjadi abu berwarna putih, digerus dalam lumpang sampai halus. Serbuk abu tulang dimasukkan ke dalam erlenmeyer secara hati-hati dengan membersihkan sisa lumpang agar sampel yang didapat tidak banyak berkurang selama preparasi sampel.

Serbuk abu tersebut dilarutkan dalam 3 ml asam nitrat pekat, panaskan 1-2 menit sampai terlarut, lalu tambahkan sedikit demi sedikit aquabidest. Proses pelarutan dilakukan dalam lemari asam. Kemudian pindahkan larutan ke dalam labu takar 50,0 ml dengan disaring terlebih dulu menggunakan kertas saring. Tambahkan sampai batas labu dengan aquabidest, kocok dan homogenkan. Pipet 1 ml dari larutan induk, masukkan ke dalam labu takar 100,0 ml, cukupkan sampai batas labu, didapatkan pengenceran 100 kali. Pipet 5 ml dari larutan kedua, masukkan ke dalam labu takar 50,0 ml, cukupkan sampai batas labu, didapatkan pengenceran 1000 kali dari larutan induk.

3.4.11 Penyiapan Larutan Standar Kalsium

Larutan standar disiapkan oleh Laboratorium Afiliasi Kimia UI. Larutan induk 1000 ppm yang didapat dari baku standar, diencerkan sampai didapat larutan dengan konsentrasi 0,5; 1; 3; dan 5 ppm.

3.5 Metode

3.5.1 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 kelompok perlakuan masing – masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Hal ini berdasarkan hasil perhitungan menggunakan rumus Federer (Jusman, SW & Halim, A, 2009) sebagai 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 $n \geq 4$, sehingga jumlah minimum tikus yang digunakan dalam tiap kelompok adalah 4 ekor.

Penelitian ini dilakukan untuk mengamati efek antiartritis (penghambatan inflamasi kronik) dan penentuan kadar kalsium tulang yang diisolasi dari bagian tulang sendi kaki kiri dengan spektrofotometri serapan atom. Pengujian dilakukan pada tikus putih yang diinjeksi sebanyak 0,1 ml *complete freund's adjuvant* (CFA) secara subplantar pada hari ke-1 (Sari, 2010) dan pada hari ke-2 sampai hari ke-21 diberikan bahan uji sesuai kelompok perlakuan secara oral.

3.5.2 Prinsip Metode

Prinsip metode pada penelitian ini adalah modifikasi metode *adjuvant-induced arthritis* (Mulyaningsih & Darmawan, 2006; Sari, 2010) untuk mengamati efek antiartritis berdasarkan penurunan volume udem pada telapak kaki kiri tikus menggunakan alat pletismometer (Guidelines for the research use of adjuvant, 2005; Parmar, N.S. & Prakash, 2006; Woode et.al., 2008) dan

pengaruhnya pada peningkatan kepadatan tulang yang ditentukan dengan pengukuran kadar kalsium tulang kaki kiri menggunakan alat spektrofotometer serapan atom (Shuid et.al., 2010). Pengamatan volume kaki dilakukan pada hari ke-1 sebelum induksi, hari ke-7, 14, dan 21 setelah induksi CFA. Penentuan kadar kalsium tulang dilakukan pada akhir perlakuan yaitu setelah hari ke-21.

Tabel 3.1 Kelompok Perlakuan Uji Antiartritis Metode *adjuvant-induced arthritis*

No.	n (ekor)	Kelompok	Perlakuan
1.	6	Kontrol Normal	Hari ke-1 disuntik 0,1 ml larutan salin, hari ke-2 sampai ke-21 diberi 3 ml suspensi CMC 0,5%
2.	6	Kontrol Negatif	Hari ke-1 disuntik 0,1 ml CFA, hari ke-2 sampai ke-21 diberi 3 ml suspensi CMC 0,5%
3.	6	Dosis I	Hari ke-1 disuntik 0,1 ml CFA, hari ke-2 sampai ke-21 diberi 3 ml suspensi ekstrak rimpang jahe merah dosis 14 mg/200 g bb dalam CMC 0,5% per oral
4.	6	Dosis II	Hari ke-1 disuntik 0,1 ml CFA, hari ke-2 sampai ke-21 diberi 3 ml suspensi ekstrak rimpang jahe merah dosis dosis 28 mg/200 g bb dalam CMC 0,5% per oral
5.	6	Dosis III	Hari ke-1 disuntik 0,1 ml CFA, hari ke-2 sampai ke-21 diberi 3 ml suspensi ekstrak rimpang jahe merah dosis 56 mg/200 g bb dalam CMC 0,5% per oral
6.	6	Kontrol Positif	Hari ke-1 disuntik 0,1 ml CFA, hari ke-2 sampai ke-21 diberi 3 ml suspensi natrium diklofenak 1 mg/200 g bb dalam CMC 0,5% per oral

3.5.3 Prosedur Uji Antiartritis

Pada penelitian uji antiartritis sebelumnya (Mulyaningsih & Darmawan, 2006; Sari, 2010), hewan coba diinduksi *complete freund's adjuvant* (CFA) pada hari ke-1, dibiarkan sampai dengan hari ke-16, kemudian pada hari ke-17 sampai 31 diberikan bahan uji, dan pengukuran volume telapak kaki dilakukan pada hari ke-1 sebelum induksi, hari ke-17, 20, 23, 26, 29, dan 31 setelah induksi. Pada penelitian ini, dilakukan modifikasi metode tersebut dengan memberikan bahan uji pada hari ke-2 sampai dengan hari ke-21, dan pengukuran volume telapak kaki dilakukan pada hari ke-7, 14, dan 21 setelah induksi.

Pada hari pengujian, tikus ditimbang bobotnya dan dikelompokkan secara acak dengan jumlah enam kelompok tikus terdiri dari enam ekor untuk masing-masing kelompok. Setiap tikus dalam semua kelompok, pada hari ke-1, diukur volume kaki kiri belakang pada bagian yang akan disuntik CFA kecuali kelompok normal yang hanya disuntik larutan salin.

Pertama, kelompok kontrol normal, masing-masing tikus pada hari ke-1 disuntik 0,1 ml larutan salin pada telapak kaki kiri bagian belakang dan pada hari ke-2 sampai hari ke-21 diberi suspensi CMC 0,5% sebanyak 3 ml secara oral.

Kedua, kelompok kontrol negatif, masing-masing tikus pada hari ke-1 disuntik 0,1 ml CFA pada telapak kaki kiri bagian belakang dan pada hari ke-2 sampai hari ke-21 diberi suspensi CMC 0,5% sebanyak 3 ml secara oral.

Ketiga, kelompok bahan uji, yaitu dosis I, II, dan III, masing-masing tikus pada hari ke-1 disuntik 0,1 ml CFA pada telapak kaki kiri bagian belakang dan pada hari ke-2 sampai hari ke-21 diberi suspensi bahan uji dalam CMC 0,5% sebanyak 3 ml secara oral.

Terakhir, kelompok kontrol positif, masing-masing tikus pada hari ke-1 disuntik 0,1 ml CFA pada telapak kaki kiri bagian belakang dan pada hari ke-2 sampai hari ke-21 diberi suspensi natrium diklofenak 2 mg/200 g bb dalam CMC 0,5% sebanyak 3 ml secara oral.

Volume kaki diukur dengan cara mencelupkannya ke dalam alat pletismometer pada hari ke-1 sebelum induksi CFA, hari ke-7, 14, dan 21. Semua data yang diperoleh dianalisis dengan statistik terhadap volume udem yaitu volume kaki dari jari sampai batas mata kaki tempat terjadinya udem.

3.5.4 Penetapan Kadar Kalsium Tulang Kaki Tikus

Larutan sampel semua tulang kaki tikus yang sudah didestruksi kemudian diukur dengan alat spektrofotometer serapan atom Shimadzu AA 6300 pada panjang gelombang 422,7 nm dengan gas pembakar asetilen. Data yang dihasilkan berupa absorbansi lalu dihitung dari persamaan kurva kalibrasi larutan standar. Kadar yang didapat dalam satuan ppm kemudian dikonversi dengan berat tulang, faktor *dilution* dan faktor pengenceran. Perhitungan kadar dapat dilihat di lampiran 2.

3.5.5 Pengolahan Data

Data yang diperoleh adalah volume udem dan kadar kalsium tulang. Data yang diperoleh dianalisis dengan 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 (ANOVA) 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 ANOVA 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 (Raji, Oluwadara, Akinsomiyose, 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 peningkatan kepadatan tulang. Pengujian efek antiinflamasi kronik yaitu antiartritis dilakukan pada tikus putih betina yang dibuat artritis reumatoid. Tikus putih betina dipilih karena kondisi patofisiologi kerusakan pada tulang sendi akibat artritis reumatoid lebih banyak ditemui dari pada jantan, seperti halnya pada manusia, wanita lebih rentan terkena penyakit artritis reumatoid dari pada pria (Isbagio, 1995). Induksi artritis reumatoid diharapkan akan lebih cepat terjadi pada tikus betina dari pada jantan.

Pengujian antiartritis dilakukan dengan mengukur volume udem telapak kaki tikus menggunakan pletismometer dan pengujian terhadap peningkatan kepadatan tulang dilakukan dengan menentukan kadar kalsium masing-masing kelompok perlakuan secara spektrofotometri serapan atom (SSA). Bahan uji yang dipakai adalah bahan yang sudah terbukti memiliki efek antiinflamasi kuat baik akut maupun kronik, yaitu ekstrak etanol jahe merah (Kitagata-cho, 2007; Retno, 2011).

Dosis ekstrak etanol jahe merah yang digunakan adalah dosis bertingkat, sesuai dengan penelitian sebelumnya yaitu 14 mg/200 g bb; 28 mg/200 g bb; dan 56 mg/200 g bb (Retno, 2011). Penetapan dosis yang sama dengan dosis sebelumnya dilakukan karena dosis tersebut sudah teruji efektif mengurangi gejala inflamasi akut meskipun hasil menunjukkan belum optimal. Selain itu, jika dengan pemberian ketiga dosis tersebut menunjukkan bahwa efek antiinflamasi tidak berpengaruh terhadap peningkatan kepadatan tulang, maka faktor dosis tidak akan berpengaruh signifikan karena dosis tersebut sudah terbukti memiliki efek antiinflamasi. Namun, jika dipilih dosis lebih rendah atau lebih tinggi dari ketiga dosis tersebut, dan jika hasil menunjukkan tidak terdapat pengaruh terhadap peningkatan kepadatan tulang, maka faktor pemilihan dosis akan menjadi salah satu indikasi adanya hasil tersebut. Selain itu, ketiga dosis dipilih juga untuk mengetahui dosis mana yang dapat memberikan efek optimal sebagai antiartritis.

4.2 Penyiapan Serbuk Simplisia

Tanaman jahe merah yang digunakan pada penelitian ini berumur lebih kurang 10 bulan, sesuai dengan rentang usia panen tua yang berkisar antara 9 sampai 12 bulan. Rimpang tua yang akan dipanen dapat diketahui dengan ciri tanaman mulai mengering seluruhnya. Rimpang juga dapat dipanen pada umur 6 bulan untuk mendapatkan rimpang muda yang biasanya digunakan sebagai manisan, namun kurang berserat (Depkes RI, 1978).

Bagian rimpang yang akan digunakan kemudian dicuci bersih, dikeringkan, dibuat serbuk, diayak, lalu diekstraksi. Bobot basah rimpang jahe merah yang diperoleh adalah 1680 gram dan bobot kering rimpang jahe merah adalah 240 gram. Persentase bobot kering rimpang jahe merah terhadap bobot basah rimpang jahe merah adalah 14,29%.

4.3 Penyiapan Ekstrak Etanol

Rimpang jahe merah diekstraksi dengan cara dingin yaitu maserasi (Penna, Medeiros, Aimbire, Faria, Sertie, & Lopes, 2003; *Monografi ekstrak*, 2004; Retno, 2011). Hal ini dilakukan agar senyawa aktif jahe merah yang terdapat dalam minyak atsiri tidak menguap. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah etanol 70%. Etanol dipilih sebagai pelarut ekstraksi jahe merah karena senyawa aktif yang berperan sebagai antiinflamasi dalam jahe merah seperti gingerol dan shogaol mempunyai sifat larut dalam etanol (Kitagata-cho, 2007). Selain itu, pelarut etanol memiliki sifat kurang toksik dibanding pelarut polar lainnya sehingga akan lebih aman bila diberikan secara oral pada hewan uji. Etanol juga mudah diuapkan dan didestilasi sehingga penggunaan pelarut lebih hemat dari segi jumlah maupun waktu.

Ekstrak etanol jahe merah yang diperoleh kemudian ditentukan organoleptiknya dengan pancaindra untuk mendiskripsikan bentuk, warna, bau, dan rasa. Ekstrak yang didapatkan berupa ekstrak kental, berwarna kuning kecoklatan, berbau khas dan rasanya pedas (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Ekstrak Etanol Jahe Merah

4.4 Penetapan Rendemen, Susut Pengeringan, Kadar Abu Total, dan Kadar Abu tidak Larut dalam Asam

Parameter standar umum yang dilakukan pada penelitian ini adalah penetapan susut pengeringan ekstrak, kadar abu total, dan kadar abu tidak larut dalam asam. Ekstrak yang didapat kemudian ditimbang dan dihitung rendemen, ditetapkan susut pengeringan, kadar abu total, dan kadar abu tidak larut dalam asam.

Tabel 4.1 Hasil Penetapan Rendemen, Susut Pengeringan, Kadar Abu Total dan dan Kadar Abu tidak Larut dalam Asam

Hasil	Ekstrak Jahe merah
Rendemen	13,37%
Susut pengeringan ekstrak	8,73%
Kadar abu total	11,1%
Kadar abu tidak larut dalam asam	3,36%

Dari Tabel 4.1 di atas, rendemen ekstrak etanol jahe merah sebesar 13,37% memenuhi standar yaitu lebih dari 6,6% (*Monografi ekstrak*, 2004). Hasil rendemen yang didapat digunakan sebagai faktor konversi untuk menghitung dosis ekstrak yang digunakan untuk uji antiinflamasi (Lampiran 1). Rendemen tersebut dihitung dari persentase berat ekstrak dibagi berat simplisia kering. Berat total ekstrak yang diperoleh adalah 13,37 gram dan berat simplisia kering 240 gram.

Penetapan susut pengeringan ekstrak dilakukan dengan tujuan untuk memberikan batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang

pada proses pengeringan (Depkes RI, 2000). Dari tabel 4.1 dapat dilihat susut pengeringan ekstrak etanol jahe merah sebesar 8,73%.

Uji kadar abu dilakukan untuk mengetahui gambaran kandungan mineral internal dan eksternal dalam tanaman yang berasal dari awal sampai terbentuknya ekstrak (Depkes RI, 2000). Dari hasil uji diperoleh kadar abu total untuk rimpang jahe merah sebesar 11,1% (Tabel 4.1) memenuhi standar, yaitu tidak lebih dari 12% (*Standard of ASEAN*, 1993) dan tidak jauh berbeda dengan penelitian sebelumnya yaitu 11,27% (Retno, 2011), sementara kadar abu yang tidak larut dalam asam sebesar 3,36%.

4.5 Uji Efek Antiartritis

Pada penelitian ini, kelompok yang diuji berjumlah enam kelompok yaitu kontrol normal, kontrol negatif, dosis I, II, III, dan kontrol positif. 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. Induksi dengan *complete freund's adjuvant* (CFA) bertujuan untuk menimbulkan gejala-gejala artritis berupa bengkak dan merah pada telapak kaki, sehingga dapat diukur volume udem yang dihasilkan. Gejala berupa udem pada bagian telapak, jari, sampai mata kaki menunjukkan tikus mengalami gejala artritis (Mulyaningsih & Darmawan, 2006).

Pengukuran volume udem dilakukan pada hari ke-1 sebelum induksi, hari ke-7, 14, dan 21. Hal ini dilakukan untuk mengamati perubahan volume udem secara signifikan akibat pemberian larutan uji ataupun yang tidak diberi larutan uji. Dari data volume udem yang dihasilkan, dapat dibandingkan persentase penghambatan udem rata-rata pada kelompok yang diberi larutan uji yaitu kelompok dosis I, II, III, dan kontrol positif.

Volume udem rata-rata masing-masing kelompok pada hari ke-1, 7, 14, dan 21 dapat dilihat pada Tabel 4.2. Dari Tabel 4.2, bisa disimpulkan bahwa kelompok kontrol negatif mengalami peningkatan volume udem secara signifikan dari hari ke-1 sampai 21 berturut-turut, 19,2; 34; 35,5; dan 37,5 μ l. Pada kelompok dosis baik dosis I, II, dan III, serta kontrol positif, keempat kelompok

tersebut mengalami peningkatan rata-rata volume udem pada hari ke-7, lalu menurun pada hari ke-14, dan meningkat kembali pada hari ke-21. Adanya penurunan rata-rata volume udem dari hari ke-7 sampai ke-14 pada kelompok dosis (dosis I, II, dan III), dan kontrol positif menunjukkan bahwa pemberian bahan uji baik ekstrak maupun obat sintesis dapat mengurangi gejala inflamasi primer yaitu peningkatan volume udem akibat bengkak dan kemerahan pada telapak kaki tikus. Akan tetapi pada hari ke-21 keempat kelompok tersebut mengalami peningkatan rata-rata volume udem. Hal itu diperkirakan akibat lesi sekunder dari induksi *complete freund's adjuvant* (CFA) berupa pembengkakan di bagian sendi mulai bekerja pada hari ke-12 setelah induksi (Parmar, N.S. & Prakash, 2006). Dapat dikatakan efek dari pemberian bahan uji pada hari ke-14 sampai 21 tidak lagi mampu menurunkan volume udem telapak kaki secara signifikan meskipun volume udem yang dihasilkan lebih kecil dari kontrol negatif. Untuk lebih jelas melihat perubahan rata-rata volume udem masing-masing kelompok pada hari ke-7, 14, dan 21, dapat dilihat pada Gambar 4.2.

Tabel 4.2 Volume Rata-rata Telapak Kaki Tikus pada Hari ke-1 sampai 21 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
Kontrol Normal	19,67 \pm 1,08	19,67 \pm 1,08	19,67 \pm 1,08	19,67 \pm 1,08
Kontrol Negatif	19,92 \pm 1,80	34,0 \pm 2,64	35,5 \pm 3,56	37,5 \pm 3,83
Dosis I	19,8 \pm 2,06	31,7 \pm 2,48	30,6 \pm 1,99	33,0 \pm 2,45
Dosis II	20,2 \pm 1,50	31,5 \pm 3,27	29,9 \pm 3,04	32,3 \pm 3,20
Dosis III	21,8 \pm 4,62	29,8 \pm 2,64	28,2 \pm 2,32	30,2 \pm 2,93
Kontrol Positif	21,3 \pm 2,33	29,42 \pm 2,41	27,5 \pm 1,29	31,0 \pm 2,58

Keterangan : *) = sebelum induksi

Berdasarkan analisis statistik pada Lampiran 3 sampai 6, data volume udem untuk semua kelompok pada masing-masing hari pengujian menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen. Namun, pada uji ANAVA, nilai sig.<0,05, pada hari ke-7, 14, dan 21. Untuk itu, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil

(BNT), untuk menentukan apakah terdapat perbedaan bermakna atau tidak pada masing-masing hari pengujian. Secara lengkap hasil uji BNT bisa dilihat pada Tabel 4.11.

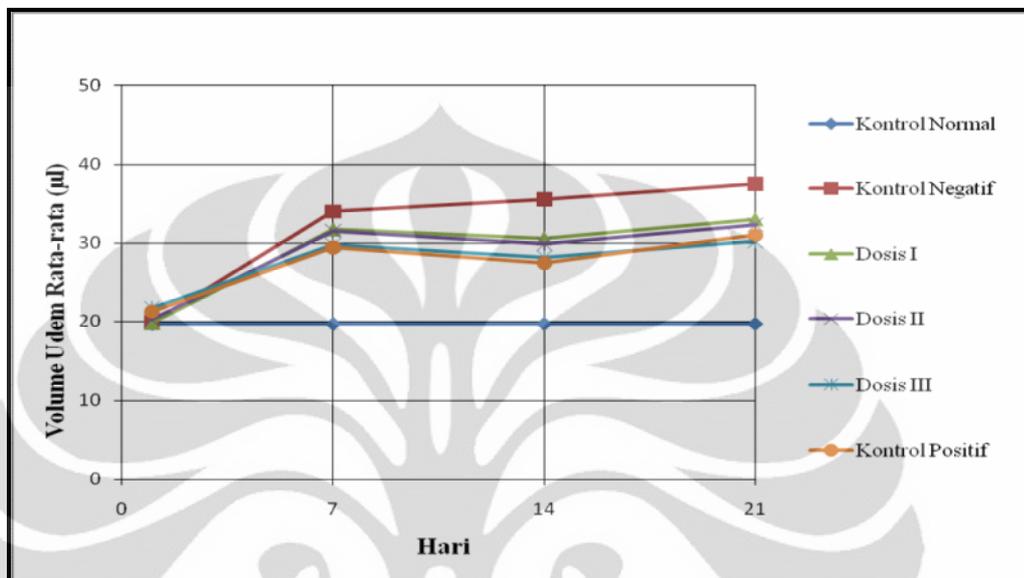
Dari Tabel 4.11, didapatkan bahwa pada hari ke-7, 14, dan 21, seluruh kelompok berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kontrol normal, antara kontrol negatif dengan dosis I, II, III, dan kontrol positif pada hari ke-14 dan 21, antara kontrol negatif dengan dosis III dan kontrol positif pada hari ke-7. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok dosis I, II, III, dan kontrol positif mempunyai efek antiartritis setelah pemberian 13 hari pada hari ke-14 sejak induksi *complete freund's adjuvant* (CFA). Kelompok dosis III dan kontrol positif juga mempunyai efek antiartritis setelah pemberian 6 hari pada hari ke-7 sejak induksi. Dari tabel tersebut disimpulkan bahwa kelompok dosis III dan kontrol positif dapat mengurangi besarnya volume telapak kaki tikus yang ditimbulkan oleh pemberian *complete freund's adjuvant* (CFA) secara subplantar setelah pemberian 6 hari, sementara kelompok dosis I dan II dapat mengurangi besarnya volume telapak kaki setelah pemberian 13 hari.

Tabel 4.3 Persentase Penghambatan Udem Rata-rata pada Hari ke-7, 14, dan 21 setelah Diinduksi 0,1 ml *complete freund's adjuvant* (CFA) pada semua Kelompok Perlakuan kecuali Kontrol Normal

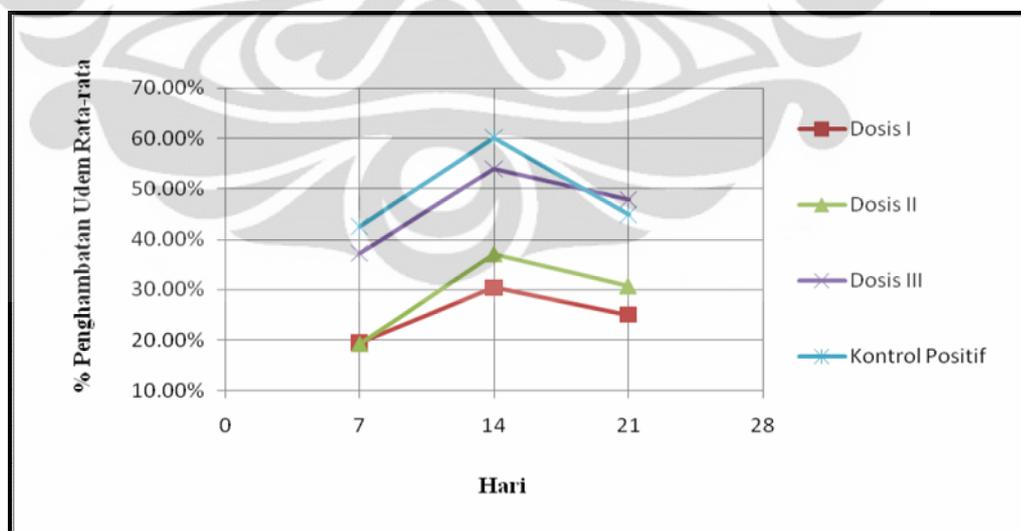
Perlakuan	Persentase Penghambatan Udem Rata-rata (%)		
	Hari-7	Hari-14	Hari-21
Kontrol Normal	0	0	0
Kontrol Negatif	0	0	0
Dosis I	19,46	30,42	25,08
Dosis II	19,18	37,09	30,72
Dosis III	37,29	53,98	47,84
Kontrol Positif	42,57	60,20	44,82

Berdasarkan Tabel 4.3, persentase penghambatan udem hasil kelompok ekstrak jahe merah dosis I (14 mg/200 g bb) pada hari ke-7, 14, dan 21 setelah induksi berturut turut adalah 19,46; 30,42; dan 25,08%. Kelompok dosis II (28 mg/200 g bb) memiliki persentase penghambatan berturut-turut, 19,18; 37,09; dan

30,72%. Dosis III (56 mg/200 g bb) memiliki persentase berturut-turut, 37,29; 53,98; dan 47,84%, sementara untuk kontrol positif (natrium diklofenak 1 mg/200 g bb) berturut-turut 42,57; 60,20; dan 44,82%.



Gambar 4.2 Grafik Volume Rata-rata Telapak kaki Tikus pada Hari ke-1 sampai 21 setelah Diinduksi 0,1 ml *complete freund's adjuvant* (CFA) pada semua Kelompok Perlakuan kecuali Kontrol Normal



Gambar 4.3 Grafik Persentase Penghambatan Udem pada Hari ke-7, 14, dan 21 setelah Diinduksi 0,1 ml *complete freund's adjuvant* (CFA) pada semua Kelompok Perlakuan kecuali Kontrol Normal

Persentase penghambatan dosis I lebih rendah dibandingkan dengan dosis II, III, dan kontrol positif pada hari ke-7, 14 dan 21, kecuali pada hari ke-7, dosis

I lebih tinggi dari dosis II (Gambar 4.3). Namun berdasarkan analisis statistik dosis I tidak berbeda bermakna jika dibandingkan dengan ketiga kelompok tersebut kecuali kontrol positif pada hari ke-14 (Tabel 4.11). Hal ini menunjukkan bahwa efek antiartritis dosis I setara dengan dosis II, III, dan kontrol positif, kecuali pada hari ke-14, dimana dosis I berbeda bermakna dengan kontrol positif.

Persentase penghambatan dosis II (28 mg/200 g bb) lebih tinggi dari dosis I pada hari ke-14 dan 21, namun lebih kecil pada hari ke-7 (Tabel 4.3). Persentase penghambatan dosis II lebih rendah dari dosis III dan kontrol positif pada hari ke-7, 14, dan 21 (Tabel 4.3). Pada grafik (Gambar 4.3) dapat dilihat bahwa persentase penghambatan udem dosis II jauh lebih rendah dari pada dosis III dan kontrol positif. Secara analisa statistik, menunjukkan bahwa dosis II tidak berbeda bermakna dengan ketiga kelompok bahan uji tersebut (Tabel 4.11), sehingga dapat dikatakan bahwa efek antiartritis dosis II setara dengan dosis I, II, III, dan kontrol positif (natrium diklofenak) pada hari ke-7, 14, dan 21.

Persentase penghambatan dosis III (56 mg/200 g bb) lebih tinggi dari dosis I dan II pada hari ke-7, 14, dan 21 (Tabel 4.3). Persentase penghambatan dosis III lebih rendah dari kontrol positif pada hari ke-7, dan 14, namun lebih tinggi pada hari ke-21 (Tabel 4.3). Kelompok kontrol positif pada hari ke-10 ada satu ekor tikus mati, dan pada hari ke-13 juga satu ekor tikus lainnya mati. Jadi, jumlah ulangan tikus untuk kontrol positif menjadi 4 ekor dari yang sebelumnya 6 ekor. Pada hari ke-21 efek penghambatan volume udem kontrol positif ternyata menjadi lebih rendah dari dosis III. Dapat dikatakan, dosis III (56 mg/200 g bb) lebih efektif dalam mengurangi volum udem jika dibandingkan dengan natrium diklofenak dosis 1 mg/200 g bb setelah pemberian 14 hari sejak induksi.

Kematian tikus karena pemberian dosis natrium diklofenak setiap hari sebesar 1 mg/200 g bb disebabkan efek samping dari golongan obat antiinflamasi nonsteroid (AINS) berupa gangguan pada lambung, usus, perpanjangan masa pendarahan, dan regulasi elektrolit tubuh. Kondisi kedua tikus yang mati menunjukkan gejala pembesaran dan perubahan warna menjadi biru di bagian perut dan pendarahan pada hidung. Hal ini terjadi karena efek penghambatan siklooksigenase yang cukup kuat. Siklooksigenase penting dalam pemeliharaan berbagai organ dan jaringan khususnya ginjal, saluran cerna dan trombosit. Jika

aktivitas siklooksigenase dihambat oleh AINS maka akan timbul efek samping pada berbagai organ dan jaringan tersebut. Contohnya pendarahan dan gangguan lambung yang ditunjukkan oleh tikus sebelum mengalami kematian. Pendarahan terjadi karena siklooksigenase-1 yang berperan terhadap pembentukan tromboksan dihambat, sehingga terjadi penurunan agregasi trombosit (Wilmana, PF & Gan, Sulistia, 2007).

Berdasarkan analisis statistik pada Tabel 4.11, perbandingan antara kelompok dosis menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara ketiga dosis baik pada hari ke-7, 14, maupun 21. Meskipun jika dilihat dari persentase penghambatan volum udem rata-rata (Tabel 4.3) menunjukkan kelompok dosis III lebih baik dari dosis II dan I pada hari ke-7, 14, dan 21, dosis II lebih baik dari dosis I, pada hari ke-14, dan 21, namun tidak terdapat perbedaan efek antiartritis jika dianalisis secara statistik. Meskipun demikian, ketiganya berbeda bermakna dengan kontrol negatif kecuali dosis I dan II, pada hari ke-7. Secara statistik dapat dikatakan bahwa ketiga dosis memiliki efek antiartritis yang sebanding dalam mengurangi volume udem jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Jika dibandingkan dengan kontrol positif (natrium diklofenak), ketiga dosis tidak berbeda bermakna pada hari ke-7, 14, dan 21 kecuali dosis I pada hari ke-14. Jadi ketiga dosis memiliki efek antiartritis yang sebanding dengan kontrol positif, meskipun persentase penghambatan volume udem rata-rata (Tabel 4.3) untuk kontrol positif lebih besar dari dosis I, II, dan III pada hari ke-7, 14, dan 21, kecuali dengan dosis III pada hari ke-21.

Dari ketiga kelompok dosis (ekstrak jahe merah), jika dibandingkan efek antiartritis nya terhadap kontrol positif (natrium diklofenak), maka efek antiartritis dapat dicapai dari dosis I (14 mg/200 g bb) setelah pemberian 14 hari, dan dari dosis II (28 mg/200 g bb) dan III (56 mg/200 g bb), setelah pemberian 7 hari. Berdasarkan persentase penghambatan volume udem rata-rata, maka dosis III (56 mg/200 g bb) lah yang lebih efektif untuk mengurangi volume udem dengan nilai persen hambat yang tidak jauh berbeda dengan kontrol positif (1 mg/200 g bb) (Tabel 4.3).

Aktivitas antiartritis yang merupakan antiinflamasi kronik diperkirakan terjadi karena pembentukan mediator–mediator inflamasi dihambat, baik dari

jalur siklooksigenase maupun lipooksigenase. Senyawa yang diketahui berperan dalam menimbulkan efek antinflamasi dalam ekstrak rimpang jahe merah adalah 6-gingerol dan 6-shogaol. Kedua senyawa ini yang merupakan komponen terbesar dari ekstrak jahe merah diketahui berperan dalam penghambatan jalur siklooksigenase dan lipooksigenase sehingga sintesis prostaglandin terutama PGE₂ dan leukotrien menjadi terganggu (Jolad, Lantz, Solyom, Chen, Bates, & Timmerman, 2004; Grzanna, Reinhard, Lars, & Carmelita, 2005).

4.6 Penyiapan Sampel Tulang

Pada hari ke-21 setelah pengujian efek antiarthritis, tikus dimatikan untuk diambil tulang sendi kaki kirinya dari sendi mata kaki sampai sendi lengan kaki bagian atas. Isolasi tulang dengan menggunakan alat bedah secara hati-hati agar bagian tulang yang akan diisolasi tidak terpotong. Setelah didapat bagian tulang yang akan dikeringkan, terlebih dahulu tulang dibersihkan dari jaringan, serat, dan lapisan lemak yang masih menempel agar didapatkan tulang yang bersih. Tulang tersebut kemudian disimpan di dalam larutan etanol 70% agar komposisi tulang yang terisolasi tetap utuh dan menghindari rusaknya komposisi tulang jika dibiarkan tanpa penyimpanan yang baik.

Tulang kemudian dikeringkan dalam oven bersuhu 100⁰C selama 24 jam. Setelah kering, lalu ditimbang untuk mendapatkan bobot kering tulang. Tulang lalu dipotong menjadi setengahnya untuk memperkecil ukuran sebelum diabukan. Hal ini dilakukan agar proses pengabuan lebih merata jika ukuran tulang tidak diperkecil. Tulang yang sudah dipotong dimasukkan ke dalam krusibel lalu ditanur selama 4 jam pada suhu 700⁰C.

Tulang yang sudah menjadi abu berwarna putih kemudian dipindahkan ke lumpang untuk digerus agar menjadi serbuk abu tulang. Hal ini dilakukan karena tulang yang berasal dari penanuran tidak lantas berubah seperti abu berbentuk serbuk, melainkan masih dalam bentuk tulang biasa, hanya saja warna yang berubah dan komposisi tulang yang berkurang setelah diabukan. Penggerusan abu tulang menjadi serbuk juga untuk meningkatkan kelarutan abu tulang pada saat destruksi.

Serbuk abu tulang yang sudah didapat, lalu dimasukkan dalam erlenmeyer, dilarutkan dalam asam nitrat pekat sebanyak 3 ml, dipanaskan kurang lebih 1 menit di atas *hotplate*. Asam nitrat pekat dipilih karena sukar menguap daripada pelarut asam lainnya terutama jika perlu pemanasan pada proses destruksi sampel. Untuk melarutkan logam-logam atau logam campur pada sampel yang berbentuk padat, bisa digunakan asam klorida, asam sulfat, dan asam nitrat, namun asam nitrat lebih sering dipakai dan disukai karena sifatnya yang sukar menguap pada saat pengurangan (Harmita, 2006).

Proses pelarutan serbuk dilakukan dalam lemari asam karena pelarut yang digunakan adalah pelarut pekat untuk menghindari bahaya yang bisa ditimbulkan. Setelah terlarut, tambahkan aquabidest secara hati-hati agar serbuk bisa terlarut semua tanpa ada yang tersisa di erlenmeyer. Kemudian masukkan ke labu takar 50,0 ml dengan sebelumnya disaring menggunakan kertas saring agar partikel yang tidak terlarut dapat tersaring, sehingga di dapat larutan yang jernih. Cukupkan sampai batas labu dengan aquabidest, dan didapatkan larutan induk 50,0 ml. Larutan induk tersebut yang dipakai sebagai faktor *dilution* pada perhitungan kadar kalsium (Lampiran 2.2).

Dari larutan induk, pipet dengan pipet volume sebanyak 1 ml, masukkan ke dalam labu takar 100,0 ml. Cukupkan sampai batas labu dengan aquabidest, didapatkan larutan sampel dengan pengenceran 100 kali. Dari larutan pengenceran 100 kali, pipet dengan pipet volume 5 ml, lalu masukkan ke dalam labu takar 50,0 ml, sehingga didapatkan larutan sampel dengan pengenceran 1000 kali dari larutan induk. Pengenceran 1000 kali ini digunakan sebagai faktor pengenceran pada perhitungan kadar kalsium (Lampiran 2.2).

Larutan sampel dengan pengenceran 1000 kali digunakan sebagai pengenceran terbesar untuk diukur kadar kalsium nya dengan spektrofotometri serapan atom (SSA). Pengenceran 1000 kali ditetapkan setelah sebelumnya dilakukan orientasi dulu terhadap pengenceran 100 kali. Hasil absorbansi untuk pengenceran 100 kali jauh lebih besar dari pada rentang absorbansi yang ditunjukkan larutan standar kalsium. Untuk itu, dilakukan pengenceran 1000 kali dan hasil absorbansi menunjukkan masuk dalam rentang absorbansi larutan standar kalsium.

Hal penting yang perlu diperhatikan pada proses destruksi sampel sampai didapatkan larutan sampel untuk diuji menggunakan SSA adalah kebersihan alat yang digunakan, penyimpanan larutan, dan teknik pengenceran. Alat-alat yang digunakan seperti lumpang, labu takar, dan pipet volume diusahakan tidak dipakai berkali-kali untuk sampel yang berbeda. Untuk itu, setiap kali alat tersebut digunakan maka dicuci bersih dan direndam menggunakan asam nitrat 0,5 M agar menghindari kemungkinan masih tersisanya unsur-unsur logam dalam alat tersebut. Hal ini harus dilakukan agar perolehan kadar logam yang didapat tidak tercampur dengan sampel lainnya, mengingat alat SSA mampu membaca sampel dengan konsentrasi yang sangat kecil. Larutan yang akan diukur menggunakan SSA, harus disimpan dalam botol plastik polietilen karena jika menggunakan gelas, maka beberapa logam dapat terserap oleh permukaan gelas tersebut (Harmita, 2006). Teknik pengenceran larutan juga diusahakan kuantitatif dengan memperhatikan batas labu atau pipet volume yang digunakan.

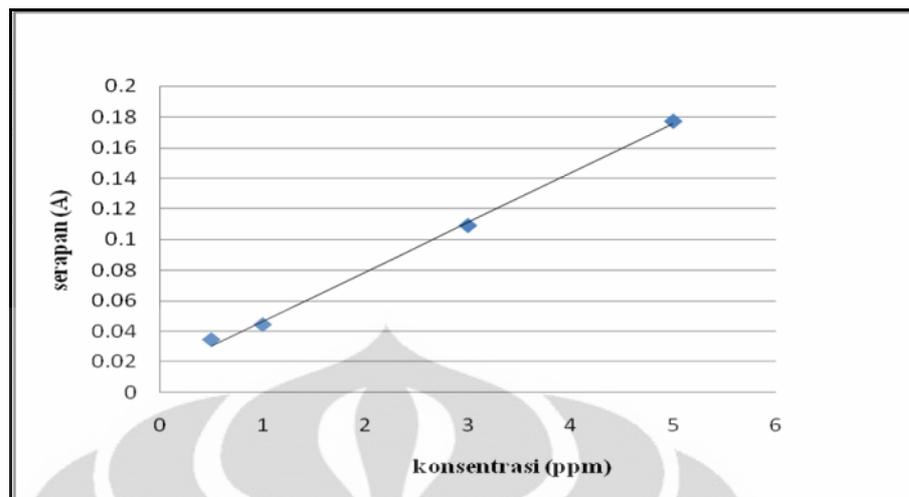
4.7 Pembuatan Kurva Kalibrasi

Pembuatan kurva kalibrasi dimulai dengan pembuatan larutan standar kalsium. Larutan standar kalsium yang dipakai berasal dari Laboratorium Afiliasi Kimia UI. Dari larutan induk 1000 ppm, kemudian diencerkan sampai diperoleh konsentrasi 0,5; 1; 3; dan 5 ppm. Setelah itu diukur serapannya untuk menentukan nilai absorbansi pada panjang gelombang 422,7 nm menggunakan spektrofotometri serapan atom (SSA).

Kurva kalibrasi kalsium yang dibuat dengan 4 konsentrasi yaitu 0,5; 1; 3; dan 5 ppm mempunyai persamaan garis linear yang diperoleh adalah $y = 0,014641 + 0,03293x$, dengan koefisien korelasi (r) adalah 0,9990.

Tabel 4.4 Data Kurva Kalibrasi Larutan Standar Kalsium

Konsentrasi	Absorbansi
0.5	0.0342
1	0.0441
3	0.1089
5	0.1772



Gambar 4.4 Kurva Kalibrasi Larutan Standar Kalsium

4.8 Perbandingan Kadar Kalsium Kelompok Perlakuan

Larutan sampel yang diukur dengan spektrofotometri serapan atom (SSA) pada panjang gelombang 422,7 nm, akan menghasilkan serapan untuk masing-masing kelompok perlakuan yang bisa dilihat pada tabel 4.13. Dari serapan yang dihasilkan, dicari kadarnya dengan memasukkan nilai absorbansi sebagai nilai y pada persamaan kurva kalibrasi, dan didapat nilai x dalam satuan ppm. Kemudian dikalikan dengan faktor *dilution* dan faktor pengenceran lalu dibagi dengan bobot kering tulang. Bobot kering tulang dapat dilihat di Tabel 4.12, dan cara memperoleh kadar kalsium bisa dilihat di Lampiran 2.2. Kadar kalsium dalam tulang cukup tinggi. Dalam 1 mg tulang terdapat sekitar 10 sampai 13% kalsium, seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4.5 yaitu kadar kalsium tulang dalam satuan mg/mg. Misalnya, kadar rata-rata kalsium kelompok kontrol normal 0,1232, yang artinya dalam 1 mg tulang kering terdapat 0,1232 mg kalsium.

Tabel 4.5 Kadar Kalsium Masing-masing Kelompok Diukur Dengan Spektrofotometri Serapan Atom pada Akhir Perlakuan

N (Ulangan Tikus)	Kadar Kalsium Tulang Kaki dalam mg/mg					
	Kontrol Normal	Kontrol Negatif	Dosis I	Dosis II	Dosis III	Kontrol Positif
1	0,1313	0,1035	0,1176	0,1247	0,1211	0,1387
2	0,1223	0,1119	0,1188	0,1098	0,1255	0,1238
3	0,1156	0,0944	0,1493	0,1168	0,1247	0,1277
4	0,1170	0,0923	0,1136	0,1252	0,1245	0,1368
5	0,1296	0,1011	0,1213	0,1128	0,1106	-
Rata-rata	0,1232	0,1027	0,1241	0,1179	0,1213	0,1317
Standar Deviasi	0,0071	0,0072	0,0143	0,0069	0,0062	0,0071

Berdasarkan Tabel 4.5 di atas, kadar kalsium rata-rata dalam satuan mg/mg untuk kelompok kontrol normal, kontrol negatif, dosis I, II, III, dan kontrol positif, berturut-turut, 0,1232; 0,1027; 0,1241; 0,1179; 0,1213; dan 0,1317. Kadar kalsium tertinggi sampai terendah berturut-turut dimulai dari kontrol positif (CFA + natrium diklofenak 2 mg/200 g bb), dosis I (CFA + ekstrak jahe merah 14 mg/200 g bb), kontrol normal (larutan salin + larutan CMC 0,5%), dosis III (CFA + ekstrak jahe merah 56 mg/200 g bb), dosis II (CFA + ekstrak jahe merah 28 mg/200 g bb), dan kontrol negatif (CFA + larutan CMC 0,5%). Seharusnya kadar yang dihasilkan oleh kelompok dosis adalah kelompok dosis III lebih besar dari II dan I. Kelompok dosis II seharusnya lebih besar dari dosis I. Hal ini diperkirakan karena efek peningkatan kadar kalsium yang optimal dapat dicapai dengan pemberian dosis I (ekstrak jahe merah 14 mg/200 g bb), sehingga pemberian dosis yang lebih besar tidak berpengaruh signifikan dalam menimbulkan efek yang sama. Untuk kontrol negatif, kadar yang diperoleh menunjukkan bahwa kontrol negatif memiliki kadar paling kecil dari kelompok lainnya. Ini sesuai dengan mekanisme inflamasi kronik yang menyebabkan tulang sendi mengalami destruksi sehingga komposisi penyusun tulang, salah satunya kalsium menjadi berkurang.

Berdasarkan analisis statistik pada lampiran 7, kadar kalsium untuk semua kelompok terdistribusi homogen namun tidak terdistribusi normal. Selanjutnya

Universitas Indonesia

dianalisis dengan uji *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna atau tidak dari kadar kalsium tulang kaki tikus tiap perlakuan. Dari uji *Kruskal-Wallis* didapat nilai $\text{sig.} < 0,05$, artinya terdapat perbedaan bermakna terhadap kadar kalsium tulang kaki tikus tiap kelompok perlakuan. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui kelompok kelompok mana saja yang berbeda bermakna dari keenam kelompok perlakuan.

Dari uji *Mann-Whitney* pada Lampiran 7, dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antar perlakuan kelompok kontrol negatif dengan kelima kelompok lainnya dan antara dosis II dengan kontrol positif. Namun tidak terdapat perbedaan bermakna pada perbandingan antara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya kecuali kontrol negatif; antara kontrol positif dengan kontrol normal, dosis I, dan III; dan antara ketiga dosis perlakuan. Dosis I dan III memiliki efek yang sama dengan kontrol normal dan positif dalam meningkatkan atau menjadikan tulang kembali normal.

Perbedaan bermakna antara kelompok kontrol negatif dengan kelima kelompok lainnya menunjukkan bahwa pemberian bahan uji baik ekstrak maupun obat sintetis dapat meningkatkan kadar kalsium tulang atau memperbaiki kondisi tulang menjadi normal. Hal tersebut diperkuat dengan tidak adanya perbedaan bermakna antara kontrol normal dengan ketiga kelompok dosis dan antara kontrol positif dengan ketiga kelompok dosis kecuali dosis II (ekstrak jahe merah 28 mg/200 g bb). Untuk itu, dapat dikatakan bahwa peningkatan kepadatan tulang yang ditandai dengan efek yang sama dengan kontrol positif dapat dicapai dengan pemberian dosis I (ekstrak jahe merah 14 mg/200 g bb) dan III (ekstrak jahe merah 56 mg/200 g bb). Sementara perbaikan kondisi tulang yang ditandai dengan efek yang sama dengan kontrol normal dapat dicapai dengan pemberian ketiga dosis ekstrak. Namun, jika dilihat dari dua analisis, baik statistik maupun perbandingan kadar kalsium, maka kelompok dosis I (ekstrak jahe merah 14 mg/200 g bb) lah yang memiliki efek lebih baik dan sebanding dengan kontrol normal maupun kontrol positif.

Adanya peningkatan dosis ekstrak jahe merah yang tidak menunjukkan peningkatan kadar kalsium tulang secara signifikan, menunjukkan bahwa dosis I sudah optimal dalam memberikan efek peningkatan atau perbaikan kerusakan

tulang. Untuk itu, jika dosis I ditingkatkan, maka tidak akan terjadi peningkatan efek karena efek puncak sudah dicapai dengan pemberian dosis I, dan peningkatan dosis juga bisa menurunkan efek sebagaimana hasil kadar kalsium tulang untuk dosis I lebih besar dari dosis II dan III (Tabel 4.5).

4.9 Hubungan antara Antiinflamasi kronik-antiartritis dengan Peningkatan Kepadatan Tulang

Sebagaimana yang telah dibahas pada bagian sebelumnya dan data yang dapat dilihat pada Tabel 4.5, pemberian bahan uji ekstrak etanol jahe merah dengan dosis bervariasi dapat meningkatkan kepadatan tulang dan memperbaiki kondisi tulang. Bahan uji ekstrak jahe merah yang sudah terbukti sebagai antiinflamasi baik akut maupun kronik dapat meningkatkan kepadatan tulang seperti efek yang dihasilkan oleh kontrol positif (natrium diklofenak 2 mg/200 g bb) setelah tikus diinduksi *complete freund's adjuvant* (CFA) yang bekerja sebagai antigen penginduksi artritis. Ekstrak jahe merah juga dapat memperbaiki kondisi tulang karena secara statistik tidak terdapat perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol normal yaitu kelompok yang tidak diinduksi *complete freund's adjuvant* (CFA) dan hanya diberi larutan CMC 0,5% selama perlakuan.

Dari pembahasan sebelumnya dapat disimpulkan bahwa bahan uji yang memiliki efek antiinflamasi kronik yaitu antiartritis dapat meningkatkan kepadatan tulang. Peningkatan kepadatan tulang terjadi karena mekanisme antiinflamasi dalam menghambat produksi faktor pencetus inflamasi baik akut maupun kronik. Faktor pencetus inflamasi kronik seperti interleukin (IL)-1 beta, IL-6, dan *tumor necrosis factor alpha* yang menginduksi siklooksigenase 2 dapat mengaktifkan sel perusak tulang di permukaan sendi yaitu osteoklas. Osteoklas diaktifkan oleh *reseptor activator of nuclear factor kB-ligand* (RANKL) dan *macrophage colony-stimulating factor* (M-SCF). RANKL dan M-SCF teracetus akibat sinyal dari adanya faktor-faktor inflamasi kronik. Jika osteoklas menjadi aktif, maka proses destruksi tulang pun terjadi, yang mengakibatkan kandungan tulang berkurang. Jadi, jika produksi osteoklas dihambat maka kerusakan tulang dapat dicegah (Herman, Kronke, & Schett, 2008).

Aktifitas penghambatan kerusakan atau perbaikan kondisi tulang tidak hanya ditunjukkan pada senyawa yang bekerja di siklooksigenase 2. Akan tetapi, senyawa yang bekerja di siklooksigenase 1 pun memiliki efek yang sama dalam hal peningkatan dan perbaikan kondisi tulang meskipun masih lebih kecil dari senyawa yang selektif bekerja di siklooksigenase 2. Dari penelitian yang dilakukan oleh Noguchi, 2008, kelompok yang diberi *celecoxib* (penghambat siklooksigenase 2) pada dosis 3 mg/kg/hari dan *lexoprofen* (penghambat siklooksigenase non selektif) pada dosis yang sama menunjukkan peningkatan kepadatan tulang lebih tinggi dari kontrol negatif dan secara struktur tiga dimensi juga menunjukkan penampakan struktur tulang kelompok obat sintetis lebih baik dari pada kontrol negatif. Untuk itu, senyawa yang bekerja di siklooksigenase baik selektif maupun nonselektif dapat menunjukkan efek yang signifikan dalam hal peningkatan kepadatan tulang (Noguchi, Kimoto, Sasamata, & Miyata, 2008).

Pada Gambar 4.5, dapat dilihat gejala arthritis berupa bengkak dan merah di telapak kaki pada hari ke-21. Dari gambar tersebut juga bisa dilihat kelompok kontrol negatif memiliki penampakan udem terbesar dan kontrol normal menunjukkan penampakan terkecil. Namun, untuk kelompok bahan uji baik kelompok dosis dan kontrol positif tidak dapat dibedakan dengan baik jika diamati secara langsung.



Gambar 4.5 Penampakan Telapak Kaki tikus Dilihat dari Permukaan Telapak Kaki dan Sisi Mendatar Kaki pada Hari ke-21, berturut-turut: kontrol normal (1), kontrol negatif (2), dosis I (3), dosis II (4), dosis III (5), dan kontrol positif (6)

Tabel 4.6 Perbandingan Kadar Kalsium dan Volume Telapak Kaki Rata-rata pada Hari ke-21 Semua Kelompok Perlakuan

Kelompok	Kontrol Normal	Kontrol Negatif	Dosis I	Dosis II	Dosis III	Kontrol Positif
kadar ca rata-rata(mg/mg) ± SD	0,1232 ± 0,0071	0,1027 ± 0,0072	0,1241 ± 0,0143	0,1179 ± 0,0069	0,1213 ± 0,0062	0,1317 ± 0,0071
volume udem rata-rata pada hari-21 (µl) ± SD	19,67 ± 1,08	37,5 ± 3,83	33,0 ± 2,45	32,3 ± 3,20	30,2 ± 2,93	31,0 ± 2,58

Pada Tabel 4.6, dapat dilihat perbandingan kadar kalsium dan volume udem masing-masing kelompok pada hari ke-21. Dari tabel tersebut dapat disimpulkan bahwa volume udem yang semakin besar memiliki potensi untuk terjadinya penurunan kadar kalsium, meskipun tidak selalu demikian. Tetapi, dari analisis statistik terbukti bahwa kelompok bahan uji memiliki efek meningkatkan kadar kalsium jika dibandingkan dengan kontrol negatif.

BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan:

1. Ekstrak etanol 70% rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc. Var. Rubrum) mempunyai efek antiarthritis ditinjau dari penurunan volume udem telapak kaki tikus putih betina yang diinduksi *complete freund's adjuvant* (CFA). Dosis 56 mg/200 g bb ekstrak jahe merah menunjukkan persentase penghambatan udem terbesar setara dengan natrium diklofenak dosis 1 mg/200 g bb tikus.
2. Ekstrak etanol 70% rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc. Var. Rubrum) mempunyai efek peningkatan kepadatan tulang ditinjau dari kadar kalsium yang dibandingkan dengan kontrol negatif dan setara dengan natrium diklofenak dosis 1 mg/200 g bb tikus dan kontrol normal. Dosis 14 mg/200 g bb ekstrak jahe merah menunjukkan efek peningkatan kadar kalsium terbesar setara dengan natrium diklofenak dosis 1 mg/200 g bb tikus.
3. Ada hubungan antara efek antiarthritis yang merupakan efek penghambatan inflamasi kronik dengan meningkatnya kepadatan tulang, sehingga ekstrak etanol jahe merah dapat digunakan untuk mencegah dan mengobati penyakit arthritis reumatoid.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan dosis yang lebih rendah dari dosis I (ekstrak jahe merah 14 mg/200 g bb), yang merupakan dosis efektif dan optimal, agar dapat diketahui dosis yang lebih kecil dari dosis efektif akan berpengaruh signifikan atau tidak terhadap peningkatan kadar kalsium tulang.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan kontrol pembanding yang berbeda, terutama yang bekerja selektif di siklooksigenase 2 karena diketahui lebih efektif dalam meningkatkan kepadatan tulang dibandingkan dengan siklooksigenase nonselektif.

Universitas Indonesia

DAFTAR ACUAN

- Anief, Moh. (1997). *Ilmu Meracik Obat Teori dan Praktik*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.168-173.
- Bahtiar, A., Nakamura, T., Kishida, K., Katsura, J., & Nitta, M. (2011). The L-Ser analog #290 promotes bone recovery in OP and RA mice. *Pharmacological research* 64, 203-209.
- Bendele, A. (2001). Animal models of rheumatoid arthritis. *J. Muscleskel Neuron Interact.*, Vol.1, No.4, 377-385.
- Besral. (2010). *Pengolahan dan Analisa Data-1 Menggunakan SPSS*. Depok: Departemen Biostatistika Fakultas Kesehatan Masyarakat UI, 23-30, 58-64.
- Biradar, S., Kangralkal, V.A., Mandavkar, Y., Thokur, M., & Chougule, N. (2010). Anti-inflammatory, anti-arthritis, analgesic, and anticonvulsant activity of cyperus essential oil. *International Journal of pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol.2, No.4, 112-115.
- Brzoska, M.M., Majewska, K., & Moniuszko-Jakoniuk, J. (2005). Bone mineral density, chemical composition, and biomechanical properties of the tibia of female rats exposed to cadmium since weaning up to skeletal maturity. *Food and Chemical Toxicology* 43, 1507-1519.
- Corwin, Elizabeth J. (2000). *Buku Saku Patofisiologi*. Terjemahan dari *Handbook Of Pathophysiology*. Alih bahasa: Brahm U. Pendit. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Corwin, Elizabeth J. (2008). *Handbook of Pathophysiology 3th edition*. Philadelphia: Lippincort Williams & Wilkins, 138-143.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1978). *Materia Medika Indonesia jilid II*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 113-121.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Materia Medika Indonesia jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 308; 322; 324; 328; 333-337.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Bakti Husada, 13-18.

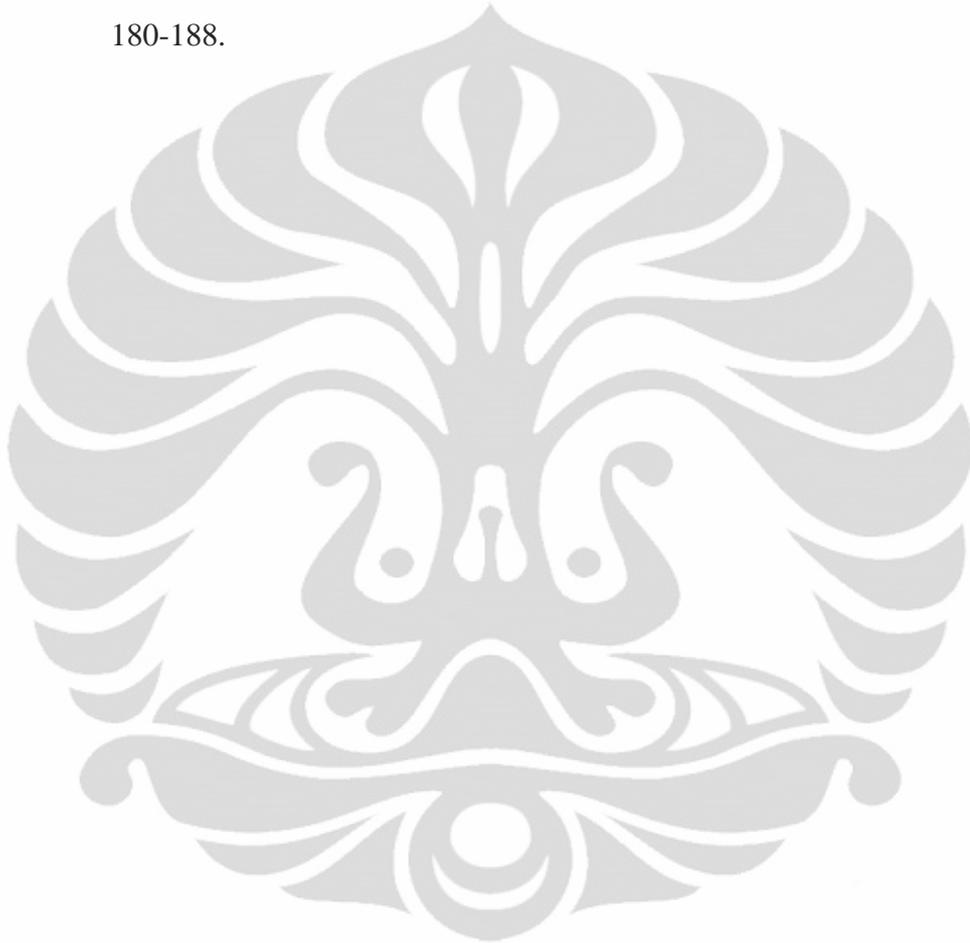
- Dipiro, J.T., Talbert, R. L., Gary, C.Y., R.M., Weels, B.G., Posey, L.M. (2006). *Pharmacotherapy : A pathophysiologic approach* (6rd edition). U.S.A: The McGraw-Hill.
- Farnsworth, N.R. (1966). Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Science* 55(3), 226-276.
- Guidlines for the research use of adjuvant*. (2005). September 10, 2011. <http://oacu.od.nih.gov/ARAC/freunds.pdf>
- Grzanna, Reinhard, Lars Linmark & Carmelita G. Frondoza. (2005). Review: Ginger-An Herbal Medicinal Product with Broad Anti-Inflammatory Actions. *Journal of Medicinal Food*, 8 (2), 125-132.
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok : Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Herman, S., Kronke, G., Schett, G. (2008). Molecular mechanisms of inflammatory bone damage : emerging targets for therapy. *Trends in Molecular Medicine Vol. 14*, No. 6
- Heyne, K. (1987). *Tumbuhan berguna Indonesia III*. Jakarta : Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, 1478.
- Indeks Tumbuh-tumbuhan Obat di Indonesia Ed 2*. (1995). Jakarta: P.T. Eisai Indonesia.
- Ilavarasan, R., Mallika, K., Venkataraman. (2005). Anti-inflammatory and antioxidant activities of Cassia Fistula Linn Bark extracts. *Africa Journal Traditional CAM, Vol.2*, 70-85
- Isbaggio, Harry. (1995). Osteoarthritis dan Arthritis Reumatoid-Perbedaan Patogenitas, Gambaran Klinis, dan Terapi. Dalam *Cermin Dunia Kedokteran No. 104*. Jakarta : PT Kalbe Farma.
- Joanne. B., Linda A.Anderson, J.David Phillipson. (2007). *Herbal Medicines third edition* [Computer Software]. Jerman: Pharmaceutical Press.
- Jolad, S.D., Lantz, R.C., Solyom, A.M., Chen, G.J., Bates, R.B., Timmerman, B.N. (2004). Fresh originally grown ginger (*Zingiber officinale*) : Composition and effect on LPS-induced PGE2 Production. *Phytochemistry Vol.65*, 1937-1954.

- Jusman, S. W., & Halim, A. (2009). Oxidative stress in liver tissue of rat induced by chronic systemic hypoxia. *Makara kesehatan*, 13 (1), 34-38.
- Kitagata-cho, Numata. (2007). *Red Ginger Extract: All Natural Anti-Arthritic & Anti-inflammatory Agent for Food & Cosmetics Applications*. Ichinomiya-city, Japan: Oryza Oil & Fat Chemical, 1-21.
- Khare, C.P. (2007). *Indian Medicinal Plants*. India: Springer Science+Business Media, LLC.
- Li Wen-Guang, Zhang Xiao Yu, Wu Yong Jie, & Tian Xuan.(2001). Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. *Acta Pharmacol. Sin.*, Vol.22, No.12, 1117-1120.
- Lusia Oktora Ruma Kumala Sari. (2006). Pemanfaatan Obat Tradisional Dengan Pertimbangan Manfaat dan Keamanannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. III, No.1
- Mulyaningsih, S., & Darmawan, E. (2006). Efek Anti Arthritis Pisang Ambon (*Musa paradisiacal sapientum* L.) dan Lidah Buaya (*Aloe vera* L.) terhadap Adjuvant-Induced Irthritic Pada Tikus. *Biodeversitas*, Vol.7, No.3, 273-277.
- Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia Volume 1*. (2004). Jakarta: BADAN POM RI, 18-20.
- 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. *J Bone Miner Metab* 26, 461-468.
- Nurrochmad, A., Leviana, F., Wulancarsari, C.G., & Lukitaningsih, E. (2010). Phytoestrogens of *Pachyryzus erosus* prevent Bone Loss in an Ovarieoktomized Rat Model of Osteoporosis. *International journals of Phytomedicine*, 363-372.
- Parmar, N.S., Prakash, Siv. (2006). *Screening Methods in Pharmacology*. Oxford : Alpha Science International Ltd.
- Penna, S.C., Medeiros, M.V., Aimbire, F.S.C., Faria-Neto, H.C.C, Sertie, J.A.A., & Lopes-Mortins, R.A.B. (2003). Anti-inflammatory effect of the hydralcoholic extract of *Zingiber officinale* rhizomes on rat paw and skin edema. *Phytomedicine* 10; 381-385.

- 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.
- Retno, Diah. (2011). Uji Efek Antiinflamasi Kombinasi Ekstrak Air Akar Tanaman Akar Kucing (*Acalypha indica* Linn.) dan Ekstrak Etanol 70% Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* Rosc.) terhadap Udem Telapak Kaki Tikus yang Diinduksi Karaginan. Depok: Skripsi Sarjana Farmasi UI
- Ross, Ivan. (1999). *Medicinal Plants of the World Chemical Constituents, Traditional & Modern medicinal Uses*. New Jersey: Humana Press
- Sari, R.F. (2010). Uji Efek Antiartritis Ekstrak Etanol 80% Kulit Buah Deliam Merah (*Punica granatum* L.) terhadap Udem pada Telapak Kaki Tikus Putih Jantan yang Diinduksi oleh Complete Freund's Adjuvant. Depok: Skripsi Sarjana Farmasi UI
- Schwinghammer, T. (2003). Bone and Joint Disorders. Dalam B. Wells, J.Dipiro, T. Schwinghammer, & C. Hamilton (Eds.), *Pharmacotherapy handbook* (5th ed., hal.27-34). United State of Amerika: The McGraw Hill Companies.
- Shuid, A.N., Ping, L.L., Muhammad, N., & Muhamed, N. (2010). The effect of *Libisia pumila* var. *alata* on bone markers and bone calcium in a rat model of post-menopousal osteoporosis. *Jurnal of Ethnopharmacology* 133, 538-542.
- Singh, G., Kapoor, I.P.S., Singh, P., Heluani, C.S., Lampasona, M.P., & Catalan, C.A.N. (2008). Chemistry, antioxidant, and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresin of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology* 46, 3259-3302.
- Standard of ASEAN herbal medicine*, Vol. I. (1993). Jakarta: ASEAN Countries, 447-457.
- Tjitrosoepomo, Gembong. (1991). *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press, 152-155, 443-445.
- Utsinger , P., Zvaifler, N., % Ehrlich, G. (1985). *Rheumatoid arthritis*. Philadelphia: J.B Lipincorr Company. 71-77, 555-568.
- Wilmana, PF dan Sulistia G.G (2007). Analgesik Anti-inflamasi Nonsteroid dan Obat Golongan Sendi Lainnya. Dalam: Sulistia G.G(ed).(2007).

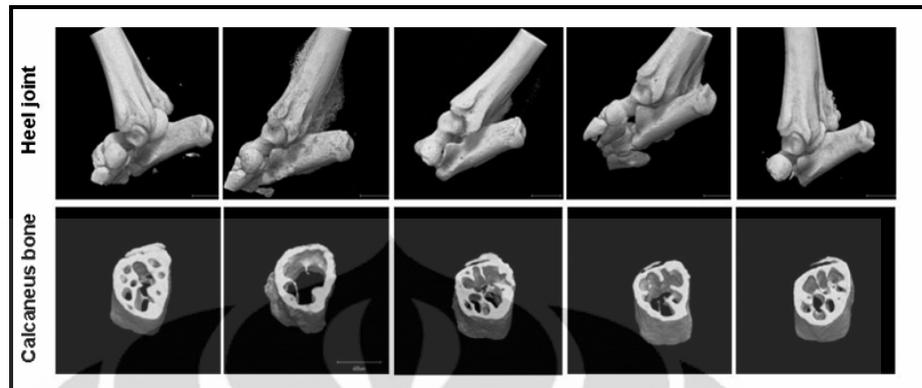
Farmakologi dan Terapan. (Edisi 5). Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 230-246.

Woode, E., Ainooson, G.K., Gyasi, E.B., Anash, C., Obiri, D.D., Koffour, G.A., Mensah, A., & Duwiejua, M. (2008). Anti-arthritic and antioxidant properties of the ethanolic stem bark extract of *Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seaman ex Boreau (Bignoniaceae). *J Med. Plants Res.*, Vol.2, No.8, 180-188.





GAMBAR



[Sumber : Bahtiar, Nakamura, Kishida, Katsura, & Nitta, 2011]

Gambar 1.1 Penampakan Tulang dengan Micro-CT yang Menunjukkan *L-Ser analog #290* Mengurangi Kerusakan Tulang pada Tikus RA ; berturut-turut dari kiri ke kanan : kontrol normal, kontrol negatif (induksi zymosan), zymosan + #290, zymosan + metotrexat, dan zymosan + #290 + metotrexat



Gambar 3.1 Rimpang Jahe Merah



Gambar 3.2 Bagian Tulang yang Diisolasi



[Sumber : Retno, 2011]

Gambar 3.3 Plethysmometer dan Cara Pengukuran Volume Kaki Tikus



Gambar 3.4 Spektrofotometer Serapan Atom (Shimadzu AA 6300)



Tabel 4.7 Penetapan Susut Pengeringan Ekstrak Etanol 70% Jahe Merah

No.	Berat (g)		persentase (%)
	Ekstrak	residu	
1	2,0466	0,1709	8,35
2	2,2216	0,2024	9,11
3	3,0763	0,2689	8,74
rata-rata			8,73

Tabel 4.8 Penetapan Kadar Abu Total Ekstrak Etanol 70% Jahe Merah

No.	Berat (g)		persentase (%)
	Ekstrak	susut ekstrak	
1	2,395	0,2555	10,67
2	3,107	0,3523	11,35
rata-rata			11,1

Tabel 4.9 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut dalam asam Ekstrak Etanol 70% Jahe Merah

No.	Berat (g)		persentase (%)
	Ekstrak	susut ekstrak	
1	2,395	0,0826	3,45
2	3,107	0,1019	3,28
rata-rata			3,36

Tabel 4.10 Volume Telapak Kaki Tikus pada Hari ke-1 ampai 21 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
Kontrol Normal	1	19,5	19,5	19,5	19,5
	2	18,5	18,5	18,5	18,5
	3	21,0	21,0	21,0	21,0
	4	19,0	19,0	19,0	19,0
	5	21,0	21,0	21,0	21,0
	6	19,0	19,0	19,0	19,0
	Rata-rata	19,67	19,67	19,67	19,67
	Standar Deviasi	1,08	1,08	1,08	1,08
	Kontrol Negatif	1	21,5	37,0	41,0
2		18,0	32,0	34,0	38,0
3		19,0	38,0	38,0	41,0
4		18,0	32,0	32,0	33,0
5		21,0	34,0	36,0	38,0
6		22,0	31,0	32,0	33,0
Rata-rata		19,92	34,0	35,5	37,5
Standar Deviasi		1,80	2,64	3,56	3,83
Dosis I		1	17,5	27,0	28,0
	2	18,0	34,0	33,0	38,0
	3	20,0	32,0	31,5	32,0
	4	22,0	30,0	28,5	31,0
	5	22,5	31,0	31,0	32,0
	6	19,5	33,0	32,0	31,0
	Rata-rata	19,8	31,7	30,6	33,0
	Standar Deviasi	2,06	2,48	1,99	2,45
	Dosis II	1	19,0	31,0	30,0
2		18,5	26,0	25,0	27,0
3		22,0	32,0	29,0	32,0
4		20,0	31,0	29,5	31,0
5		19,5	33,0	32,0	35,0
6		22,0	36,0	34,0	36,0
Rata-rata		20,2	31,5	29,9	32,3
Standar Deviasi		1,50	3,27	3,04	3,20
Dosis III		1	26,0	30,0	28,0

	2	18,0	31,0	29,0	32,0
	3	29,0	34,0	32,0	33,0
	4	18,0	29,0	28,0	29,0
	5	21,0	29,0	27,0	32,0
	6	19,0	26,0	25,0	25,0
	Rata-rata	21,8	29,8	28,2	30,2
	Standar Deviasi	4,62	2,64	2,32	2,93
Kontrol Positif	1	19,0	32,0	29,0	34,0
	2	22,0	30,0	26,0	32,0
	3	18,0	31,0	0,0	0,0
	4	23,0	25,0	0,0	0,0
	5	22,0	29,0	28,0	30,0
	6	24,0	29,5	27,0	28,0
	Rata-rata	21,3	29,42	27,5	31,0
	Standar Deviasi	2,33	2,41	1,29	2,58

Tabel 4.11 Perbandingan Ada Tidaknya Perbedaan Bermakna antar Kelompok Perlakuan Berdasarkan Hasil Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

Kelompok		Hari-7	Hari-14	Hari-21
Kontrol Normal	(-)	√	√	√
	D I	√	√	√
	D II	√	√	√
	D III	√	√	√
	(+)	√	√	√
Kontrol Negatif	D I	-	√	√
	D II	-	√	√
	D III	√	√	√
	(+)	√	√	√
Kontrol Positif	D I	-	√	-
	D II	-	-	-
	D III	-	-	-
Antar Kelompok Dosis	D I >> D II	-	-	-
	D I >> D III	-	-	-
	D II >> D III	-	-	-

Keterangan :

- = Tidak terdapat perbedaan bermakna; √ = Terdapat perbedaan bermakna; D I = Dosis I; D II = Dosis II; D III = Dosis III; (+) = Kontrol positif; (-) = Kontrol negatif

Tabel 4.12 Bobot Kering Tulang yang Ditimbang setelah Pengeringan untuk Masing-masing Kelompok pada Akhir Perlakuan (mg)

N (Ullangan Tikus)	Kelompok					
	Kontrol Normal	Kontrol Negatif	Dosis I	Dosis II	Dosis III	Kontrol Positif
1	382,2	498,0	324,8	421,1	263,2	250,2
2	210,5	514,3	475,8	422,5	326,3	280,3
3	453,8	434,8	429,7	375,1	455,1	237,1
4	408,3	271,1	440,6	380,2	258,1	136,8
5	455,3	458,9	451,5	372,2	331,6	-

Tabel 4.13 Absorbansi yang Dihasilkan pada Pengukuran Kadar Kalsium dengan Spektrofotometri Serapan Atom pada Panjang Gelombang 422,7 nm (A)

N (Ullangan Tikus)	Kelompok					
	Kontrol Normal	Kontrol Negatif	Dosis I	Dosis II	Dosis III	Kontrol Positif
1	0,0605	0,0614	0,0526	0,0620	0,0484	0,0503
2	0,0444	0,0540	0,0646	0,0580	0,0544	0,0503
3	0,0620	0,0564	0,0697	0,0563	0,0740	0,0474
4	0,0589	0,0540	0,0604	0,0558	0,0486	0,0519
5	0,0663	0,0547	0,0636	0,0551	0,0516	-

Keterangan : untuk larutan blanko sampel dihasilkan absorbansi sebesar 0,0128



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). Untuk 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 3 ml suspensi mengandung 1 mg natrium diklofenak.

Untuk membuat 50 ml suspensi natrium diklofenak 1 mg/200 g bb, dibutuhkan natrium diklofenak, $50/3 \text{ ml} \times 1 = 16,7 \text{ mg}$, maka sebanyak 16,7 mg natrium diklofenak, suspensikan dalam CMC 0,5% sampai 50 ml.

1.2 Penentuan dosis dan pembuatan suspensi ekstrak jahe merah

Dosis uji yang digunakan pada penelitian ini adalah sesuai dosis penelitian sebelumnya (Retno, 2011), yaitu :

Dosis I = 14 mg/200 g bb tikus

Dosis II = 28 mg/200 g bb tikus

Dosis III = 56 mg/200 g bb tikus

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

$$\text{Dosis III jahe merah} = 56 \text{ mg}/200 \text{ g bb}$$

Rendeman ekstrak yang diperoleh 13,37%, maka :

$$\text{Berat dosis yang ditimbang} = 56 \text{ mg} \times 0,13 = 7,28 \text{ mg}$$

Volume pemberian untuk ekstrak jahe merah adalah 3 ml/200 g bb

$$\text{Maka, } 7,28 \text{ mg}/3 \text{ ml} = 2,43 \text{ mg/ml}$$

Volume dosis III jahe merah yang akan dibuat sebanyak 80 ml. Berat ekstrak jahe merah yang ditimbang $80 \times 2,43 \text{ mg} = 194,4 \text{ mg}$. Suspensikan 194,4 mg ekstrak jahe merah dengan larutan CMC 0,5% hingga 80 ml. Dosis II jahe

merah diperoleh dari pengenceran dosis III, dan dosis I jahe merah diperoleh dari pengenceran dosis II.

Skema pengenceran pembuatan suspensi ekstrak jahe merah adalah sebagai berikut:

Dosis III jahe merah

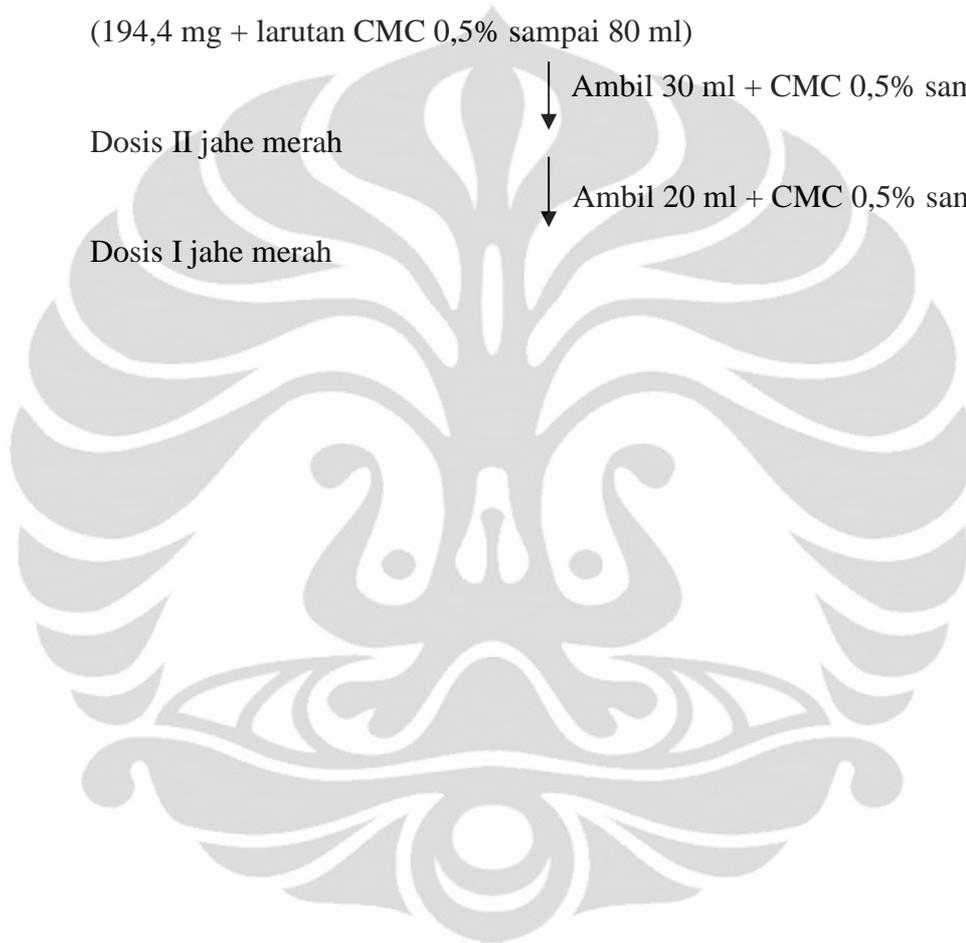
(194,4 mg + larutan CMC 0,5% sampai 80 ml)

↓ Ambil 30 ml + CMC 0,5% sampai 60 ml

Dosis II jahe merah

↓ Ambil 20 ml + CMC 0,5% sampai 40 ml

Dosis I jahe merah



Lampiran 2. Penentuan % penghambatan volume udem rata-rata dan kadar kalsium tulang kaki tikus

2.1 Cara memperoleh % penghambatan volume udem rata-rata

Rumus % penghambatan udem rata-rata :

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

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 % penghambatan udem rata-rata pada kelompok dosis I hari ke-7 :

$$a = 31,17 ; x = 19,83 \rightarrow a-x = 11,34$$

$$b = 34 ; y = 19,92 \rightarrow b-y = 14,08$$

$$\begin{aligned} \text{maka, \% penghambatan udem} &= [1 - (11,34/14,08)] \times 100\% \\ &= (1-0,8054) \times 100\% = 19,46 \% \end{aligned}$$

2.2 Cara memperoleh kadar kalsium setelah dikonversi dari persamaan kurva kalibrasi

Persamaan kurva kalibrasi, $y = 0,014641 + 0,03293x$

Contoh perhitungan kadar kalsium pada kelompok normal tikus ke-1 :

$y = 0,0605$, nilai y setelah dikurangi absorbansi blanko sebesar 0,0128 adalah 0,0477.

$$0,0477 = 0,014641 + 0,03293x$$

$$x = 1,0039 \text{ ppm}$$

$$Kadar = \frac{X(ppm).FD(ml).FP(1000)}{W(mg)}$$

x : kadar dalam ppm (1,0039 ppm)

fd : faktor dilution (50,0 ml)

fp : faktor pengenceran (1000)

w : bobot kering tulang (382,2 mg)

maka,

$$Kadar = \frac{1,0039(ppm).50,0(ml).1000}{382,2(mg)}$$

$$= 131,33 \text{ ppm.ml/mg}$$

$$= 131,33 \mu\text{g/ml. ml/mg}$$

$$= 131,33 \mu\text{g/mg}$$

$$= 0,1313 \text{ mg/mg}$$

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	.840	6	.129
	kontrol negatif	.859	6	.185
	dosis 1	.918	6	.493
	dosis 2	.868	6	.219
	dosis 3	.876	6	.252
	kontrol positif	.908	6	.421

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

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.
2.342	5	30	.066

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

3.3 Uji analisis varians satu arah 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 :

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14.035	5	2.807	.610	.693
Within Groups	138.042	30	4.601		
Total	152.076	35			

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	.840	6	.129
	kontrol negatif	.880	6	.271
	dosis 1	.957	6	.794
	dosis 2	.937	6	.633
	dosis 3	.964	6	.847
	Kontrol positif	.893	6	.333

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

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.
.619	5	30	.687

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

4.3 Uji analisis varians satu arah 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 :

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	741.035	5	148.207	22.661	.000
Within Groups	196.208	30	6.540		
Total	937.243	35			

- e. Kesimpulan: H_0 ditolak, berarti terdapat perbedaan yang bermakna antar perlakuan pada hari ke-7.

4.4 Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-7

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

- b. Hipotesis :

H_0 = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus antara tujuh kelompok perlakuan

H_a = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus antara tujuh kelompok perlakuan

- c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti H_0 ditolak

Sig. > 0,05 berarti H_0 diterima

- d. Hasil:

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
kontrol normal	kontrol negatif	-14.33333 [*]	.000	-17.3488	-11.3179
	dosis 1	-11.50000 [*]	.000	-14.5154	-8.4846
	dosis 2	-11.83333 [*]	.000	-14.8488	-8.8179
	dosis 3	-10.16667 [*]	.000	-13.1821	-7.1512
	kontrol positif	-9.75000 [*]	.000	-12.7654	-6.7346
kontrol negatif	kontrol normal	14.33333 [*]	.000	11.3179	17.3488
	dosis 1	2.83333	.065	-.1821	5.8488
	dosis 2	2.50000	.101	-.5154	5.5154
	dosis 3	4.16667 [*]	.008	1.1512	7.1821
	positif	4.58333 [*]	.004	1.5679	7.5988
dosis 1	kontrol normal	11.50000 [*]	.000	8.4846	14.5154
	kontrol negatif	-2.83333	.065	-5.8488	.1821
	dosis 2	-.33333	.823	-3.3488	2.6821
	dosis 3	1.33333	.374	-1.6821	4.3488

	kontrol positif	1.75000	.245	-1.2654	4.7654
dosis 2	kontrol normal	11.83333*	.000	8.8179	14.8488
	kontrol negatif	-2.50000	.101	-5.5154	.5154
	dosis 1	.33333	.823	-2.6821	3.3488
	dosis 3	1.66667	.268	-1.3488	4.6821
	kontrol positif	2.08333	.169	-.9321	5.0988
dosis 3	kontrol normal	10.16667*	.000	7.1512	13.1821
	kontrol negatif	-4.16667*	.008	-7.1821	-1.1512
	dosis 1	-1.33333	.374	-4.3488	1.6821
	dosis 2	-1.66667	.268	-4.6821	1.3488
	kontrol positif	.41667	.780	-2.5988	3.4321
kontrol positif	kontrol normal	9.75000*	.000	6.7346	12.7654
	kontrol negatif	-4.58333*	.004	-7.5988	-1.5679
	dosis 1	-1.75000	.245	-4.7654	1.2654
	dosis 2	-2.08333	.169	-5.0988	.9321
	dosis 3	-.41667	.780	-3.4321	2.5988

- e. Kesimpulan: H_0 ditolak pada perbandingan antara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya; antara kontrol negatif dengan dosis III dan kontrol positif. Hal ini berarti pada hari ke-7 terdapat perbedaan bermakna antara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya; antara kontrol negatif dengan dosis III dan kontrol positif. Namun, tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kontrol positif dengan 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	.840	6	.129
	kontrol negatif	.996	6	.999
	dosis 1	.914	6	.462
	dosis 2	.964	6	.847
	dosis 3	.955	6	.781
	kontrol positif	.993	4	.972

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

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

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

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti H_0 ditolak

Sig. > 0,05 berarti H_0 diterima

d. Hasil:

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.302	5	28	.072

g. Kesimpulan: H_0 diterima, berarti data volume telapak kaki tikus terdistribusi homogen.

5.3 Uji analisis varians satu arah 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 :

H_0 = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus tiap kelompok perlakuan

H_a = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus tiap kelompok perlakuan

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti H_0 ditolak

Sig. > 0,05 berarti H_0 diterima

d. Hasil :

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	767.848	5	153.570	21.495	.000
Within Groups	200.042	28	7.144		
Total	967.890	33			

e. Kesimpulan: H_0 ditolak, berarti terdapat perbedaan yang bermakna antar perlakuan pada hari ke-14.

5.4 Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) 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 tujuh kelompok perlakuan

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

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil :

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
kontrol normal	kontrol negatif	-15.16667*	.000	-18.3278	-12.0056
	dosis 1	-11.50000*	.000	-14.6611	-8.3389
	dosis 2	-10.25000*	.000	-13.4111	-7.0889
	dosis 3	-8.50000*	.000	-11.6611	-5.3389
	kontrol positif	-7.83333*	.000	-11.3675	-4.2991
kontrol negatif	kontrol normal	15.16667*	.000	12.0056	18.3278
	dosis 1	3.66667*	.025	.5056	6.8278
	dosis 2	4.91667*	.004	1.7556	8.0778
	dosis 3	6.66667*	.000	3.5056	9.8278
	kontrol positif	7.33333*	.000	3.7991	10.8675
dosis 1	kontrol normal	11.50000*	.000	8.3389	14.6611
	kontrol negatif	-3.66667*	.025	-6.8278	-.5056
	dosis 2	1.25000	.425	-1.9111	4.4111
	dosis 3	3.00000	.062	-.1611	6.1611
	kontrol positif	3.66667*	.043	.1325	7.2009
dosis 2	kontrol normal	10.25000*	.000	7.0889	13.4111
	kontrol negatif	-4.91667*	.004	-8.0778	-1.7556

	dosis 1	-1.25000	.425	-4.4111	1.9111
	dosis 3	1.75000	.266	-1.4111	4.9111
	kontrol positif	2.41667	.172	-1.1175	5.9509
dosis 3	kontrol normal	8.50000*	.000	5.3389	11.6611
	kontrol negatif	-6.66667*	.000	-9.8278	-3.5056
	dosis 1	-3.00000	.062	-6.1611	.1611
	dosis 2	-1.75000	.266	-4.9111	1.4111
	kontrol positif	.66667	.702	-2.8675	4.2009
kontrol positif	kontrol normal	7.83333*	.000	4.2991	11.3675
	kontrol negatif	-7.33333*	.000	-10.8675	-3.7991
	dosis 1	-3.66667*	.043	-7.2009	-.1325
	dosis 2	-2.41667	.172	-5.9509	1.1175
	dosis 3	-.66667	.702	-4.2009	2.8675

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

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-21	kontrol normal	.840	6	.129
	kontrol negatif	.878	6	.259
	dosis 1	.793	6	.051
	dosis 2	.954	6	.772
	dosis 3	.887	6	.301
	kontrol positif	.993	4	.972

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

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

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

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti H_0 ditolak

Sig. > 0,05 berarti H_0 diterima

d. Hasil:

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.128	5	28	.369

e. Kesimpulan: H_0 diterima, berarti data volume telapak kaki tikus terdistribusi homogen.

6.3 Uji analisis varians satu arah 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 :

H_0 = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus tiap kelompok perlakuan

H_a = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap volume telapak kaki tikus tiap kelompok perlakuan

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti H_0 ditolak

Sig. > 0,05 berarti H_0 diterima

d. Hasil :

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1057.235	5	211.447	25.797	.000
Within Groups	229.500	28	8.196		
Total	1286.735	33			

e. Kesimpulan: H_0 ditolak, berarti terdapat perbedaan yang bermakna antar perlakuan pada hari ke-7.

6.4 Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) terhadap seluruh kelompok uji pada hari ke-21

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 tujuh kelompok perlakuan

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

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil :

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
kontrol normal	kontrol negatif	-17.83333*	.000	-21.2192	-14.4475
	dosis 1	-13.33333*	.000	-16.7192	-9.9475
	dosis 2	-12.66667*	.000	-16.0525	-9.2808
	dosis 3	-10.50000*	.000	-13.8859	-7.1141
	kontrol positif	-11.33333*	.000	-15.1188	-7.5478
kontrol negatif	kontrol normal	17.83333*	.000	14.4475	21.2192
	dosis 1	4.50000*	.011	1.1141	7.8859
	dosis 2	5.16667*	.004	1.7808	8.5525
	dosis 3	7.33333*	.000	3.9475	10.7192
	kontrol positif	6.50000*	.002	2.7145	10.2855
dosis 1	kontrol normal	13.33333*	.000	9.9475	16.7192
	kontrol negatif	-4.50000*	.011	-7.8859	-1.1141
	dosis 2	.66667	.690	-2.7192	4.0525
	dosis 3	2.83333	.098	-.5525	6.2192
	kontrol positif	2.00000	.288	-1.7855	5.7855
dosis 2	kontrol normal	12.66667*	.000	9.2808	16.0525
	kontrol negatif	-5.16667*	.004	-8.5525	-1.7808
	dosis 1	-.66667	.690	-4.0525	2.7192

	dosis 3	2.16667	.201	-1.2192	5.5525
	kontrol positif	1.33333	.477	-2.4522	5.1188
dosis 3	kontrol normal	10.50000*	.000	7.1141	13.8859
	kontrol negatif	-7.33333*	.000	-10.7192	-3.9475
	dosis 1	-2.83333	.098	-6.2192	.5525
	dosis 2	-2.16667	.201	-5.5525	1.2192
	kontrol positif	-.83333	.656	-4.6188	2.9522
kontrol positif	kontrol normal	11.33333*	.000	7.5478	15.1188
	kontrol negatif	-6.50000*	.002	-10.2855	-2.7145
	dosis 1	-2.00000	.288	-5.7855	1.7855
	dosis 2	-1.33333	.477	-5.1188	2.4522
	dosis 3	.83333	.656	-2.9522	4.6188

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

Lampiran 7. Uji statistik kadar kalsium tulang kaki tikus seluruh kelompok uji pada akhir perlakuan

7.1 Uji normalitas (Uji Shapiro-Wilk) terhadap kadar kalsium tulang kaki tikus seluruh kelompok uji pada akhir perlakuan

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

b. Hipotesis :

Ho = data kadar kalsium tulang kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi normal

Ha = data kadar kalsium tulang 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.
Kadar Ca	kontrol normal	.892	5	.368
	kontrol negatif	.951	5	.745
	dosis 1	.736	5	.022
	dosis 2	.893	5	.373
	dosis 3	.754	5	.032
	kontrol positif	.901	4	.434

e. Kesimpulan : Ho ditolak, berarti data kadar kalsium tulang kaki tikus tidak terdistribusi normal.

7.2 Uji Homogenitas (Uji Levene) terhadap kadar kalsium tulang kaki tikus seluruh kelompok uji pada akhir perlakuan

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

b. Hipotesis :

Ho = data kadar kalsium tulang kaki tikus berasal dari populasi yang terdistribusi homogen

H_a = data kadar kalsium tulang kaki tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi homogen

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti H_0 ditolak

Sig. > 0,05 berarti H_0 diterima

d. Hasil:

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.832	5	23	.540

e. Kesimpulan: H_0 diterima, berarti data kadar kalsium tulang kaki tikus terdistribusi homogen.

7.3 Uji Kruskal-Wallis terhadap kadar kalsium tulang kaki tikus seluruh kelompok uji pada akhir perlakuan

a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari kadar kalsium tulang kaki tikus tiap perlakuan

b. Hipotesis :

H_0 = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap kadar kalsium tulang kaki tikus tiap kelompok perlakuan

H_a = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap kadar kalsium tulang kaki tikus tiap kelompok perlakuan

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti H_0 ditolak

Sig. > 0,05 berarti H_0 diterima

d. Hasil :

	Kadar Ca
Chi-Square	15.123
df	5
Asymp. Sig.	.010

(lanjutan)

- e. Kesimpulan: H_0 ditolak, berarti terdapat perbedaan yang bermakna terhadap kadar kalsium tulang kaki tikus tiap kelompok perlakuan.

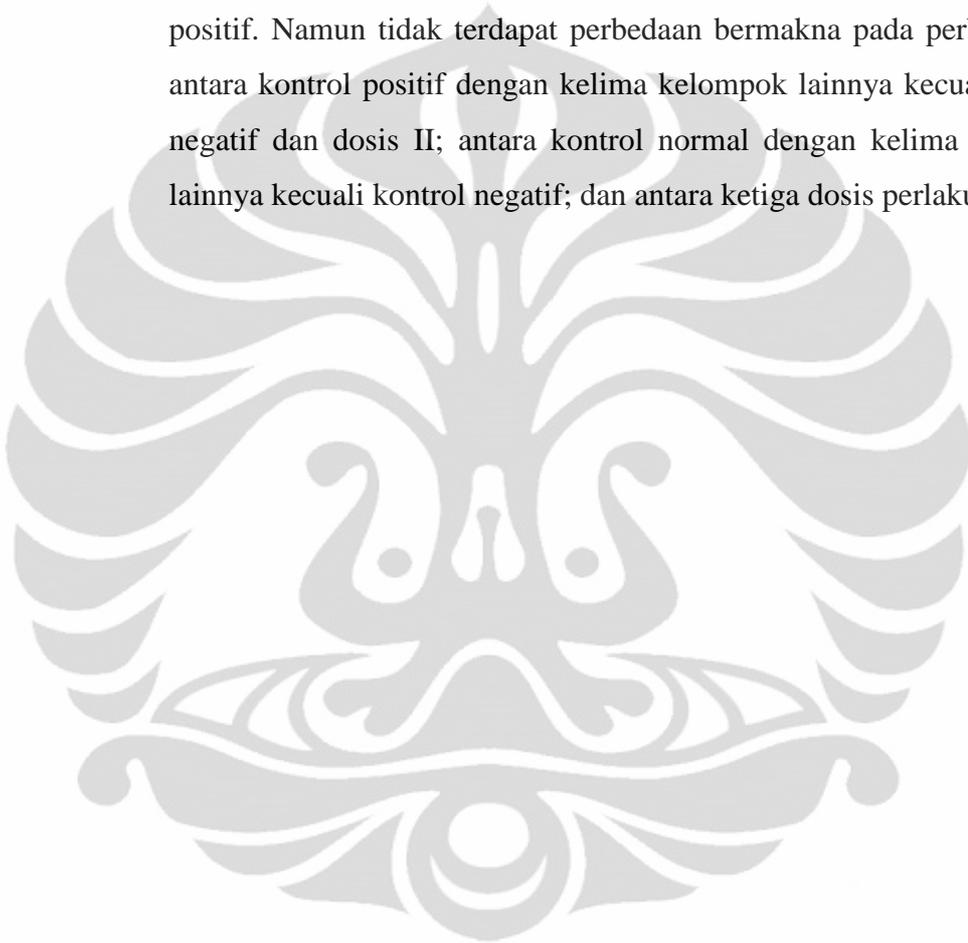
7.4 Uji Mann-Whitney terhadap kadar kalsium tulang kaki tikus seluruh kelompok uji pada akhir perlakuan

- a. Tujuan: untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari kadar kalsium tulang kaki tikus antara enam kelompok perlakuan
- b. Hipotesis:
 H_0 = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap kadar kalsium tulang kaki tikus antara enam kelompok perlakuan
 H_a = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap kadar kalsium tulang kaki tikus antara enam kelompok perlakuan
- c. Kriteria Uji :
 Sig. < 0,05 berarti H_0 ditolak
 Sig. > 0,05 berarti H_0 diterima
- d. Hasil :

Kelompok		Asymp. Sig (2-tailed)
Kontrol normal	Kontrol negatif	,009
	Dosis I	,754
	Dosis II	,251
	Dosis III	,754
	Kontrol positif	,142
Kontrol negatif	Dosis I	,009
	Dosis II	,016
	Dosis III	,016
	Kontrol positif	,014
Dosis I	Dosis II	,456
	Dosis III	,602
	Kontrol positif	,142
Dosis II	Dosis III	,530
	Kontrol positif	,050
Dosis III	Kontrol positif	,086

(lanjutan)

- e. Kesimpulan : H_0 ditolak pada perbandingan antara kontrol negatif dengan kelima kelompok lainnya; antara dosis II dengan kontrol positif. Hal ini berarti, pada pengukuran kadar kalsium tulang tikus terdapat perbedaan bermakna antar perlakuan kelompok kontrol negatif dengan kelima kelompok lainnya; antara dosis II dengan kontrol positif. Namun tidak terdapat perbedaan bermakna pada perbandingan antara kontrol positif dengan kelima kelompok lainnya kecuali kontrol negatif dan dosis II; antara kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya kecuali kontrol negatif; dan antara ketiga dosis perlakuan.



Lampiran 8. Sertifikat analisis natrium diklofenak dari PT. Kimia Farma

PT. KIMIA FARMA

Plant Jakarta
 KF Plant Jakarta Jl. Rawasalam V No.1 Kawasan Industri Pulausunda Jakarta Timur
 Phone : 021-4609354 Fax : 021-4603143

14 JAN 2011

Hasil Pemeriksaan Laboratorium

BAHAN BAKU

No. BTBS : GRA1-11000006 <i>1/11</i> Tgl. BTBS : 03/01/2011 Gudang / Lokasi : Plant Jakarta Bahan Nama Barang : 1000203 NATRII DIKLOFENAC	No. LA / HPL : QAJ1-11000006 ✓ Tgl. Sampling : 04/01/2011 Tgl. Mulai Periksa : 12/01/2011 Tgl. Selesai Periksa : 12/01/2011 Diperiksa Oleh : Putri Tgl. Periksa Ulang : 12/01/2012 MFD : 28/04/2010 ED : 28/04/2015 Pemasok : PT. GLOBAL CHEMINDO No. Batch/lot : DCS0410001
Merek/Produsen : Yung Zip Chemical Ind Co. Ltd, Taiwan Jumlah Barang : 11 Box @ 10 kg = 110 kg Jumlah Sample : 40 Gram 4 x 10 g (1 - 4) 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	Memenuhi Pengujian		USP 32
pH (1 % b/v dalam air)	7.27	7 - 8.5		USP 32 (MPP0008)
Susut Pengeringan (105 derajat C, 3 Jam)	0.08	< 0.5	%	USP 32
Kadar	100.04		%	USP 32
Kedar Terhadap Zet 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	Dra. Iridi, Mardoko Asman Pengawasan Mutu	<i>[Signature]</i>	13/1/11	
Approved by	Dra. Tia Mubandjati Manager Pemastian Mutu	<i>[Signature]</i>	13/1/11	

Lampiran 9. 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 10. Sertifikat determinasi tanaman jahe merah dari LIPI Cibinong



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(Research Center for Biology)

Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong
Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, 29 September 2011

Nomor : 1330/IPH.1.02/If.8/IX/2011
Lampiran : -
Perihal : Hasil identifikasi/ determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
Bpk./Ibu/Sdr(i). Nurul Fitriyah
Mhs. UI
Jakarta

Dengan hormat,

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

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Jahe Merah	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Zingiberaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,

Dr. Joeni Setiyo Rahajoe
NIP. 196706241993032004

D:\Ident 2011\Nurul Fitriyah.doc\JJA-DG

Page 1 of 1

Lampiran 11. Sertifikat Hewan Uji

	<p align="center">BAGIAN PRODUKSI TERNAK DAGING KERJA DAN ANEKA TERNAK DEPARTEMEN ILMU PRODUKSI DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN FAKULTAS PETERNAKAN INSTITUT PERTANIAN BOGOR</p>
	<p align="center">Sekretariat : Jl. Agatis, Kampus IPB, Dramaga, Bogor 16680 Telepon : (0251) 8624774, Fax. (0251) 8624774</p>
<p><u>SURAT KETERANGAN</u></p>	
<p>Yang bertanda tangan di bawah ini:</p>	
<p>Nama</p>	<p>: Prof. Dr. Ir. Pollung H. Siagian, MS</p>
<p>Jabatan</p>	<p>: Kepala Bagian Produksi Ternak Daging Kerja Dan Aneka Ternak</p>
<p>Alamat</p>	<p>: Jl. Agatis kampus IPB Darmaga-Bogor Telp. 0251-8624774, Fax. 0251-8624774</p>
<p>Menyatakan bahwa tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) strain <i>Sprague Dawley</i> (SD) yang dikembangkan di Laboratorium Non Ruminansia dan Satwa Harapan, Fakultas Peternakan IPB, telah memenuhi syarat sebagai hewan uji untuk penelitian atau kegiatan praktikum.</p>	
<p>Demikian surat keterangan ini dibuat dengan sebenar-benarnya.</p>	
<p align="right">Kepala,</p>	
<p align="right">  </p>	
<p align="right">Prof. Dr. Ir. Pollung H. Siagian, MS NIP. 19460825 197711 1 001</p>	

Lampiran 12. Skema kerja pelaksanaan uji antiartritis dan penetapan kadar kalsium

