



Pengaruh Pemberian Jus Jambu Biji (*Psidium Guajava L*), Terhadap Parameter Histopatologi Radang Kronik dan Ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor*: Studi Eksperimental Laboratorik pada *Adjuvant-Induced Arthritis* pada Tikus Wistar

Andika Eka Herlina *, Indra Wijaya *, Noor Wijayahadi **

ABSTRACT

The effect of Psidium guajava juice on the histopathologic chronic inflammation parameter and expression of vascular endothelial growth factor

Background: Poliphenol compound and vitamin C in *Psidium guajava L* has antioxidant, antiinflammation, and antiangiogenic effect. These effects work by inhibiting cytokine, MMP, and VEGF expression. Effects in chronic inflammation histopathological parameter and angiogenic component (VEGF) is not yet known. The objective of the study was to analyze the effect of *Psidium guajava L* juice on histopathological parameter of chronic inflammation (the depth of cartilage destruction, amount of mononuclear cell, amount of capillary vessel) and VEGF expression in adjuvant-induced arthritis Wistar rats.

Methods: It was an laboratory experimental with post test only control group design. Two groups of male Wistar rat, aged 3-4 month, were induced with CFA 0,1 ml twice. After booster on the seventh day, control group was given aquadest, and another group was given *Psidium guajava L* juice 9 g/15 ml per day, divided into 3 doses for 14 days. Histopathological parameter evaluation and VEGF expression was done in 10 fields view. All data were analysed by T-Test, with level of significant $p \leq 0.05$.

Result: The amount of mononuclear cell ($p=0.000$) and capillary vessel ($p=0.000$) in P group is significantly fewer than K group. The amount of capillary vessel with positive VEGF expression ($p=0.138$) and size of depth in cartilage destruction ($p=0.120$) shows no significance difference between two groups.

Conclusion: *Psidium guajava L* juice shows a lowering effect on histopathological parameter of chronic inflammation and VEGF expression in adjuvant-induced arthritis Wistar rats.

Keywords: *Psidium guajava L*, histopathology of chronic inflammation in arthritis, VEGF expression

ABSTRAK

Latar belakang: Senyawa polifenol dan vitamin C dalam buah *Psidium guajava L* memiliki efek antiinflamasi, antioksidan, dan antiangiogenik. Ketiga efek ini bekerja melalui penghambatan terhadap sitokin inflamasi, MMP, dan ekspresi VEGF. Efek terhadap parameter histopatologi radang kronik dan komponen angiogenesis (VEGF) pada arthritis belum diketahui.

Tujuan: Menganalisis pengaruh jus *Psidium guajava L* terhadap parameter histopatologi radang kronik berdasarkan ukuran kedalaman destruksi tulang rawan oleh panus, jumlah sel radang mononuklear, jumlah pembuluh darah kapiler dan ekspresi VEGF jaringan sendi adjuvant-induced arthritis tikus Wistar.

Metode: Jenis penelitian eksperimental laboratorik dengan desain post test only control group. Tikus Wistar jantan usia 3-4 bulan dibagi 2 kelompok, diinduksi CFA 0,1 ml 2 kali. Setelah hari ke-7 booster, kontrol diberi aquades, perlakuan diberi jus *Psidium guajava L* 9 g/15 ml per hari dibagi dalam 3 dosis selama 14 hari. Penilaian parameter histopatologi radang kronik dan ekspresi VEGF dilakukan manual dalam 10 lapangan pandang. Dilakukan uji beda T-Test dengan tingkat kemaknaan $p \leq 0,05$.

Hasil: Pada ukuran kedalaman destruksi tulang rawan, tidak ada perbedaan bermakna antara K dengan P ($p=0,120$). Jumlah sel radang mononuklear P lebih sedikit secara bermakna dibandingkan K ($p=0,000$). Jumlah pembuluh darah kapiler P lebih sedikit

* Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr.Kariadi, Jl. Dr. Sutomo 16-18 Semarang

** Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Jl. Prof. H. Soedarto, SH, Tembalang Semarang

secara bermakna dibandingkan K ($p=0,000$). Jumlah pembuluh darah dengan ekspresi VEGF positif tidak ada perbedaan bermakna antara K dengan P ($p=0,138$).

PENDAHULUAN

Arthritis rheumatoid (AR) merupakan suatu penyakit autoimun yang ditandai dengan terdapatnya sinovitis erosif simetrik, walaupun terutama mengenai jaringan persendian, seringkali juga melibatkan organ tubuh lainnya. Arthritis rheumatoid bersifat kronik progresif. Pengobatan bertujuan untuk menghilangkan gejala inflamasi (lokal maupun sistemik) serta mencegah terjadinya destruksi jaringan dan deformitas.¹⁻³

Pengobatan AR saat ini menggunakan kombinasi obat anti inflamasi non-steroid (OAINS) dengan *disease-modifying antirheumatic drugs* (DMARDs). Pengobatan ini bersifat jangka panjang, berpotensi menyebabkan efek samping yang mengganggu serta toksisitas lebih besar.¹ Terobosan yang dilakukan untuk mendapatkan senyawa terapi AR yang lebih baik telah dilakukan. Antibodi anti *tumor necrosis factor α* (anti-TNF α) merupakan pilihan terbaru. Obat ini telah melalui uji klinik, namun masih banyak pasien yang tidak responsif terhadap terapi ini.² Berbagai jenis senyawa terapi baru terus diteliti, namun masih pada tahapan penelitian eksperimental dengan hewan coba yang dikondisikan mengalami arthritis.²⁻⁸

Model tikus arthritis yang digunakan adalah tikus yang diinduksi dengan *complete Freund's adjuvant* (CFA), 0,1 ml di bagian ekor atau telapak kaki belakang, selama 7 hari akan muncul tanda klinis AR pada tikus.³⁻⁶ Beberapa peneliti lain menggunakan dua kali suntikan. Suntikan kedua merupakan *booster*.^{7,8}

Senyawa terapi AR yang sudah diteliti terhadap model hewan coba meliputi *tetrathiomolybdate* (senyawa anti inflamasi dan anti angiogenesis), dan senyawa anti inflamasi yang terdapat dalam *spirulina fusiformis*, Vitamin C 50 mg (senyawa anti oksidan dan anti inflamasi), dan jus jambu biji. Semuanya memberi hasil yang signifikan pada parameter klinis, serologis, maupun histologis.^{3,6-8}

Jambu biji adalah salah satu buah yang dikenal mengandung senyawa yang memiliki potensi anti inflamasi, anti oksidan dan anti angiogenik. Kandungan senyawa aktif tertinggi yang sudah diketahui dalam buah jambu biji adalah vitamin C (228,3 mg/100 g), likopen (5204 mcg/100 g) dan polifenol.^{9,10}

Kemampuan menurunkan kadar TNF- α dan ion nitrit serum oleh kandungan vitamin C dapat berperan penting dalam menghambat progresifitas AR karena menurunnya kadar sitokin dan mediator pro-inflamasi akan berdampak pada berkurangnya jumlah sel radang

Simpulan: Pemberian jus jambu biji (*Psidium guajava* L) berpengaruh memperbaiki beberapa parameter radang kronik pada tikus Wistar yang mengalami arthritis.

mononuklear di dalam stroma sinovium, dan mengurangi tingkat degradasi matriks ekstraseluler.¹¹

Peng CC dan kawan-kawan di tahun 2010 membuktikan bahwa fraksi polifenol daun jambu biji dapat menghambat ekspresi VEGF, IL-6, IL-8, MMP-2, dan MMP-9 pada sel kanker prostat. Hasil penelitian ini menggambarkan bahwa kandungan polifenol jambu biji memiliki efek anti-angiogenik dan anti-inflamasi.¹⁰ Kemampuan penghambatan ekspresi VEGF oleh polifenol diharapkan mampu menurunkan ekspresi VEGF endotel kapiler, yang nantinya juga akan berdampak pada menurunnya jumlah pembuluh darah kapiler di stroma. Penghambatan ekspresi IL-6 dan IL-8 diharapkan bekerja sinergi dengan kemampuan vitamin C sebagai senyawa anti inflamasi, sehingga jumlah sel radang mononuklear akan menurun. Sedangkan kemampuan penghambatan ekspresi MMP-2 dan MMP-9 oleh polifenol diharapkan mampu mengurangi tingkat degradasi matriks ekstraseluler, sehingga ketebalan panus berkurang dan meminimalisir terjadinya destruksi tulang rawan sendi.¹¹⁻¹³

Secara histopatologi, kelainan AR dapat dilihat pada beberapa parameter histopatologi radang kronik, yang meliputi adanya destruksi jaringan (dalam hal ini destruksi tulang rawan sendi oleh panus), sebaran sel radang mononuklear, dan peningkatan vaskularisasi akibat terbentuknya banyak pembuluh darah baru (pembuluh kapiler).^{1,12,13}

Penelitian sebelumnya belum melihat efek terapi jambu biji terhadap komponen angiogenesis dan parameter histopatologi radang kronik,⁸ maka penelitian ini akan melihat apakah perbaikan klinis dan serologis pada model tikus arthritis yang diterapi dengan jus jambu biji disebabkan adanya pengaruh terhadap komponen angiogenesis (VEGF) dan komponen proses radang kronik.

Hasil penelitian ini dapat menjadi bahan pertimbangan, maupun dasar bagi pengembangan penelitian buah jambu biji sebagai salah satu terapi tambahan dalam modalitas terapi radang kronik, khususnya arthritis rheumatoid, baik di tahap uji pre-klinis maupun uji klinis.

Tujuan penelitian ini adalah membuktikan pengaruh jus jambu biji (*Psidium guajava* L) terhadap parameter histopatologi radang kronik (ukuran kedalaman destruksi tulang rawan oleh panus, jumlah sel radang mononuklear, jumlah pembuluh darah kapiler) dan ekspresi *vascular endothelial growth factor* jaringan sendi *adjuvant-induced arthritis* tikus Wistar.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain *post test only control group*, dilakukan di LPPT Unit IV UGM Yogyakarta, Laboratorium Patologi Anatomi FK UGM Yogyakarta, dan Laboratorium Patologi Anatomi FK UNDIP Semarang selama 5 minggu mulai bulan Juni sampai Juli 2010. Jumlah sampel adalah 12 ekor tikus Wistar jantan usia 3-4 bulan, berat 150-250 g, dan tidak tampak abnormalitas anatomis luar. Kriteria eksklusi: tidak muncul pembengkakan pada telapak kaki depan setelah hari ke-7 *booster* imunisasi CFA intradermal di telapak kaki belakang atau mati selama penelitian berlangsung.

Induksi dilakukan pada semua kelompok penelitian setelah masa adaptasi. Tikus dibius umum agar mengurangi rasa sakit ketika diinjeksi. Dosis yang digunakan yaitu 0,1 ml CFA, diberikan 2 kali, yang pertama dilakukan dengan menyuntikkan 0,1 ml CFA intradermal di bagian ekor. Setelah 14 hari, diberikan suntikan kedua, dilakukan dengan menyuntikkan 0,1 ml CFA intradermal di kedua telapak kaki belakang, menggunakan jarum suntik 25-gauge, disuntikkan di antara jari kedua dan ketiga ke arah dorsal. Setelah 7 hari mulai diberikan perlakuan.^{5,7,8}

Jambu biji yang digunakan adalah jambu biji merah matang. Daging buah beserta kulit diblender tanpa air. Biji jambu direbus dan disaring untuk digunakan airnya sebagai tambahan volume jus jambu. Dosis jus jambu biji yang diberikan pada kelompok perlakuan adalah 9 g/15 ml air, secara per oral menggunakan sonde lambung, diberikan dalam 3 dosis setiap hari, selama 14 hari. Kelompok kontrol diberi aquades 15 ml/hari, dibagi dalam 3 dosis.

Seluruh tikus diterminasi pada hari ke-15. Sendi lutut salah satu kaki belakang tikus diambil untuk dibuat preparat patologi anatomi dan dinilai ukuran kedalaman destruksi tulang rawan, jumlah sel radang mononuklear di stroma sinovium, jumlah pembuluh darah kapiler di stroma sinovium dan jumlah pembuluh darah kapiler yang mengekspresikan VEGF. Gambaran ini dinilai oleh dua orang patolog secara *blind*, dengan pengecatan HE dan IHK VEGF, dilihat pada 10 lapangan pandang yang sama dengan perbesaran 100x dan 400x, menggunakan mikroskop Olympus® BX-51 dengan program komputer dotSlide®, dilihat pada layar 17".

Kedalaman destruksi tulang rawan oleh panus diukur dari permukaan panus terluar sampai dasar erosi terdalam, dilihat dengan perbesaran 100x/lapangan pandang kecil (LPK), diukur menggunakan penggaris biasa, pada layar komputer 17".

Jumlah sel radang mononuklear yang dihitung adalah banyaknya sel radang mononuklear (limfosit, monosit, histiosit, sel plasma, makrofag) yang terakumulasi di

sekitar pembuluh darah yang terbentuk di dalam stroma sinovium, dilihat dalam 10 lapangan pandang dengan perbesaran 400x/lapangan pandang besar (LPB).

Jumlah pembuluh darah kapiler yang dihitung adalah pembuluh darah kapiler (rongga yang dilapisi oleh endotel) yang ada di dalam stroma sinovium, dilihat dalam 10 lapangan pandang dengan perbesaran 400x/lapangan pandang besar (LPB) pada sediaan yang dilakukan pengecatan VEGF.

Eksresi VEGF positif yang dihitung adalah VEGF yang diekspresikan oleh sel endotel pembuluh darah yang ada di stroma sinovium, dengan pengecatan IHK antibodi anti-VEGF, dihitung dalam 10 lapangan pandang dengan perbesaran 400x/lapangan pandang besar (LPB).

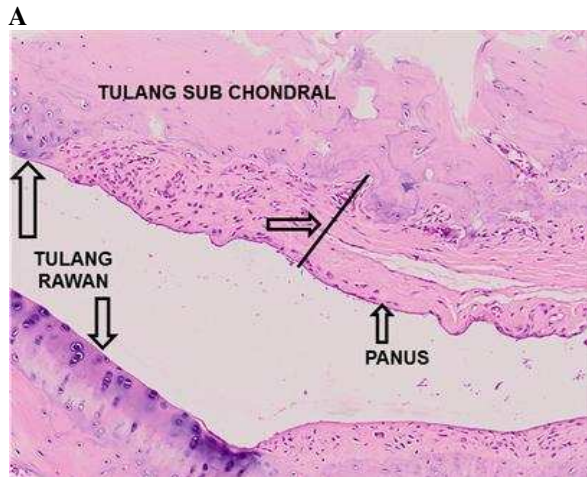
HASIL

Dua belas ekor tikus dibagi dalam 2 kelompok, kontrol dan perlakuan. Hasil penelitian terhadap parameter histopatologi radang kronik yang terdiri atas 3 variabel adalah sebagai berikut: (1) Ukuran kedalaman destruksi tulang rawan oleh panus pada jaringan sendi *adjuvant-induced arthritis* tikus Wistar menunjukkan hasil yang tidak berbeda bermakna antara kelompok kontrol dan perlakuan ($p=0,120$), meskipun diperoleh kecenderungan nilai yang lebih kecil pada kelompok perlakuan; (2) Jumlah sel radang mononuklear pada jaringan sendi *adjuvant-induced arthritis* tikus Wistar lebih sedikit secara bermakna pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol ($p=0,000$); (3) Jumlah pembuluh darah kapiler pada jaringan sendi *adjuvant-induced arthritis* tikus Wistar lebih sedikit secara bermakna pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol ($p=0,000$).

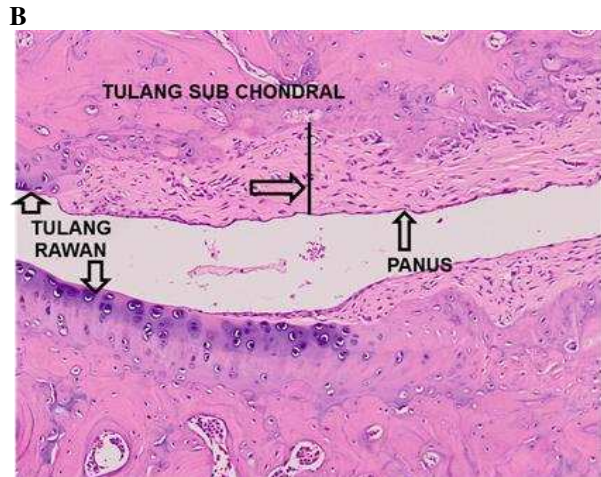
Hasil penelitian terhadap ekspresi VEGF oleh endotel pembuluh darah kapiler di stroma sinovium menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok ($p=0,138$), meskipun diperoleh kecenderungan nilai yang lebih kecil pada kelompok yang diberi perlakuan.

PEMBAHASAN

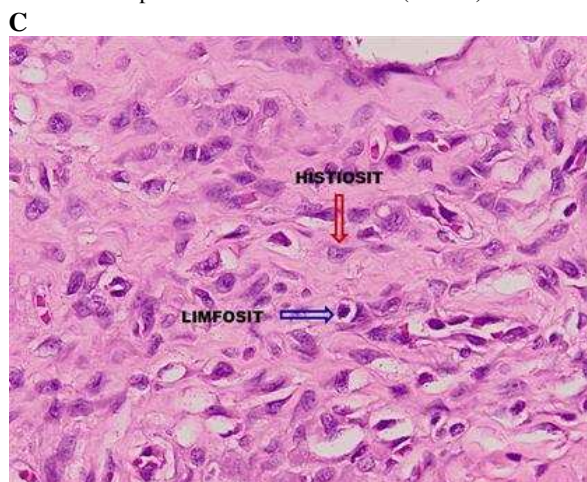
Jambu biji dengan nama latin *Psidium guajava* L diketahui memiliki kandungan polifenol dan vitamin C yang cukup tinggi dan senyawa tersebut mampu menghambat ekspresi VEGF, MMP, dan sitokin inflamasi.¹⁰⁻¹³ Efek penghambatan ini akan dilihat terhadap parameter histopatologi radang kronik yang terjadi pada *adjuvant-induced arthritis* tikus percobaan. Parameter tersebut meliputi: kedalaman destruksi tulang rawan, jumlah sel radang mononuklear, dan jumlah pembuluh darah kapiler yang terbentuk di dalam stroma sinovium.



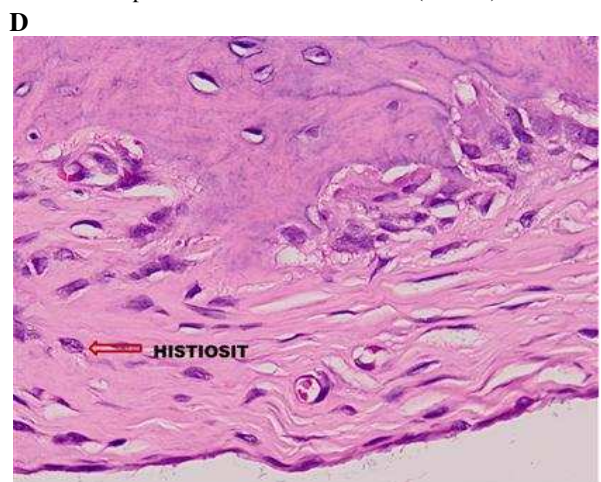
Gambar 1. Gambaran mikroskopis ukuran kedalaman destruksi tulang rawan. Pengecatan HE, pembesaran 100x. Kontrol (25 mm)



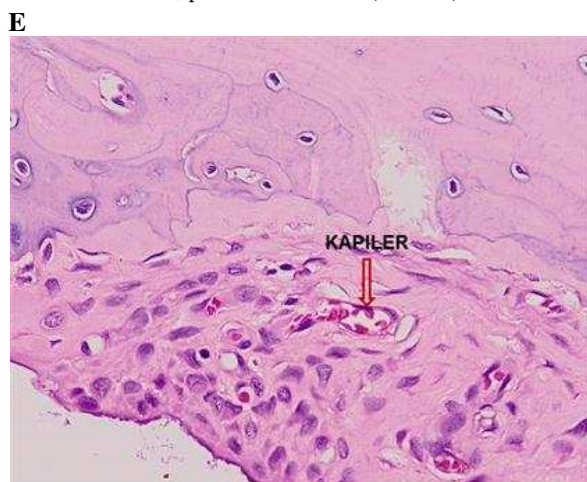
Gambar 2. Gambaran mikroskopis ukuran kedalaman destruksi tulang rawan. Pengecatan HE, pembesaran 100x. Perlakuan (18 mm)



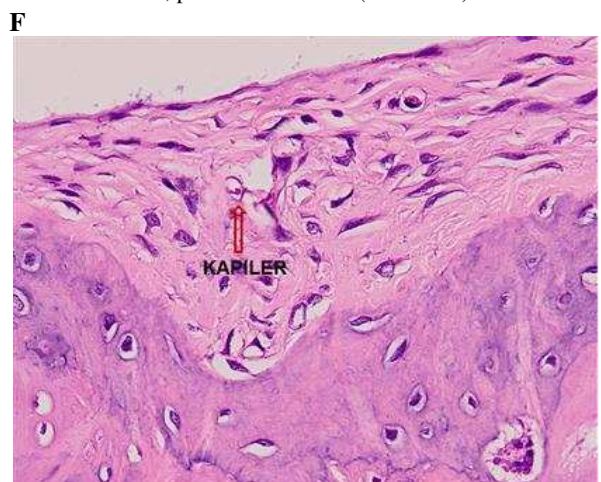
Gambar 3. Gambaran mikroskopik jumlah sel radang mononuklear di sekitar pembuluh darah yang terbentuk dalam stroma sinovium. Pengecatan HE, pembesaran 400x. (Kontrol)



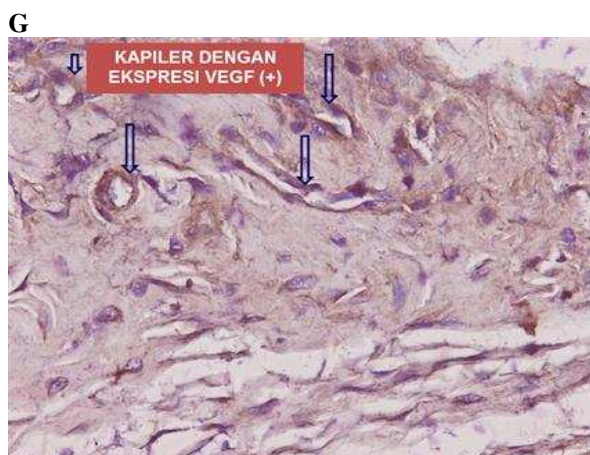
Gambar 4. Gambaran mikroskopik jumlah sel radang mononuklear di sekitar pembuluh darah yang terbentuk dalam stroma sinovium. Pengecatan HE, pembesaran 400x. (Perlakuan)



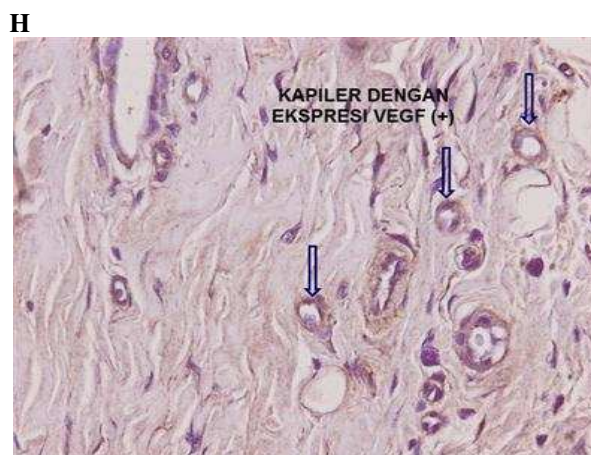
Gambar 5. Gambaran mikroskopik jumlah pembuluh darah kapiler yang terbentuk di dalam stroma sinovium. Pengecatan HE, pembesaran 400x. (Kontrol)



Gambar 6. Gambaran mikroskopik jumlah pembuluh darah kapiler yang terbentuk di dalam stroma sinovium. Pengecatan HE, pembesaran 400x. (Perlakuan)



Gambar 7. Gambaran mikroskopik pembuluh darah kapiler yang mengekspresikan VEGF (positif). Pengecatan IHC VEGF, pembesaran 400x. (Kontrol)



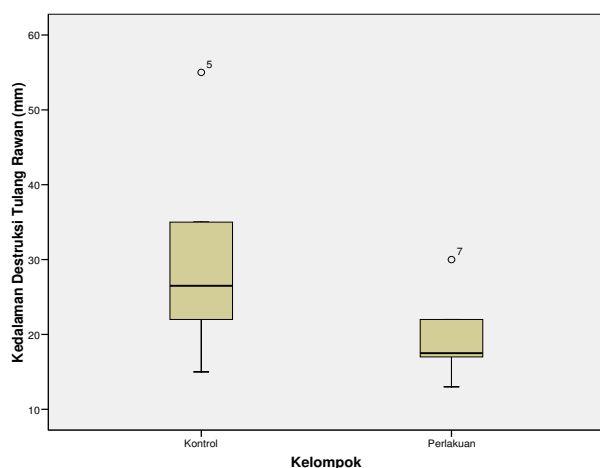
Gambar 8. Gambaran mikroskopik pembuluh darah kapiler yang mengekspresikan VEGF (positif). Pengecatan IHC VEGF, pembesaran 400x. (Perlakuan)



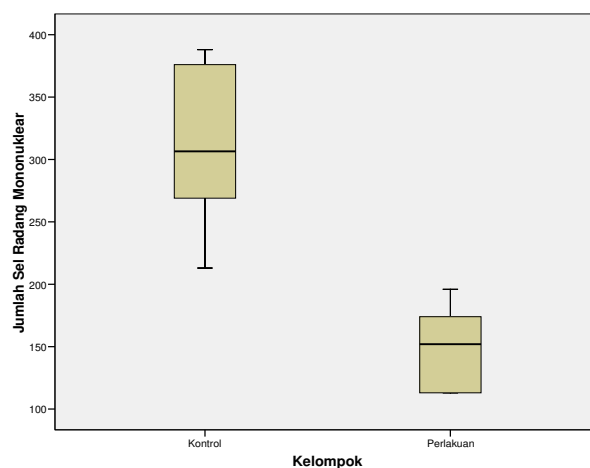
Gambar 9. Gambar telapak kaki belakang tikus normal (sebelum induksi)



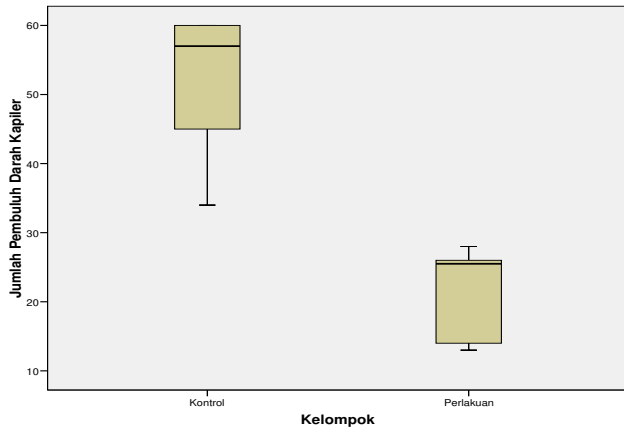
Gambar 10. Gambar telapak kaki belakang tikus setelah induksi



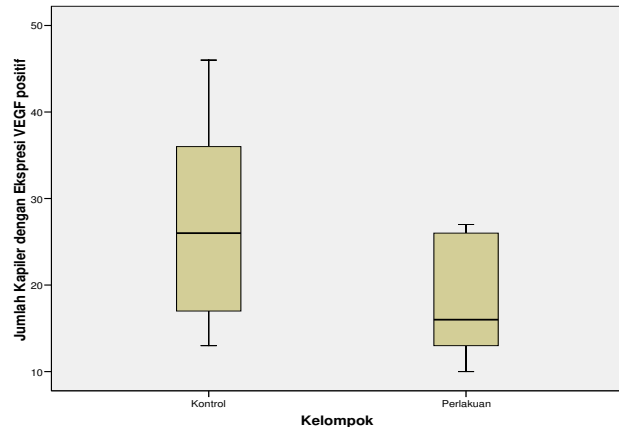
Gambar 11. Grafik box-plot ukuran kedalaman destruksi tulang rawan ($p=0,120$). Rerata $\pm$ SD kelompok kontrol ($30\pm 13,9$) dan perlakuan ($19,5\pm 5,9$).



Gambar 12. Grafik box-plot jumlah sel radang mononuklear di sekitar pembuluh kapiler stroma sinovium ($p=0,000$). Rerata $\pm$ SD kelompok kontrol ($309,8\pm 65,7$) dan perlakuan (150 ± 35).



Gambar 13. Grafik box-plot jumlah pembuluh darah kapiler di dalam stroma ($p=0,000$). Rerata $\pm$ SD kelompok kontrol ($52,2\pm 10,6$) dan perlakuan ($22\pm 6,7$).



Gambar 14. Grafik box-plot jumlah pembuluh darah kapiler dengan ekspresi VEGF positif ($p=0,138$). Rerata $\pm$ SD kelompok kontrol ($27,3\pm 12,3$) dan kelompok perlakuan ($18\pm 7,1$).

Destruksi tulang rawan oleh panus merupakan salah satu parameter histopatologi radang kronik pada arthritis yang dipengaruhi oleh banyak faktor, antara lain: komplemen, proses degradasi matriks ekstraseluler, dan pembentukan panus.¹² Polifenol dan vitamin C yang terkandung dalam jus *Psidium guajava L* diketahui bermanfaat menghambat terbentuknya faktor-faktor tersebut.^{7,8,10} Hasil penelitian ini menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna pada ukuran kedalaman destruksi tulang rawan oleh panus antara kelompok kontrol dengan perlakuan. Ada beberapa kemungkinan dari hasil penelitian terhadap variabel ini, yaitu pertama, jus *Psidium guajava L* dengan dosis dan lama pemberian tersebut mampu menghambat proses destruksi tulang rawan pada kelompok perlakuan (ditunjukkan oleh nilai pengukuran yang lebih kecil dari kontrol, namun belum bermakna secara statistik), namun tidak mampu memperbaiki kerusakan tulang rawan yang sudah terjadi. Kedua, jus *Psidium guajava L* dengan dosis dan lama pemberian tersebut tidak mampu menghambat proses destruksi tulang rawan, namun mampu memperbaiki kerusakan tulang rawan yang terjadi. Oleh karena itu didapatkan hasil pengukuran yang lebih kecil dibanding kontrol, namun tidak bermakna secara statistik. Ketiga, jus *Psidium guajava L* dengan dosis dan lama pemberian tersebut tidak optimal dalam menghambat proses destruksi tulang rawan dan memperbaiki kerusakan tulang rawan yang terjadi, sehingga hasil yang diperoleh tidak bermakna secara statistik walaupun menunjukkan angka yang lebih kecil. Keempat, pengambilan sampel jaringan yang kurang representatif (hanya diambil bagian tengah) bisa memberikan gambaran positif palsu ataupun negatif palsu. Penelitian ini hanya melihat gambaran histopatologi pada bagian medial/midline dari sendi lutut kaki belakang tikus.

Hasil penelitian ini menunjukkan jumlah sel radang mononuklear di stroma sinovium kelompok perlakuan lebih sedikit secara bermakna dibandingkan kelompok kontrol. Penurunan jumlah sel radang mononuklear pada kelompok perlakuan menunjukkan adanya penghambatan terhadap sitokin proinflamasi yang merupakan salah satu titik awal rangkaian proses peradangan yang terjadi pada arthritis.^{11-14,15} Sejalan dengan penelitian sebelumnya oleh Wiralis yang menunjukkan bahwa jus jambu biji dapat menekan kadar *nitric oxide* plasma tikus yang diberi jus jambu biji, namun dosis yang digunakan pada penelitian ini lebih besar dibanding yang sebelumnya.⁸

Proses angiogenesis pun menunjukkan hasil yang berbeda bermakna, di mana jumlah pembuluh darah kapiler dalam stroma sinovium kelompok perlakuan lebih sedikit secara bermakna dibanding kelompok kontrol. Penurunan jumlah pembuluh darah kapiler di dalam stroma sinovium menunjukkan adanya penghambatan terhadap berbagai faktor yang berperan dalam pembentukan pembuluh darah kapiler, antara lain: sitokin proinflamasi, degradasi matriks ekstraseluler, proliferasi sel sinovial, fibroblast, dan kondrosit, serta ekspresi VEGF (baik oleh endotel pembuluh darah maupun sel-sel sinovial).^{2,10,16-20}

Ekspresi VEGF oleh endotel pembuluh darah kapiler di stroma sinovium kelompok perlakuan tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol, meskipun didapatkan kecenderungan nilai yang lebih kecil pada kelompok perlakuan. Perbedaan yang tidak bermakna ini dapat menunjukkan efek penghambatan yang kurang optimal dari kandungan *Psidium guajava L* terhadap ekspresi VEGF oleh sel-sel endotel pembuluh darah yang ada di dalam stroma sinovium. Ketidakoptimalan

ini bisa disebabkan oleh dosis dan lama pemberian yang kurang adekuat, ataupun tidak optimalnya antibodi pendeteksi adanya ekspresi VEGF pada sel endotel.

SIMPULAN

Pemberian jus jambu biji (*Psidium guajava* L) per oral dengan dosis 9 g/15 ml per hari berpengaruh terhadap parameter histopatologi radang kronik (penurunan ukuran kedalaman destruksi tulang rawan, jumlah sel radang mononuklear, dan jumlah pembuluh darah kapiler stroma sinovium) dan ekspresi VEGF pembuluh darah kapiler pada jaringan sendi *adjuvant-induced arthritis* tikus Wistar.

SARAN

Penelitian lebih lanjut dengan waktu perlakuan yang lebih lama, variabel terikat yang lebih beragam dan berkaitan dengan proses angiogenesis, dan *labelling* terhadap jenis sel radang mononuklear untuk mengetahui dominasi yang muncul. Penelitian lanjutan untuk perbandingan efek terapi antara penggunaan ekstraksi senyawa aktif terbanyak dalam kandungan buah jambu biji dengan penggunaan buah jambu biji secara utuh.

DAFTAR PUSTAKA

1. Goronzy JJ, Weyand CM, editors. Current directions in autoimmunity, rheumatoid arthritis. Vol. 3. Basel: Karger; 2001.
2. Paleolog EM. Supplement review: Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002;4(suppl 3):S81-90.
3. Omoto A, Kawahito Y, Prudovsky I, Tubouchi Y, Kimura M, Ishino H. Copper chelation with tetrathiomolybdate suppresses adjuvant-induced arthritis and inflammation-associated cachexia in rats. *Arthritis Res Ther* 2005;7(6):R1174-R1182.
4. Fletcher DS, Widmer WR, Luell S, Christen A, Orevillo C, Shah S. Therapeutic administration of a selective inhibitor of nitric oxide synthase does not ameliorate the chronic inflammation and tissue damage associated with adjuvant-induced arthritis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;284(2):714-21.
5. Yongxiu H. Effect of oral administration of type collagen on adjuvant arthritis in rat and its mechanism and compare the effect with those of Chinese traditional medicine trypterygium polyglycosida and administration simillary. *Chin Med J* 2003;116(2):284-7.
6. Mahaboobkhan R, Prince SE, Balaji L. Anti-inflammatory effect of spirulina fusiformis on adjuvant-induced arthritis in mice. *Biol Pharmaceut Bull* 2006;29(12):2483-7.
7. Prabowo S. Pengaruh stressor dingin terhadap proses peradangan pada arthritis ajuvan [Online]. 2007 [cited 2009 Oct 7]. Available from: URL: <http://www.adln.lib.unair.ac.id/go.php?id=gdlhub-gdl-s3-2007-prabowosul-5263&width=400&PHPSESSID=6c1784a347f723a344115bf159462dcf>
8. Wiralis. Pengaruh pemberian jus jambu biji (*Psidium Guajava* L) terhadap volume kaki dan kadar ion nitrit adjuvant induced arthritis tikus wistar. *M Med Indones* 2009;43(4):188-96.
9. Widayawati G. Khasiat jambu biji (*Psidium guajava* Linn) [Online]. 2009 [cited 2009 Oct 7]. Available from: URL: <http://www.khasiat.wordpress.com/2009/01/17/jambu/>
10. Peng CC, Peng CH, Chen KC, Hsieh CL, Peng RY. The aqueous soluble polyphenolic fraction of *Psidium guajava* leaves exhibits potent anti-angiogenesis and anti-migration actions on DU145 cells. *eCAM* 2010;1-8.
11. Bingham III CO. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J Rheumatol* 2002;29(Suppl 65):3-9.
12. Rosenberg AE. Bones, joints, and soft tissue tumors. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, eds. Robbins and cotran pathologic basis of disease. 7th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.
13. Schumacher HR Jr, Klippel JH, Koopman WJ, eds. Primer on the rheumatic diseases. 10th edition. Georgia: Arthritis Foundation; 1993.
14. Sabath YN. Pengaruh pemberian per oral jus buah jambu biji delima, jambu biji manis, dan jambu biji bangkok terhadap permeabilitas vaskular mencit putih [Online]. 2006 [cited 2009 Oct 7]. Available from: URL: <http://www.adln.lib.unair.ac.id/go.php?id=gdlhub-gdl-s1-2006-sabathyoha-1555&PHPSESSID=633bf785c732727ac0e8305aaaa9ae3>
15. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011;365:2205-19.
16. Choy EHS, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001;344(12):907-16.
17. Oak MH, Bedoui JE, Schini-Kerth VB. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *J Nutr Biochem* 2005;16:1-8.
18. Paavonen K. Vascular endothelial growth factors and the Bmx tyrosine kinase in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. Helsinki University Biomedical [Online]. 2003 [cited 2009 Jan 7]. Available from: URL: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/laa/biola/vk/paavonen/vascular.pdf>
19. Koch AE. The role of angiogenesis in rheumatoid arthritis: recent development. *Ann Rheum Dis* 2000;59(suppl 1):i65-i71.
20. Venkatesha SH, Rajaiah R, Berman BM, Moudgil KD. Immunomodulation of autoimmune arthritis by herbal CAM. *eCAM* 2010;2011:1-13.