PENGARUH PEMBERIAN TERAPI OKSIGEN HIPERBARIK 2,4 ATA TERHADAP KADAR C-REACTIVE PROTEIN (CRP) DARAH MENCIT MODEL RHEUMATOID ARTHRITIS

Thalia Tamara ^{*)}, Hendrata Erry ^{*)}, Totot Mudjiono ^{**)}

^{*)} Fakultas Kedokteran Universitas Hang Tuah Surabaya

^{**)} Rumkital Dr. Ramelan Surabaya

E-mail : thaliatamara49@gmail.com

Abstract

Background: Rheumatoid Arthritis (RA) is an autoimmune disease with an increasing prevalence from year to year. RA mortality continues to increase in the last 1 decade due to the absence of effective prevention and therapy. Hyperbaric oxygen therapy can be an adjuvant therapy for Rheumatoid Arthritis.

Objective: This study uses Hyperbaric Oxygen Therapy to reduce the inflammatory reaction in patients with Rheumatoid Arthritis.

Method: Samples used are 16 male balb/c mice, divided into 2 groups, 1) group of induced experimental animals as models of Rheumatoid Arthritis 2) group of induced experimental animals as models of Rheumatoid Arthritis and given 3x30 minutes of 2.4 ATA hyperbaric oxygen therapy for 10 consecutive days. On 59th day, ELISA screening test is performed for C-Reactive Protein measurement.

Result: The average results of C-Reactive Protein levels between 2 groups, are, the group of mice with rheumatoid arthritis model that was not treated with HBO therapy had an average CRP level of 0.204 Pg / ml, while the group of mice with rheumatoid arthritis model which is treated with HBO therapy has a mean CRP level of 0.113 Pg / ml.

Conclusion: There is an effect of hyperbaric oxygen therapy to C-Reactive Protein level in mice with rheumatoid arthritis model.

Key words: Rheumatoid Arthritis, Hyperbaric Oxygen Therapy, C-Reactive Protein

Abstrak

Latar Belakang: Artritis Rheumatoid/ Rheumatoid Arthritis (RA) adalah suatu penyakit autoimun dengan prevalensi yang terus meningkat dari tahun ke tahun. Angka kematian RA terus meningkat dalam 1 dekade terakhir akibat belum ditemukannya pencegahan dan terapi yang efektif. Terapi oksigen hiperbarik bisa menjadi terapi adjuvant untuk penderita Rheumatoid Arthritis.

Tujuan: Penelitian ini menggunakan Terapi Oksigen Hiperbarik untuk mengurangi reaksi inflamasi pada penderita Rheumatoid Arthritis.

Metode: Sampel yang digunakan adalah Mice BALB/C jantan sebanyak 16 ekor yang dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu 1) kelompok mencit yang diinduksi menjadi model Rheumatoid Arthritis, 2) kelompok hewan coba yang diinduksi menjadi model Rheumatoid Arthritis dan diberikan terapi HBO 2,4 ATA 3x30 menit selama 10 hari berturut-turut. Pada hari ke-59 dilakukan pemeriksaan C-Reactive Protein menggunakan metode ELISA.

Hasil: Hasil rerata kadar C-Reactive Protein antara 2 kelompok yaitu, kelompok mencit model RA yang tidak diterapi HBO memiliki rerata kadar CRP 0.204 Pg/ml, sedangkan kelompok mencit model RA yang diterapi HBO memiliki rerata kadar CRP 0.113 Pg/ml.

Kesimpulan: Terdapat pengaruh terapi oksigen hiperbarik terhadap kadar C-Reactive Protein darah mencit model rheumatoid arthritis.

Kata kunci: Rheumatoid Arthritis, Terapi Oksigen Hiperbarik, *C-Reactive Protein*

Pendahuluan

Arthritis rheumatoid/ rheumatoid arthritis (RA) adalah suatu penyakit autoimun berupa inflamasi kronik yang utamanya terjadi pada tulang rawan sekitar sendi (Kumar et al., 2015). Penderita arthritis rheumatoid biasanya mengeluhkan nyeri sendi saat bangun pagi. Hal ini disebabkan adanya penebalan di bagian synovial sendi, sarung tendon, dan bursa yang diikuti dengan erosi tulang dan destruksi tulang disekitar sendi (Syamsuhidajat, 2010). Arthritis rheumatoid merupakan penyakit progresif yang dapat menimbulkan cacat permanen (Ledingham, Snowden and Ide, 2017).

Menurut Arthritis Foundation, sekitar 3% atau 1,5 juta orang dewasa di Amerika Serikat berusia 18 tahun atau lebih mengalami RA (Barr, 2015). Di negara maju prevalensi rheumatoid arthritis mencapai 0,5%-1% (Choy, 2012). Prevalensi RA di Indonesia sendiri lebih sedikit dibandingkan di Amerika dan Negara maju lainnya, yaitu hanya 0,1% (1 di antara 1000-5000 orang) (Nainggolan, 2009).

Sebenarnya penyebab pasti dari arthritis rheumatoid masih belum diketahui secara pasti hingga saat ini. Tetapi, peneliti meyakini faktor genetik dan lingkungan menjadi penyebab utama dari penyakit ini. Faktor genetik yang dapat menurunkan penyakit arthritis rheumatoid adalah ditemukannya perbedaan allele antigen leukosit manusia (HLA)-DRB1 pada penderita arthritis rheumatoid dengan ACPA positif (Gibofsky, 2014). Berbagai faktor lingkungan telah dikaitkan sebagai potensi pemicu RA, salah satunya adalah adanya hormon yang diproduksi

oleh wanita, dimana prevalensi RA pada wanita lebih tinggi daripada pada pria. Selain itu, rokok juga diduga sebagai pemicu RA (Gibofsky, 2014).

Meskipun kini, angka kematian pasien RA sudah menurun, namun tingkat mortalitas keseluruhan masih setinggi pada dekade terakhir. Menurut penelitian dalam 15 tahun terakhir, pasien dengan rheumatoid arthritis (RA) memiliki risiko kematian 54% lebih tinggi dibandingkan penyakit beresiko lainnya, seperti: penyakit jantung, pernafasan, dan sistem pencernaan (van den Hoek *et al.*, 2017). Kematian ini sering kali terjadi akibat peningkatan risiko infeksi yang dikarenakan menurunnya fungsi kekebalan tubuh pada pasien RA atau efek terapi immunosupresif.

Tujuan utama pengobatan arthritis rheumatoid adalah untuk mengurangi gejala dan menghentikan proses inflamasi pada sendi yang progresif. Terapi untuk mengurangi gejala seperti bengkak dan nyeri sering digunakan obat anti inflamasi non steroid (OAINS) seperti naproxen sodium, tetapi obat ini memiliki efek samping gangguan hati dan lambung. Terapi untuk mencegah inflamasi yang progresif digunakan obat DMARDs (Disease Modifying Anti Rheumatoid Drugs) yang dikombinasikan dengan kortikosteroid. Salah satu DMARDs yang paling sering digunakan adalah methotrexate. Methotrexate dapat mengganggu produksi sel darah oleh sumsum tulang (Rajnic *et al.*, 2017; Andisari, 2018). Methotrexate yang dikombinasikan dengan kortikosteroid dapat menyebabkan immunosupresif, sehingga mengakibatkan berbagai infeksi sekunder. Lebih dari 50% kematian pada pasien RA dikarenakan infeksi pada sistem respirasi (Widdifield *et al.*, 2018).

Terapi oksigen hiperbarik merupakan terapi dengan memberikan oksigen murni kepada pasien di dalam sebuah tabung (chamber) yang diberi tekanan lebih besar daripada permukaan laut (1 ATA). Mekanisme terapi ini melalui dua hal, yaitu hiperoksigenasi secara langsung ke dalam sel melalui difusi dan peningkatan tekanan hidrostatik. Hingga saat ini, terapi oksigen hiperbarik telah berhasil mengobati luka kronis seperti ulkus diabetikum (Van

Neck *et al.*, 2017), nekrosis jaringan lunak akibat radiasi, beberapa kondisi kekurangan oksigen, dan penyakit dekompresi. Selain indikasi tersebut, banyak data empiris dan eksperimental menunjukkan bahwa terapi hiperbarik dapat memberi manfaat pada penyakit autoimun dengan menekan imunitas, namun mekanisme dasarnya belum dipahami dengan baik. Oleh karena itu, dalam penelitian ini, saya ingin menyelidiki apakah terapi HBO dapat mencegah pengembangan inflamasi pada artritis rheumatoid.

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Kandang hewan coba ukuran 860 cm² dengan tinggi 12 cm, Tempat makan dan minum hewan coba, Timbangan, Gelas ukur, Kain flannel, Kapas, Spuit, Sample container, Animal chamber, Gunting, Stop watch untuk menghitung lama HBO, Mencit jantan (balb/c), mBSA, PBS, CFA, PTx, CII, IFA, Bahan pangan dry food 4-8 gr/hewan/hari dan minum 5-8 ml/hewan/hari.

Pembuatan Model Rheumatoid Arthritis

Sebanyak 16 mencit putih BALB/c terlebih ditimbang berat badannya, kemudian dilakukan injeksi 1 (100µg mBSA dalam 50 µLPBS yang diemulsikan dengan 50 µLCFA subkutan + 200ng PTx intraperitoneal), hari ke-7 dilakukan injeksi ke-2 (50µg mBSA, 100µgCII yang diemulsikan dengan 50 µLIFA subkutan + 200ng PTx intraperitoneal), hari ke-14 dilakukan injeksi ke-3 (50µg mBSA, 100µgCII dalam 50 µLPBS yang diemulsikan dengan 50 µLIFA subkutan + 200ng PTx intraperitoneal), hari ke-28 dilakukan injeksi ke-4 (50µg mBSA dilarutkan dalam 20 µLPBS dalam rongga sendi lutut kiri intraartikular) dan rongga sendi lutut kanan dilakukan injeksi (20 µLPBS intraartikular), dan hari ke 49 terbentuk ACIA kronis dan gejala inflamasi sendi lutut kiri.

Prosedur Penelitian

Setelah diaklimatisasi, tikus yang ditetapkan sebagai sampel dibagi secara acak menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol yaitu perlakuan model rheumatoid arthritis tanpa terapi oksigen hiperbarik. Kelompok Perlakuan model rheumatoid arthritis dengan terapi oksigen hiperbarik 2,4 ATA selama 3x30 menit selama 10 hari berturut-turut. Selanjutnya dilakukan pengambilan sampel darah tikus dilakukan setelah pembiusan. Darah pada mencit diambil langsung dari jantung menggunakan teknik cardiac puncture dengan spuit 5 ml dengan menggunakan jarum sebesar 22 G. CRP pada darah mencit diperiksa dengan metode ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*).

Hasil dan Diskusi

Tabel 1 Hasil CRP darah hewan coba yang dibuat model RA pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan

Variabel	No	Kelompok	
		K(+)	K(P)
Kadar CRP Darah Mencit (Pg/mL)	1	0.246	0.112
	2	0.133	0.136
	3	0.202	0.134
	4	0.095	0.109
	5	0.286	0.089
	6	0.202	0.119
	7	0.265	0.095

Keterangan: K(+): Kelompok mencit model RA yang tidak diterapi HBO
K(P): Kelompok mencit model RA yang diterapi HBO

Tabel 2 Gambaran nilai rerata dan standar deviasi kadar CRP darah hewan coba yang dibuat model RA pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan.

Kelompok	Rerata	Standar
	(Pg/ml)	Deviasi
Kontrol Positif	0.204	0.07
Perlakuan	0.113	0.018

Berdasarkan Tabel 2, maka dapat diketahui kelompok mencit model RA yang tidak diterapi HBO memiliki rerata kadar CRP 0.204 Pg/ml dan standar deviasi 0.070 Pg/ml. Sedangkan kelompok mencit model RA yang diterapi HBO memiliki rerata kadar CRP 0.113 Pg/ml dan standar deviasi 0.018 Pg/ml.

Tabel 3 Hasil uji normalitas data dengan Uji *Saphiro-Wilk*

Uji Normalitas			
Kelompok	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Kontrol Positif	0.937	7	0.610
Perlakuan	0.941	7	0.644

Keterangan hasil uji *Saphiro-Wilk*:

- Jika signifikansi $p > 0,05$ maka distribusi data normal
- Jika signifikansi $p < 0,05$ maka distribusi data tidak normal.

Berdasarkan Tabel 3, dapat diperoleh nilai signifikansi dari kelompok mencit model RA yang tidak diterapi HBO sebesar $p = 0,610$ ($p > 0,05$) dan nilai signifikansi kelompok mencit model RA yang diterapi HBO sebesar $p = 0,644$ ($p > 0,05$).

Hal ini menunjukkan bahwa kelompok mencit model RA yang tidak diterapi HBO dan kelompok mencit model RA yang diterapi HBO memiliki data berdistribusi normal. Sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa semua kelompok memiliki distribusi data normal, maka

selanjutnya dapat dilakukan perhitungan menggunakan statistik parametrik apabila hasil uji homogenitas data memiliki variasi homogen.

Tabel 4 Hasil uji homogenitas data dengan Uji *Lavene Statistic*

Uji Homogenitas			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6.181	1	12	0.029

Keterangan hasil uji *Lavene Statistic*:

- Jika signifikansi $p > 0,05$ maka variasi data homogen
- Jika signifikansi $p < 0,05$ maka variasi data tidak homogen.

Berdasarkan Tabel 5.4 dapat diperoleh nilai signifikansi variasi data sebesar $p = 0,029$ ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa variasi data tidak homogen karena syarat suatu data agar berdistribusi normal yaitu jika nilai signifikansinya $p > 0,05$. Oleh karena itu, dilanjutkan dengan uji non-parametrik dengan uji Mann Whitney U Test untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rerata diantara 2 kelompok.

Tabel 5 Hasil uji non-parametrik dengan uji Mann Whitney U Test

Uji Non-Parametrik	
	Nilai
Mann-Whitney U	7.500
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.029

Keterangan hasil uji *Mann Whitney U Test*:

- Jika signifikansi $p > 0,05$ maka H1 ditolak dan H0 diterima
- Jika signifikansi $p < 0,05$ maka H0 ditolak dan H1 diterima

Hipotesis statistika data uji *Mann Whitney U Test*:

- H0: Tidak terdapat perbedaan bermakna rerata kadar CRP darah antara kelompok mencit model RA yang tidak diterapi HBO dan kelompok mencit model RA yang diterapi HBO.
- H1: Terdapat perbedaan bermakna rerata kadar CRP darah antara kelompok mencit model RA yang tidak diterapi HBO dan kelompok mencit model RA yang diterapi HBO.

Berdasarkan hasil uji *Mann Whitney U Test* pada Tabel 5, diperoleh nilai signifikansi $p = 0,026$ ($p < 0,05$). Maka, H_0 ditolak dan H_1 diterima. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rerata kadar CRP darah antara kelompok mencit model RA yang tidak diterapi HBO dan kelompok mencit model RA yang diterapi HBO.

Jadi, terapi HBO dapat menurunkan CRP dengan menurunkan infiltrasi sel-sel inflamasi, salah satunya adalah monosit, melalui persinyalan HIF-1 α . Terapi HBO juga berpengaruh langsung pada sel monosit. Terapi HBO akan menurunkan pelepasan sitokin inflamasi oleh sel monosit, seperti IL-6 yang diperantarai oleh heme oxygenase-1 dan heat shock proteins. Maka, produksi CRP oleh sel hepatosit yang distimulasi oleh sitokin IL-6 juga akan menurun yang juga menandakan bahwa inflamasi telah berkurang. (Novak *et al.*, 2016 ; Thom, 2009).

Hal ini sesuai dengan dengan penelitian oleh Nuri Karadurmus *et al* pada tahun 2010 dengan menggunakan 28 pasien (11 wanita dan 17 pria) yang telah mengalami diabetes melitus tipe 2 selama 5 tahun dan telah mengalami ulkus kaki diabetikum kronis tingkat 2-4 menurut skala Wagner. Pasien diberikan terapi HBO sebanyak 30 sesi, dimana dalam 1 minggu dilakukan 5 sesi. Dalam 1 sesi, terapi HBO diberikan selama 105 menit dan menggunakan tekanan 2,4 ATA. Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan rata-rata hs-CRP pasien sebelum diberikan terapi HBO adalah 4.4 ± 1.3 mg/dL. Kadar hs-CRP menurun secara signifikan setelah diberikan terapi HBO selama 30 sesi dengan rata-rata 1.6 ± 0.7 mg/dL. (Karadurmus, 2010).

Penelitian selanjutnya dilakukan oleh Na Li *et al* pada tahun 2017 dengan menggunakan 39 pasien (28 wanita dan 11 pria) yang telah diabetes tipe 2 berdasarkan China Guideline for Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes dan mengalami ulkus kaki diabetikum tingkat 2 dan 3 berdasarkan skala Wagner. Terapi HBO diberikan selama 5 minggu dengan tekanan 243 kPA selama 70 menit. Hasil penelitian menunjukkan penurunan

kadar CRP dari 4.31 ± 1.65 mg/dL menjadi 1.31 ± 0.42 mg/dL setelah diberikan terapi HBO dan kadar IL-6 menurun dari 67.58 ± 12.24 pg/L menjadi 53.68 ± 8.28 pg/L. (Li *et al.*, 2017).

Terapi HBO meningkatkan saturasi oksigen dan jaringan yang juga akan meningkatkan produksi reactive oxygen species (ROS) dan reactive nitrogen species (RNS). Keadaan hipoksia saat terjadi inflamasi disertai dengan peningkatan ROS/RNS dapat menginduksi hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1 α). Pensinyalan HIF-1 α yang aktif juga akan mengarah ke ekspresi mRNA Catalase (CAT) dan Glutathione peroxidase 1 (GPx1) yang lebih tinggi sehingga mengurangi stres oksidatif. HIF-1 α mengurangi injuri jaringan oksidatif melalui penurunan adhesi neutrofil, monosit, dan limfosit serta infiltrasi ke jaringan inflamasi. (Novak *et al.*, 2016).

Efek terapi HBO pada monosit / makrofag sebagai dasar berkurangnya kadar sitokin yang bersirkulasi setelah stres oksidatif, seperti yang disebutkan di atas. Mekanisme biomolekular dalam monosit ini belum diketahui secara pasti, tetapi diduga diperantarai oleh protein heme oxygenase-1 dan heat shock proteins (HSP; seperti, HSP70). (Thom, 2009).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisis data, terdapat perbedaan yang bermakna rerata kadar CRP darah antara kelompok mencit model RA yang tidak diterapi HBO dengan kelompok mencit model RA yang diterapi HBO. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ada pengaruh pemberian terapi HBO tekanan 2,4 ATA selama 3x30 menit 10 hari berturut-turut terhadap kadar *C-Reactive Protein* (CRP) darah mencit BALB/c model Rheumatoid Arthritis.

Referensi

- Andisari, H.E., 2018. Recent Therapeutics Policies of Arthritis Rheumatoid (part I). *Oceana Biomedicina Journal*, 1(1), pp.12-24.
- Gibofsky, A. (2014) 'Epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis: A Synopsis', *Am. J. Manag. Care*, 20(7 Suppl), pp. S128----35.
- van den Hoek, J. *et al.* (2017) 'Mortality in patients with rheumatoid arthritis: a 15-year

- prospective cohort study', *Rheumatology International*. Springer Berlin Heidelberg, 37(4), pp. 487–493. doi: 10.1007/s00296-016-3638-5.
- Karadurmus, N. (2010) 'Potential benefits of hyperbaric oxygen therapy on atherosclerosis and glycaemic control in patients with diabetic foot Korzystny wpływ leczenia tlenem w komorze hiperbarycznej na czynniki ryzyka miażdżycy i kontrolę glikemii u chorych z zespołem stopy cu', 61(3), pp. 275–279.
- Ledingham, J., Snowden, N. and Ide, Z. (2017) 'Diagnosis and early management of inflammatory arthritis', *Bmj*, p. j3248. doi: 10.1136/bmj.j3248.
- Li, N. *et al.* (2017) 'Wound healing process and related laboratory indexes in patients with type 2 diabetes mellitus after hyperbaric oxygen intervention .', 28(20), pp. 9005–9010.
- Nainggolan, E. (Puslitbang B. dan F. B. P. dan P. K. and Kesehatan, D. K. R. (2009) *Prevalensi dan Determinan Penyakit Rematik di Indonesia, Majalah Kedokteran Indonesia*.
- Van Neck, J. W. *et al.* (2017) 'Hyperbaric oxygen therapy for wound healing in diabetic rats: Varying efficacy after a clinically-based protocol', *PLoS ONE*, 12(5), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0177766.
- Novak, S. *et al.* (2016) 'Anti-Inflammatory Effects of Hyperbaric Oxygenation during DSS-Induced Colitis in BALB / c Mice Include Changes in Gene Expression of HIF-1 α , Proinflammatory Cytokines , and Antioxidative Enzymes', 2016. doi: 10.1155/2016/7141430.
- Rajnic, P. *et al.* (2017) 'iMedPub Journals The Hematologic Toxicity of Methotrexate in Patients with Autoimmune Disorders Keywords: Case Reports Patient ' s characteristics', pp. 1–6.
- Thom, S. R. (2009) 'Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy', pp. 988–995. doi: 10.1152/jappphysiol.91004.2008.
- Widdifield, J. *et al.* (2018) 'Causes of death in rheumatoid arthritis: How do they compare to the general population?', *Arthritis Care & Research*, pp. 0–2. doi: 10.1002/acr.23548.