

ARTIKEL PENELITIAN

Peran Ekstrak *Sargassum duplicatum* terhadap Penurunan Edema Sendi Pergelangan Kaki Tikus dengan Artritis Ajuvan yang Terpapar Stresor Dingin

Fitri Handajani,* Sulistiana Prabowo

Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Hang Tuah, Surabaya, Indonesia

*Corresponding author: fitrihandajanidr@gmail.com

Diterima 11 Maret 2019; Disetujui: 8 Agustus 2019

DOI: 10.23886/ejki.7.10733.

Abstrak

Stresor dingin meningkatkan proses peradangan karena peningkatan produksi reactive oxygen species (ROS). *Sargassum duplicatum* mengandung antioksidan seperti polifenol (flavonoid dan flortanin) dan fukosantin. Tujuan penelitian ini mengetahui peran ekstrak *S. duplicatum* (ESD) dalam mengurangi edema dan menghambat ekspresi MMP-3 di sendi pergelangan kaki tikus dengan artritis ajuvan (AA) yang terpapar stresor dingin. Penelitian dilakukan pada bulan Januari - Februari tahun 2017 di Laboratorium Biokimia unit hewan coba Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang. Digunakan 30 tikus AA jantan usia 10-12 minggu yang dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok yang tidak mendapat perlakuan, kelompok yang dipaparkan stresor dingin, dan kelompok yang diberi ekstrak ESD 400 mg/kg BB/hari per oral selama 21 hari serta dipaparkan stresor dingin. Tebal sendi pergelangan kaki tikus diukur dengan kaliper dan ekspresi MMP-3 dengan metode imunohistokimia. Hasil uji anova menunjukkan kelompok tikus yang mendapatkan stresor dingin mengalami ketebalan sendi yang berbeda bermakna dengan kelompok tikus tanpa perlakuan ($p=0,042$) dan pemberian *S. duplicatum* menurunkan edema kaki tikus ($p=0,001$) secara bermakna jika dibandingkan kelompok yang hanya mendapat stresor dingin. *S. duplicatum* menurunkan secara bermakna jumlah sel yang mengekspresi MMP-3 di sendi pergelangan kaki tikus yang mendapatkan stresor dingin ($p=0,001$). Stresor dingin dapat menimbulkan edema di pergelangan kaki tikus model AA dan pemberian ekstrak *S. duplicatum* menurunkan edema secara bermakna serta menghambat ekspresi MMP-3 pada tikus model AA

Kata kunci: *Sargassum duplicatum*, artritis ajuvan, MMP-3, stresor dingin.

The Role of *Sargassum duplicatum* Extract to Inhibit Ankle Joint Edema in Adjuvant Arthritic Rat Exposed to Cold Stress

Abstract

Cold stress increase inflammatory process caused by increasing reactive oxygen species (ROS) production. *S. duplicatum* contains antioxidants, e.g. polyphenols (flavonoids and phlorotannin). The aim of this research was to show the role of *S. duplicatum* extract (ESD) to decrease ankle joint edema and inhibit MMP-3 expression in adjuvant arthritic rats (AA) exposed to cold stress. This research was conducted on January - April 2017 in Experimental Animal Unit, Biochemistry Laboratory, Faculty of Mathematics and Science, Brawijaya University, Malang. Thirty male AA rats were used and divided into three groups, i.e group without treatment, group exposed to cold stress, and group that was given ESD 400 mg/kgbw/day per oral for 21 days and exposed to cold stress. The thick of rat's ankle joint was measured by caliper and MMP-3 expression was measured by immunohistochemistry. The results of anova test showed that there was significant different the thick of rat's ankle joint between group of rats received cold stress and group of rats without treatment ($p=0,042$), and giving *S. duplicatum* reduced rat's ankle edema significantly ($0,001$) compared to group of rats that only exposed to cold stress. *S. duplicatum* reduced significantly the sum of cells that expressed MMP-3 in rat's ankle joint exposed to cold stress ($p=0,001$). Cold stress caused rat's ankle joint edema in rat AA model and *S. duplicatum* administration reduced edema and inhibited MMP-3 expression significantly in rat AA model.

Keywords: *Sargassum duplicatum*, adjuvant arthritis, MMP-3, cold stress.

Pendahuluan

Arthritis rematoid merupakan penyakit autoimun dan berhubungan dengan kecacatan progresif, komplikasi sistemik, kematian dini dan membutuhkan biaya sosial ekonomi yang tinggi. Penyakit tersebut ditandai dengan produksi autoantibodi (faktor rheumatoid dan *anti-citrullinated protein antibody*/ACPA), peradangan sinovial, hiperplasia tulang rawan, dan destruksi tulang.^{1,2} Insiden arthritis rematoid sekitar 0,1-0,2 per 1000 populasi untuk laki-laki dan 0,2-0,4 per 1000 untuk perempuan dengan prevalensi tertinggi di kelompok usia 45-75 tahun.¹ Di negara industri, arthritis rematoid memengaruhi 0,5-1% orang dewasa dengan 5-50 per 100.000 kasus baru setiap tahun. Arthritis rematoid yang tidak diterapi dengan baik menyebabkan kerusakan sendi, kecacatan, penurunan kualitas hidup, komplikasi kardiovaskuler, serta komorbiditas lainnya.^{3,4}

Penelitian Prabowo⁵ menunjukkan bahwa stresor dingin meningkatkan proses peradangan dengan meningkatkan *Interleukin-β1* (IL-β1), IL-2, *tumor necrosis factor-α* (TNF-α) di plasma dan jaringan sendi. Stresor dingin meningkatkan proses peradangan akibat peningkatan produksi *reaktive oxygene spesies* (ROS) untuk mempertahankan suhu tubuh. ROS akan mengaktifkan *nuclear factor-κB* (NF-κB) sehingga meningkatkan produksi sitokin dan *matrix metalloproteinase* (MMPs). MMPs ini berhubungan dengan edema dan kerusakan sendi pada penderita arthritis rematoid.^{5,6}

MMP-3 merupakan proteolitik enzim yang mampu mendegradasi kolagen tipe II, III, IV, IX dan X, proteoglikan, fibronectin, laminin dan elastin. MMP-3 disekresi dalam bentuk inaktif dan diaktivasi oleh peningkatan kadar pro-oksida, peningkatan kadar reaktif oksigen spesies dan enzim proteolitik lain.⁶ MMP-3 dihasilkan dan diaktivasi di sendi yang mengalami peradangan dan dilepaskan ke peredaran darah. Kadar MMP-3 sistemik menggambarkan sintesis MMP-3 lokal. Pada serum penderita arthritis rematoid terjadi peningkatan kadar MMP-3 yang dapat digunakan sebagai marker untuk mengetahui efektivitas terapi antirematik. Aktivitas penyakit pada penderita arthritis rematoid berhubungan dengan konsentrasi kadar MMP-3 dalam serum penderita.⁷

Terapi arthritis rematoid menggunakan *non steroid anti inflammatory drugs* (NSAIDs), *biologic agent* dan *drug modified rheumatoid arthritis disease*. Obat tersebut belum memberikan hasil yang memuaskan dan mahal sehingga perlu dilakukan penelitian menggunakan bahan alami sebagai obat. Indonesia menghasilkan rumput

laut atau alga dalam jumlah banyak. Rumput laut mengandung berbagai komponen bioaktif seperti anti-inflamasi dan anti-oksida. Aktivitas antioksidan dalam rumput laut coklat (*Sargassum sp*) adalah komponen polifenol (flavonoid dan phlorotanin) dan fukosantin.^{8,9} Aulanni'am et al⁹ melaporkan bahwa rumput laut coklat (*S. duplicatum bory*) mampu meredam radikal bebas di hewan model *inflammatory bowel disease*.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji efek *S. duplicatum* dalam mengurangi edema sendi dan penurunan MMP-3 di tikus model arthritis ajuvan yang dipajankan stresor dingin.

Metode

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental laboratoris yang dilakukan di Laboratorium Biokimia Unit Hewan Coba Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Januari - Februari tahun 2017. Penelitian dilakukan sesuai Etik Penelitian yang berlaku di Universitas Brawijaya Malang (Keterangan Kelaikan Etik No. 326-KEP-UB). Digunakan 30 ekor tikus putih galur Wistar. Tikus dibuat menjadi arthritis (disebut arthritis ajuvan) dengan injeksi 0,1 ml *complete freund's adjuvant* (CFA) intradermal di pangkal ekor tikus dan diberikan *booster* 14 hari kemudian secara intradermal di kaki kanan dan kiri. Tikus dibagi 3 kelompok yaitu kelompok 1 merupakan tikus AA yang tidak mendapat perlakuan; kelompok 2 adalah tikus AA yang dipajankan stresor dingin dengan dimasukkan ke ruangan 5°C selama 15 menit setiap hari selama 7 hari berturut-turut mulai pada hari ke-8; kelompok ketiga adalah tikus arthritis ajuvan yang diberi ekstrak *S. duplicatum* dosis 400 mg/kgBB per oral selama 21 hari, dan pada hari ke-8 dipajankan stresor dingin dengan dimasukkan ke *cold chamber* 5°C selama 15 menit setiap hari selama 7 hari.⁵ Pada akhir penelitian dilakukan pengukuran edema dan pemeriksaan imunohistokimia MMP-3 di sendi pergelangan kaki tikus. Edema sendi pergelangan kaki tikus kanan dan kiri diukur menggunakan kaliper. Pemeriksaan imunohistokimia menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400X. Pengamatan dilakukan pada 4 lapangan penghitungan dengan menghitung jumlah sel positif per lapangan perhitungan.¹¹

S. duplicatum dibersihkan, dipotong kecil-kecil dan dikeringkan sampai kandungan air mencapai 20-30%. *S. duplicatum* ditimbang 116 gram dan diekstraksi secara maserasi dengan 1,5 L etanol 85% selama 2 hari. Ekstrak disaring untuk mendapatkan

konsentrat filtrat dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C (± 2 jam). Setelah menjadi pekat, ekstrak dicuci dengan 100 ml kloroform sebanyak 3 kali. Fraksi etanol diambil dan dikeringkan dengan gas N₂ menjadi ekstrak dalam bentuk pasta dengan berat kurang lebih 3% dari berat segar.¹⁰

Data dianalisis dengan uji anova yang dilanjutkan dengan uji *least square difference* menggunakan perangkat lunak SPSS versi 20.0 dan $p < 0,05$ dianggap bermakna.

Hasil

Rerata dan simpang baku tebal sendi pergelangan kaki tikus di kelompok 3 lebih kecil dibandingkan kelompok lainnya (Tabel 1). Hasil uji anova menunjukkan perbedaan bermakna tebal pergelangan sendi kaki tikus antara kelompok tikus arthritis ajuvan yang tidak mendapat perlakuan dengan kelompok tikus arthritis ajuvan yang terpajan stresor dingin ($p = 0,042$). Terdapat perbedaan

bermakna tebal sendi pergelangan sendi kaki tikus antara kelompok tikus arthritis ajuvan yang terpajan stresor dingin dengan kelompok tikus arthritis ajuvan yang terpajan stresor dingin dan diberi ekstrak *S. duplicatum* ($p = 0,001$). Tebal pergelangan sendi kaki tikus berbeda bermakna pada kelompok tikus arthritis ajuvan yang tidak mendapat perlakuan dengan kelompok tikus arthritis ajuvan yang terpajan stresor dingin dan diberi ekstrak *S. duplicatum* ($p = 0,002$). Perbedaan ketebalan kaki tikus di ketiga kelompok dapat dilihat di Gambar 1.

Tabel 1. Rerata Tebal Sendi Pergelangan Kaki Tikus

Kelompok	Rerata $\pm$ Simpang Baku (cm)
1	0,79 $\pm$ 0,088
2	0,90 $\pm$ 0,133
3	0,61 $\pm$ 0,120



Gambar 1. Perbedaan Ukuran Kaki Tikus

A. Kaki tikus arthritis ajuvan yang tidak mendapat perlakuan. **B.** Kaki tikus arthritis ajuvan yang mendapat stresor dingin. **C.** Kaki tikus arthritis ajuvan yang mendapat stresor dingin dan diberi ekstrak *S. duplicatum*

Rerata dan simpang baku jumlah sel yang mengekspresi MMP-3 dengan metode imunohistokimia di sendi pergelangan kaki tikus pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil uji anova menunjukkan perbedaan bermakna jumlah sel yang mengekspresi MMP-3 dengan metode imunohistokimia di sendi pergelangan kaki tikus antara kelompok tikus

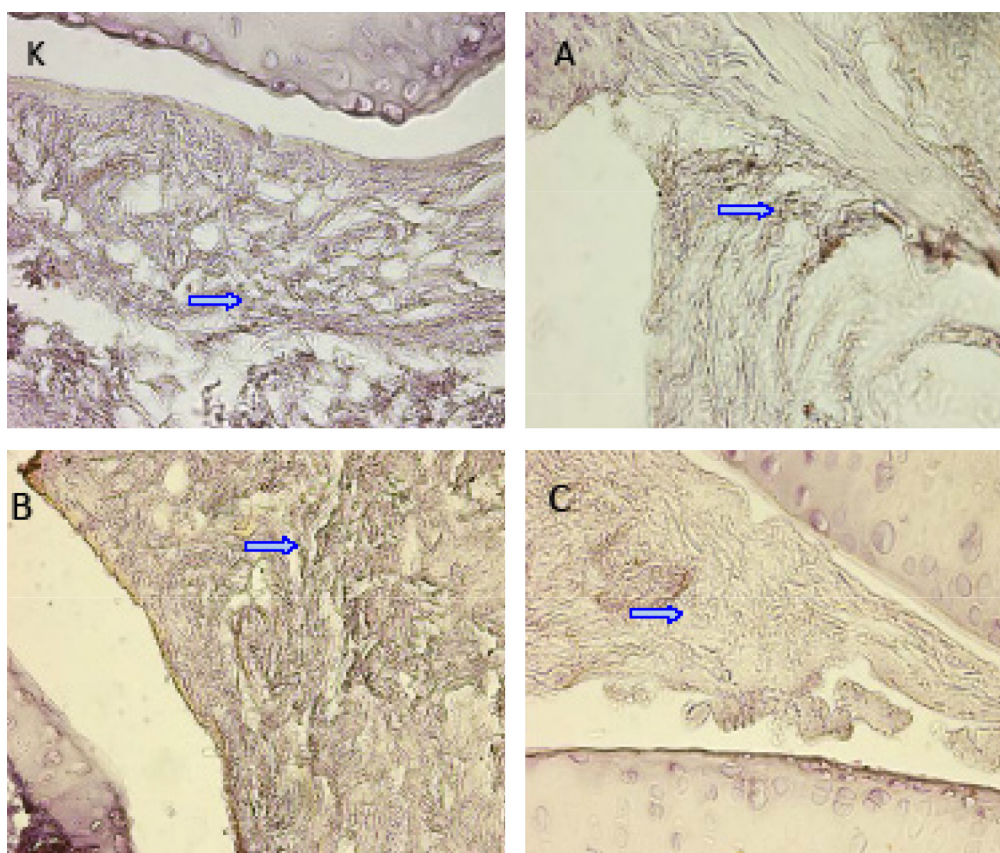
arthritis ajuvan yang tidak mendapat perlakuan dengan kelompok tikus arthritis ajuvan ($p = 0,040$). Terdapat perbedaan bermakna jumlah sel yang mengekspresi MMP-3 dengan metode imunohistokimia di sendi pergelangan kaki tikus kelompok tikus arthritis ajuvan yang terpajan stresor dingin dan kelompok tikus arthritis ajuvan yang terpajan stresor dingin dan diberi ekstrak

S. duplicatum ($p=0,001$). Terdapat perbedaan bermakna jumlah sel yang mengekspresi MMP-3 di sendi pergelangan kaki antara kelompok tikus arthritis ajuvan yang tidak mendapat perlakuan

dengan kelompok tikus arthritis ajuvan dan diberi ekstrak *S. duplicatum* ($p=0,001$). Gambar sel positif yang mengekspresi MMP-3 di sendi pergelangan kaki tikus ditampilkan di Gambar 2.

Tabel 2. Rerata Jumlah Sel Sendi Pergelangan Kaki Tikus yang Mengekspresi MMP-3

Kelompok	Rerata $\pm$ Simpang Baku
1	31,6 $\pm$ 3,978
2	36,4 $\pm$ 5,661
3	19,8 $\pm$ 6,116



Gambar 2. Hasil Pemeriksaan Imunohistokimia MMP-3 di Sendi Pergelangan Kaki Tikus. Pembesaran 400X. Sel positif berwarna coklat (tanda panah biru). K: Kontrol positif ekspresi MMP-3. A: Tikus arthritis ajuvan tanpa perlakuan. B: Tikus arthritis ajuvan yang terpajan stresor dingin. C: Tikus arthritis ajuvan yang terpajan stresor dingin dan diberi ekstrak *S. duplicatum*

Diskusi

Jenis ekstrak yang digunakan adalah ekstrak etanol satu tahap karena berdasarkan penelitian Ristyana¹⁰ kandungan flavonoid tertinggi *S. duplicatum* menggunakan pelarut etanol.

Stresor dingin memicu tubuh beradaptasi dengan meningkatkan metabolisme untuk

mempertahankan suhu tubuh agar tetap konstan sehingga tidak mengganggu fisiologi. Stresor dingin memengaruhi termoregulator untuk mempertahankan suhu tubuh agar tetap konstan dengan cara mentransfer energi dari makanan menjadi panas, yang disebut termogenesis. Peningkatan termogenesis secara fisiologis

akan meningkatkan fosforilasi oksidatif yang menghasilkan oksidan dan radikal bebas sehingga meningkatkan pembentukan oksidan dan radikal bebas. Keadaan tersebut harus diredam oleh antioksidan; apabila tubuh tidak mampu meredam oksidan dan radikal bebas maka timbul stres oksidatif.^{12,13}

Penelitian ini menunjukkan stresor dingin meningkatkan edema pergelangan kaki tikus arthritis ajuvan berupa peningkatan rerata tebal pergelangan kaki tikus pada kelompok arthritis ajuvan yang terpajan stresor dingin dibandingkan kelompok arthritis ajuvan yang tidak terpajan karena stresor dingin meningkatkan pembentukan radikal bebas dan oksidan dalam tubuh.¹⁴

Pemberian ekstrak *S. duplicatum* mampu menurunkan edema sendi kaki tikus dengan arthritis ajuvan yang terpajan stresor dingin. Hal tersebut ditunjukkan dengan penurunan signifikan tebal sendi pergelangan kaki tikus pada kelompok tikus yang terpajan stresor dingin dan diberi *S. duplicatum* dibandingkan kelompok terpajan stresor dingin tetapi tidak diberi ekstrak *S. duplicatum*.

Salah satu kandungan dalam ekstrak etanol *S. duplicatum* adalah flavonoid yang bersifat antioksidan yang bekerja dengan menangkap radikal bebas dan menetralkan efek toksik akibat radikal bebas. Flavonoid juga bekerja sebagai anti-inflamasi melalui penghambatan jalur siklo-oksigenase dan lipo-oksigenase dengan menghambat asam arakhidonat dan sekresi enzim lisosom dari endotel sehingga menghambat proliferasi dan eksudasi proses radang. Terhambatnya pelepasan asam arakhidonat dari sel inflamasi menyebabkan kurang tersedianya substrat asam arakhidonat bagi jalur siklo-oksigenase dan jalur lipo-oksigenase. Mekanisme lain flavonoid sebagai anti-inflamasi adalah dengan menghambat sekresi mediator proinflamasi. Tanin dalam ekstrak etanol *S. duplicatum* berperan sebagai *scavenger* radikal bebas yang mampu menghambat pembentukan anion superoksida O_2^- dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil sehingga meningkatkan enzim superoksida dismutase (SOD) dan stres oksidatif dapat diredam.¹⁵

Stresor dingin meningkatkan termogenesis dan fosforilasi oksidatif serta berdampak meningkatkan produksi radikal bebas.¹⁴ Peningkatan radikal bebas akan mengaktifkan enzim MMP-3 sehingga meningkatkan ekspresi MMP-3 di sendi tikus arthritis ajuvan yang terpajan stresor dingin.¹⁶ Pada penelitian ini peningkatan ekspresi MMP-3 karena stresor dingin meningkatkan termogenesis dan

fosforilasi oksidatif sehingga produksi radikal bebas meningkat dan mengaktifkan ekspresi MMP-3 di sendi tikus arthritis ajuvan terpajan stresor dingin.

Penelitian Aulanni'am et al⁹ pada *inflammatory bowel disease* khususnya di usus halus dan usus besar yang diinduksi indometasin menunjukkan *S. duplicatum* menurunkan secara bermakna (54,20%) kadar malondialdehida (MDA) dengan metode *thiobarbituric acid* (TBA), memperbaiki ekspresi ZO-1 dan *occludin* menggunakan metode imunohistokimia dan memperbaiki kerusakan jejunum yang diamati secara histologi. Fauziah et al¹⁷ melaporkan bahwa tikus yang menderita arthritis rematoid bila diterapi dengan rumput laut coklat (*Sargassum sp*) mengalami penurunan kadar MDA serum secara bermakna ($p < 0,01$) dan gambaran histologi sendi kaki tikus membaik. Penelitian Batubara et al¹⁸ menunjukkan *S. duplicatum* mengandung senyawa antioksidan yang menurunkan kadar MDA serum secara tidak bermakna, tetapi menurunkan protein karbonil (PCO) secara bermakna pada tikus *sprague dawley* yang diinduksi streptozotocin. Hasil penelitian tersebut sesuai dengan penelitian kami.

Secara *in vitro* *Sargassum* memiliki aktivitas anti-inflamasi dengan menurunkan IL-1 β , IL-6, TNF- α dan NO pada *thymousemacrophagecellline* yang diaktifkan oleh lipopolisakarida, menghambat ekspresi mRNA dari IL-1 β , iNOS, COX-2, serta menurunkan NF- κ B inti sel. *Sargassum* secara *in vitro* memiliki aktivitas antioksidan sebagai pembersih superoksida, H_2O_2 , NO dan senyawa radikal bebas yang lain.¹⁹ Secara *in vivo* *Sargassum* menurunkan TNF- α , C-reactive protein, fibrinogen, iNOS, NO, COX-2 dalam plasma serta menurunkan enzim lisosom.

Kesimpulan

Stresor dingin meningkatkan edema sendi dan ekspresi MMP-3 sendi pergelangan kaki tikus dengan arthritis ajuvan. Ekstrak *S. duplicatum* 400 mg/kg BB/hari dapat menurunkan edema sendi dan ekspresi MMP-3 pergelangan kaki tikus dengan arthritis ajuvan yang terpajan stresor dingin.

Daftar Pustaka

1. Rich RR, Fleisher TA, Schwartz BD, Shearer WT, Strober W. Text book of clinical immunology principles and practice. Edisi ke-3. Elsevier. 2008.
2. McInnes IB, Schett G. Mechanisms of disease the pathogenesis of rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 2011;365:2205-19.
3. Scott L D, Wolfe F, Tom WJ, Huizinga TWYT. Rheumatoid arthritis. Lancet. 2010;376:1094-108.

4. Mikirova N, Rogers A, Casciari J, Taylor P. Effect of high dose intravenous ascorbic acid on the level of inflammation in patients with rheumatoid arthritis. *MRI*. 2012;1:26-32.
5. Prabowo S. Pengaruh stresor dingin terhadap proses peradangan pada arthritis adjuvan: penelitian experimental pada artritis adjuvan (hewan model untuk arthritis rematoid) [disertasi]. Surabaya: Universitas Airlangga; 2004.
6. Snehalatha U, Anburajan M, Venkatraman B, Menaka M. Evaluation of complete Freund's adjuvant-induced arthritis in a wistar rat model. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 2012;DOI 10.1007/s00393-012-1083-8.
7. Posthumus MD, Limburg PC, Westra J, van Leeuwen MA, van Rijswijk MH. Serum matrix metallo-proteinase 3 levels during treatment with sulfasalazine or combination of methotrexate and sulfasalazine in patients with early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2002;29:883-9.
8. Jaswir I, Monsur HA. Anti-inflammatory compounds of macro algae origin: a Review. *J Med Plant Res*. 2011;5:7146-54.
9. Aulanni'am, Roosdiana A, Lailatul RN. The potency of *Sargassum duplicatum* bory extract on inflammatory bowell disease therapy in *Rattus norvegicus*. *Journal of life sciences*. 2011;6:144-54.
10. Ristyana IP. Skrining fitokimia dan aktivitas antioksidan ekstrak rumput laut *Sargassum duplicatum* dan *Turbinaria ornata* dari jepara [tesis]. Semarang: Universitas Diponegoro; 2013.
11. Dabbs D J. Diagnostic immunohistochemistry theranostic and genomic aplication. Edisi ke-4. United States: Saunders, Elsevier; 2013.p.1-39.
12. Zautra A, Parrish BP, Van Puymbroeck CM, Tennen H, Davis MC, Reich JW, et al. Depression history, stress, and pain in rheumatoid arthritis patients. *J Behav Med*. 2007;30:187-97.
13. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell PW, Weil PA. Harper's illustrated biochemistry. Edisi ke-28. United States: The McGraw-Hill Companies, 2009.p.194-297.
14. Handajani H, Aryati A, Notopuro H, Aulanni'am A. Prophylactic *Sargassum duplicatum* inhibit joint damage in adjuvant arthritic rats exposed to cold stress through inhibition of NF-KB activation. *Int J ChemTech Res*. 2016;9:151-9.
15. Zhou C, Zhao D, Sheng Y, Tao J, Yang Y. Carotenoids in fruits of different persimmon cultivars. *J. Molecules*. 2011;16:624-36.
16. Alge-Priglinger CS, Kreutzer T, Obholzer K, Wolf A, Mempel M, Kernt M. Oxidative stress-mediated induction of MMP-1 and MMP-3 in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:5495-503.
17. Fauziah F, Aulanni'am A, Mahdi C. A study on brown seaweed therapy toward MDA levels and histological improvement on rat foot suffering rheumatoid arthritis. *J Pure App Chem Res*. 2013;2:102-7.
18. Batubara L, Kristina TN, Rachmawati B. Effectiveness of brown algae extract to reduce serum malondyaldehyde and protein carbonyl levels in streptozotocin-induced sprague dawley rats. *Sains Medika*. 2016;7:43-8.
19. Liu L, Heinrich M, Myers S, Dworjanyn SA. Towards a better understanding of medicinal uses of the brown sea weed *Sargassum* in tradisional Chinese medicine: a phytochemical and pharmacological review. *J Ethnopharmacol*. 2012;42:591-619.