

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Arthritis**

##### **1. Patofisiologi**

Arthritis, peradangan, dan kerusakan sendi yang merupakan karakteristik RA aktif adalah akibat dari proses autoimun dan peradangan kompleks yang melibatkan komponen sistem kekebalan bawaan dan adaptif. Pada individu yang rentan, interaksi lingkungan dan genetik mengakibatkan hilangnya toleransi terhadap protein yang mengandung residu citrulline. Protein ini dihasilkan oleh modifikasi pasca-translasi residu arginin menjadi residu citrulline oleh enzim peptidylarginine deiminase. Pasien dengan epitop yang sama mengembangkan ACPA untuk melawannya dengan memproduksi peptida tersitruilnasi yang tidak dikenali sebagai "*self*" oleh sistem kekebalan. Perbandingan data magnetic resonance imaging (MRI) dan biopsi sinovial dari individu sehat dengan MRI dan data biopsi dari pasien yang positif RF dan/atau ACPA menunjukkan bahwa produksi autoantibodi sistemik mendahului pembentukan molekul inflamasi dan adhesi di sinovium, yang menunjukkan bahwa mungkin ada beberapa penyakit sekunder yang mungkin terjadi. Peristiwa ini diperlukan untuk memulai keterlibatan sinovium pada RA. Dalam sebuah penelitian terhadap 79 pasien RA, kemunculan awal RF dan ACPA mendahului perkembangan RA klinis yang melibatkan sinovium dengan rata-rata 4,5 tahun (Gibofsky, 2014).

Sinovitis disebabkan oleh infiltrasi sel darah putih ke dalam sinovium. Akumulasi leukosit di sinovium bukan disebabkan oleh peningkatan sel lokal, melainkan terjadi oleh migrasi leukosit dari bagian struktur yang jauh sebagai respons terhadap ekspresi molekul adhesi dan kemokin oleh sel endotel mikrovaskular sinovial yang teraktivasi. Bagian dalam sinovium yang meradang berada dalam keadaan hipoksia, kemungkinan disebabkan oleh peningkatan jumlah sel sinovial dan penurunan aliran kapiler sinovial karena peningkatan jumlah cairan sinovial. Pada gilirannya, hipoksia merangsang angiogenesis di sinovium, kemungkinan dengan menginduksi produksi faktor perangsang angiogenesis seperti faktor pertumbuhan endotel vaskular (Gibofsky, 2014).

Aktivasi imun dan perkembangan penyakit RA adalah proses kompleks yang melibatkan interaksi antara komponen jalur imun adaptif dan bawaan.

Sifat interaksi ini sangat dipengaruhi oleh lingkungan sitokin dan kemokin lokal sinovium di mana interaksi tersebut terjadi. Pada RA yang sudah mapan, membran sinovial dihuni oleh berbagai jenis sel inflamasi yang bekerja sama menyebabkan kerusakan sendi (Gibofsky, 2014).

Pentingnya jalur imun adaptif pada RA ditunjukkan oleh adanya sel dendritik, suatu kelas penting sel penyaji antigen yang mengekspresikan berbagai sitokin, molekul HLA kelas II, dan molekul kostimulatori yang berdekatan dengan sel T RA. Kolam renang membran sinovial. Sel dendritik menyajikan antigen kepada sel T di membran sinovial dan juga berfungsi sebagai salah satu komponen dalam proses aktivasi sel T. 2 sinyal diperlukan untuk aktivasi sel T. Sinyal pertama adalah presentasi antigen ke reseptor sel T. Sinyal kedua, sinyal ko-stimulasi, memerlukan interaksi protein permukaan sel CD80/86 dari sel penyaji antigen (dendritik) dengan protein sel T CD28. Blokade sinyal kostimulatori dengan penghambatan kompetitif CD80/86 mengganggu aktivasi sel T. dan peristiwa hilir. Kemanjuran blokade CD80/86 dalam pengobatan RA memperkuat anggapan bahwa sel T berperan aktif dalam patofisiologi RA (Gibofsky, 2014).

Ketika sel T diaktifkan, sel T naif ( $Th_0$ ) berdiferensiasi menjadi tiga subset ( $Th_1$ ,  $Th_2$ , dan  $Th_{17}$ ) dengan profil dan fungsi produksi sitokin yang berbeda. RA telah lama dianggap sebagai penyakit yang diperantarai sel  $Th_1$ , namun kini fokusnya adalah pada subset  $Th_{17}$ . Sel dendritik dan makrofag mensekresi faktor pertumbuhan transformasi  $\beta$ , interleukin (IL)- $1\beta$ , IL-6, IL-21, dan IL-23, sitokin yang mendorong diferensiasi  $Th_{17}$  dan menghambat produksi sel T regulator. Sel sistem sinovial. Sel yang melawan peradangan. Pada saat yang sama, sel  $Th_{17}$  menghasilkan IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26, interferon- $\gamma$ , kemokin CCL20, dan faktor transkripsi ROR- $\gamma$ . Produksi IL-17A merangsang fibroblast-like synoviocytes (FLS) dan sinoviosit mirip makrofag untuk meningkatkan regulasi produksi IL-26, yang menginduksi produksi sitokin inflamasi IL- $1\beta$ , IL-6, dan TNF- $\alpha$  oleh monosit; sitokin ini merangsang diferensiasi lebih lanjut sel  $Th_{17}$ . Selain jalur inflamasi yang digerakkan oleh antigen, inflamasi dapat dimediasi melalui jalur antigen-nonspesifik yang dimulai oleh kontak sel-ke-sel antara sel T yang teraktivasi dan makrofag serta fibroblast (Gibofsky, 2014).

## **2. Pathway Disease**

Jalur sinyal intraseluler juga terlibat dalam patogenesis RA. Berbagai sitokin, kemokin, antibodi, dan antigen yang berkontribusi terhadap peradangan berikatan dengan reseptor pada permukaan sel sel target tertentu. Pengikatan reseptor biasanya menghasilkan rangkaian peristiwa sinyal intraseluler yang pada akhirnya menyatu pada inti sel dan mengubah ekspresi gen dengan cara yang dapat mempengaruhi fungsi sel. Secara khusus, perubahan ekspresi gen pada sel imun sering dikaitkan dengan produksi dan sekresi mediator inflamasi sebagai respons terhadap stimulus tertentu. Sekresi mediator ini ke dalam lingkungan ekstraseluler menghasilkan penguatan lebih lanjut dan/atau modifikasi sinyal asli. Contoh jalur pensinyalan intraseluler termasuk jalur Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), jalur Janus Kinases (JAK), jalur Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT), pensinyalan Spleen Tyrosine Kinase (Syk) limpa, dan jalur Nuclear Factor  $\kappa$ -Light-Chain Enhancer of Activated B Cells (NF- $\kappa$ B). Komunikasi silang antar jalur telah dilaporkan (Gibofsky, 2014).

Jalur sinyal intraseluler sangat penting untuk respons imun yang normal, dan penyimpangan pada jalur ini dapat menyebabkan penyakit autoimun. Generasi pertama dari molekul kecil yang ditujukan terhadap target intraseluler kini digunakan untuk pengobatan RA. Pemahaman lebih lanjut mengenai jalur ini kemungkinan besar akan mengarah pada identifikasi target terapi tambahan. Peradangan RA juga berhubungan dengan perubahan karakteristik pada jaringan mesenkim. FLS, yang biasanya berada di sinovium, berproliferasi dan mengubah fenotipnya dalam keadaan RA. Dalam sinovium yang meradang, kontak sel antara FLS dan sel T menghasilkan induksi berbagai mediator inflamasi dan molekul adhesi, termasuk IL-6, TNF, interferon- $\gamma$ , molekul adhesi intraseluler-1, dan molekul adhesi sel pembuluh darah-1. Perubahan FLS menyerang tulang rawan sendi dan menghasilkan berbagai protease yang berkontribusi terhadap kerusakan sendi (Gibofsky, 2014).

## **3. Terapi Farmakologi**

Berbagai pendekatan pengobatan termasuk obat DMARDs, DMARDs biologis, NSAID, dan kortikosteroid digunakan untuk pengelolaan RA dengan

menurunkan peradangan respons yang dihasilkan oleh makrofag teraktivasi dan sel imun lainnya dalam jaringan sinovial.

**3.1. Disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs).** Sejak tahun 1970-an, pengobatan RA telah terbukti menggunakan DMARDs sebagai tulang punggungnya. Mereka menghasilkan pengurangan peradangan, sehingga memperlambat perkembangan radiografi. Perbaikan gejala klinis secara keseluruhan dan pencegahan RA telah ditunjukkan penelitian sebelumnya, dimana pengobatan RA dilakukan dengan DMARDs. Methotrexate (MTX) adalah DMARDs yang paling populer dan paling banyak diresepkan. Dosis rendah MTX diresepkan sebagai monoterapi atau mungkin dikombinasikan dengan obat lain menunjukkan peningkatan kemanjuran (Kumar *et al.*, 2020).

MTX digunakan pada RA dalam dosis rendah dan prediksi mekanisme kerja serta pengelolaan RA lebih menantang. Saat ini, berbagai mekanisme terlibat secara kritis menentukan kemanjuran MTX pada RA sedang diselidiki. MTX berikatan dengan dihidrofolat reduktase dan timidilat sintetase, menurunkan sintesis de novo residu timidin dan akhirnya menghambat sintesis DNA. MTX juga mengaktifkan sinyal adenosin, ROS aktivasi dan penghambatan sitokin proinflamasi, eikosanoid, dan MMP (Kumar *et al.*, 2020).

Secara klinis, MTX diberikan setiap minggu melalui rute oral atau subkutan. Namun, pemberian MTX jangka panjang dibatasi oleh efek samping yang parah seperti hepatotoksitas, gangguan ginjal, efek samping gastrointestinal, toksisitas paru, pneumonitis, penekanan myelo, mual, sakit kepala, pigmentasi kulit, dan rambut rontok. Kemungkinan toksisitas hati dan hepatitis terkait dengan pengobatan MTX telah dilaporkan secara luas (Kumar *et al.*, 2020).

DMARDs lainnya termasuk Leflunomide yang secara spesifik bekerja pada limfosit dan menghambatnya sintesis pirimidin pada limfosit. Hidroksiklorokuin, DMARD yang berbeda, memiliki efek samping minimal, telah dilaporkan efektif dalam perbaikan fungsi sendi dan nyeri sendi. Sulphasalazine memberikan efek yang rendah toksisitas dibandingkan MTX pada pasien RA. Apalagi mekanisme kerjanya mirip dengan MTX itu juga menghambat jalur asam arakadonat dan dapat meningkatkan sinyal adenosin. Lipopolisakarida monosit manusia prima/makrofag yang diobati dengan klorokuin telah dilaporkan menghambat TNF- $\alpha$ , IL-6, dan IL-1 $\beta$ . Obat lain

yang digunakan sebagai obat pengganti termasuk siklosporin, minocycline, doxycycline, dan azathioprine atau sebagai obat tambahan untuk pengelolaan RA. Garam emas yang dapat disuntikkan juga dapat digunakan karena dilaporkan memperlambat perkembangan radiograf (Kumar *et al.*, 2020).

**3.2. Glukokortikoid.** Glukokortikoid adalah immunosupresan dan agen antiinflamasi yang efisien yang digunakan dalam pengelolaan RA. Glukokortikoid bekerja melalui berbagai mekanisme. Setelah masuk ke dalam sel melalui membran sel, pertama-tama mereka berikatan dengan reseptor glukokortikoid sitosol membuat reseptor yang tidak aktif menjadi reseptor glukokortikoid sitosol yang diaktifkan kompleks, dan translokasi molekul ini ke dalam nukleus selanjutnya memulai trans-represi atau transaktivasi. Transaktivasi menyebabkan ekspresi berlebih dari protein pengatur tertentu dan transrepresi kompleks monomer reseptor glukokortikoid sitosol mengakibatkan penghambatan aktivitas faktor transkripsi inflamasi seperti protein aktivator 1 dan NF- $\kappa$ B, menyebabkan penurunan sintesis protein proinflamasi dan ekspresi berlebih dari protein antiinflamasi seperti I $\kappa$ B, annexin I, dan MAPK fosfatase I. Salah satu glukokortikoid penting yang digunakan sebagai monoterapi atau kombinasi dengan obat antirematik lainnya adalah deksametason (DEX). DEX digunakan sebagai baris pertama obat antiarthritis untuk pengendalian arthritis jangka panjang. Penggunaan DEX dalam waktu lama menyebabkan penyakit yang parah hambatan seperti demineralisasi tulang, diabetes, dan sindrom cushing sehingga membatasi penggunaannya (Kumar *et al.*, 2020).

**3.3. Biologic disease modifying antirheumatic drugs (bDMARDs).** Seperangkat pengubah respons biologis yang baru dikembangkan, yang dikenal sebagai DMARD biologis, adalah mampu mengurangi keparahan penyakit, sehingga meningkatkan harapan hidup dan keterbelakangan kerusakan sendi. Infliximab, adalimumab, golimumab, certolizumab, dan etanercept, yang merupakan agen penghambat TNF, adalah yang pertama pilihan DMARD biologis. Apoptosis sel pengekspres TNF $\alpha$  diinduksi oleh pengikatan dari agen ini ke TNF $\alpha$  yang larut. Obat-obatan ini berkhasiat sebagai monoterapi, dan penggunaan sebagai bahan pembantu dengan DMARD, menghasilkan efek yang lebih baik dalam pencegahan perkembangan radiografi dan penguatan respon klinis. Antibodi monoklonal anti CD20 chime-ric, Rituximab, dikenal karena menipisnya antibodi matang dan sel B yang belum matang, tetapi bukan sel plasma karena tidak memiliki

ekspresi CD20. Pasien RA yang menunjukkan perkembangan penyakit tingkat sedang hingga berat tidak memberikan respons terhadap pengobatan anti-TNF dan DMARD konvensional sering direkomendasikan untuk menggunakan rituximab. Abatacept adalah kompleks protein dari bagian Fc IgG1 dan sitotoksik T antigen terkait limfosit 4 yang bereaksi dengan interaksi reseptor CD28 dengan Molekul CD80/CD86 hadir pada sel penyaji antigen, secara bertahap mereduksi sel T aktivasi dan mengurangi peradangan sendi. Meskipun abatacept telah mengurangi kemanjurannya membantu dalam perbaikan terus-menerus dan analisis radiografi perkembangan RA. Setelah kegagalan pengobatan anti-TNF, penggunaan Anakinra direkomendasikan dengan MTX. Anakinra adalah antagonis reseptor IL-1 dan telah digunakan sebagai pengobatan lini kedua untuk RA (Kumar *et al.*, 2020).

Di antara DMARD biologis yang baru-baru ini disetujui, tocilizumab telah digunakan untuk pengobatan pasien dengan tingkat RA sedang hingga berat. Ini adalah rekombinan yang dimanusiakan antibodi monoklonal yang berinteraksi dengan reseptor IL-6, seiring dengan peningkatan kadar IL-6, suatu sitokin proinflamasi, pada pasien RA. Pasien yang mengalami kegagalan pengobatan dengan DMARDs tradisional atau terapi anti-TNF dapat menggunakan infus biasa tocilizumab, karena meningkatkan fungsi sendi dan mengurangi perkembangan radiografi. Ini dapat digunakan secara sinergis bersama dengan MTX, dengan demikian, meningkatkan efeknya. Selain itu, pertumbuhan vascular endothelial growth factor (VEGF) pada RA dikurangi dengan tocilizumab (Kumar *et al.*, 2020).

Terapi anti-TNF- $\alpha$  lainnya, infliximab, antibodi monoklonal bekerja secara konjugasi dengan MTX. Pada pasien dengan psoriatic arthritis, infliximab dapat digunakan untuk mengurangi ekspresi VEGF kulit dan sinovial. Tirosin-kinase yang kompetitif inhibitor, imatinib mesylate, berguna dalam memantau beberapa keganasan hematologi, dan telah ditemukan menghambat osteoklastogenesis, aktivasi makrofag dan kerusakan sendi pada tikus model collagen-induced arthritis (CIA). NF- $\kappa$ B, penghambat faktor nuklir  $\kappa$ B, dehydroxymethylepoxyquinomicin telah ditemukan menghambat produksi sitokin makrofag pada tikus yang diinduksi CIA model. Namun, ada banyak efek samping yang ditimbulkannya mungkin terjadi pada penggunaan bahan biologis, membuat pasien rentan terhadap infeksi kronis, termasuk tuberculosis (Kumar *et al.*, 2020).

**3.4. Non-steroidal anti inflammatory drugs (NSAID).** NSAID digunakan secara luas dalam pengelolaan RA karena sifat antiinflamasi dan analgesiknya yang efektif. NSAID menghambat enzim siklooksigenase yang menghambat biosintesis prostaglandin dari asam arakidonat. NSAID memiliki beberapa kesamaan toksisitas klinis, namun frekuensi efek samping tertentu bergantung pada senyawa yang digunakan. Beberapa toksisitas dari penggunaan NSAID jangka panjang termasuk toksisitas gastrointestinal, gangguan ginjal, efek samping kardiovaskular, hati toksisitas, reaksi alergi, toksisitas hematologi, efek samping terkait sistem saraf, dan tertundanya penyembuhan tulang (Kumar *et al.*, 2020).

## **B. Metode Uji Antiartritis**

### **1. Metode Induksi**

Beberapa metode induksi untuk uji antiartritis yang dilakukan pada hewan percobaan adalah sebagai berikut:

**1.1. Adjuvant-induced arthritis (AIA).** CFA merupakan suspensi bakteri tuberkulosis pada lilin parafin. Model hewan lengkap yang diinduksi CFA sebagai model yang paling representatif untuk pengujian obat antirematik. Hal ini karena kadar TNF- $\alpha$  meningkat pada hewan yang disuntik CFA, dan kadar TNF $\alpha$  juga meningkat pada pasien RA. Salah satu parameter inflamasi yang disebabkan oleh CFA intraplantar pada hewan percobaan adalah inflamasi pada persendian (Mus *et al.*, 2023).

Pemberian CFA merangsang fagositosis, yaitu sekresi sitokin melalui fagositosis mononuklear, yang menghasilkan berbagai sitokin proinflamasi seperti TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, PGE-2, NO, MMP dan mediator lainnya bisa dilepaskan. Oleh karena itu, induksi CFA dapat menyebabkan peradangan pada hewan coba (Widhiastuti *et al.*, 2021).

Peningkatan ukuran kaki menunjukkan kemampuan CFA dalam menekan peradangan. Pemberian CFA merangsang fagositosis, sekresi sitokin melalui fagositosis mononuklear, produksi berbagai sitokin inflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, PGE-2, NO, dan MMP. TNF- $\alpha$  bekerja dengan Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligan (RANKL) untuk merangsang osteoklastogenesis melalui sinyal dari prekursor osteoklas. Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B (RANK) menginduksi diferensiasi sel pada osteoklas. TNF- $\alpha$  juga dapat menyebabkan peradangan kronis dan hiperplasia sinovial, proses inflamasi pada jaringan sendi, pembentukan tulang rawan dan tulang,

serta pengeroposan tulang. Selain itu, IL-1 dan IL-6 juga mungkin berperan dalam patofisiologi rheumatoid arthritis (Amirah *et al.*, 2020).

**1.2. *Streptococcal cell wall induced arthritis (SCWIA)*.** *Streptococcus pyogenes* menghasilkan polimer peptidoglikan-polisakarida (PG-PS), yang ditemukan memiliki kandungan aktivitas inflamasi dan juga memiliki kapasitas untuk menginduksi radang sendi pada tikus. SCWIA memulai dua model tikus berdasarkan fragmen PG-P yang digunakan dan cara pemberiannya. Model hewan ini digunakan untuk mempelajari terapi efek obat-obatan, namun lebih jarang digunakan, mungkin disebabkan oleh biaya mereka yang tinggi. Model ini membantu kita mempelajari akut atau reaksi flare pada arthritis, ini merupakan keuntungan dari SCW menginduksi arthritis dibandingkan model arthritis konvensional. SCWIA tidak dapat diinduksi pada non-manusia primata karena mereka tampaknya kebal terhadap arthritis diinduksi oleh antigen bakteri (Choudhary *et al.*, 2018).

**1.3. *Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)*.** COMP adalah protein berukuran besar, yang memiliki berat molekul total 435 kD. Ini disintesis oleh kondrosit dan dilokalisasi secara ekstraseluler. Memiliki terdeteksi pada tulang rawan hidung, trakea, dan meniskus dan yang paling penting di tulang rawan articular dan juga terdapat di jaringan sinovial manusia. Untuk tujuan induksi arthritis, COMP yang diperoleh dari asal tikus digunakan dan juga untuk memastikan bahwa hanya proses autoimun saja terlibat. COMP yang alami dan asli dapat digunakan induksi radang sendi (Choudhary *et al.*, 2018).

**1.4. *Pristane induced arthritis (PIA)*.** PIA bersifat kronis, spesifik sendi, diatur oleh sel T dan gen MHC serta memenuhi kriteria klinis untuk RA. Namun, tidak ada bukti adanya autoimun reaksi. Model ini terbukti efektif dan berhasil pada tikus dan juga pada tikus. Model PIA sangat penting alat untuk mengetahui mekanisme penyakit inflamasi sendi dan kemanjuran obat anti-reumatik baru dapat diuji di model ini. PIA juga digunakan sebagai model SLE karena produksi autoantibodi. Untuk memahami berbagai manifestasi autoimunitas, penelitian perlu dilakukan mengidentifikasi gen yang terlibat dalam rheumatoid arthritis dan produksi autoantibodi (Choudhary *et al.*, 2018).

**1.5. *Antigen induced arthritis*.** Model hewan pengerat AIA pertama kali digunakan selama lebih dari 40 tahun lalu dan mereka masih dihargai. Arthritis yang diinduksi antigen, in dengan kata sederhana, diinduksi melalui imunisasi dengan model antigen (seperti albumin serum sapi atau ovalbumin)

secara intra-artikular diikuti dengan tantangan dengan antigen yang sama. Ini menghasilkan respon imun dan artritis berikutnya terbatas pada sendi yang diinduksi antigen. AIA memiliki keuntungan besar penerapan pada beberapa strain tikus, mencit, babi guinea dan kelinci. Basis seluler mirip dengan CIA, tetapi dengan sensitisasi yang lebih jelas dan merupakan sel T CD<sup>4+</sup> bergantung. Temuan histopatologis memiliki kesamaan dengan RA manusia, termasuk hiperplasia sinovial, infiltrasi perivaskular, folikel limfoid dan erosi pannus dan tulang rawan. ELS, mirip dengan yang terlihat pada pasien RA, diamati ketika suntikan antigen berulang kali diberikan. Sifat erosif ini berhubungan dengan kemampuan antigen mengikat tulang rawan. Model artritis yang diinduksi antigen adalah penyakit mono-artikular yang hanya menyerang sendi yang disuntik. Kerentanan terhadap AIA tidak dibatasi oleh MHC kelas II dan ini membuatnya berguna penelitian yang melibatkan tikus transgenik dan knock-out. Kelinci model artritis antigen sangat berguna ketika protokol memerlukan penggunaan sendi yang lebih besar (Choudhary *et al.*, 2018).

**1.6. Collagen induced arthritis (CIA).** Artritis yang diinduksi kolagen dipelajari secara lebih luas pada model hewan karena ia memiliki banyak kesamaan ciri patologis dan imunologis dengan RA manusia. Dalam CIA, respons imun diarahkan terhadap antigen sendi (kolagen tipe II). Dua karakteristik penting dari model CIA adalah pelanggaran toleransi dan pembentukan antibodi otomatis terhadap diri sendiri dan kolagen. Hal ini menjadikan CIA sebagai model *in vivo* standar emas untuk studi RA. Model ini dimediasi oleh sel T helper, di mana respons T helper (Th<sub>1</sub>) dan (Th<sub>17</sub>) diinduksi dalam CIA, namun sel Th<sub>17</sub> tampaknya memainkan peran patologis yang dominan (Choudhary *et al.*, 2018).

Kolagen diperoleh dari berbagai sumber (sapi, manusia, babi, dan ayam) dan responsnya terlihat bervariasi tergantung pada strain dan kondisi injeksi yang berbeda. Tidak mengherankan, respons buruk terlihat pada kolagen tikus. CIA pada dasarnya merupakan penyakit autoimun pada persendian, yang memerlukan imunitas sel T dan B terhadap kolagen tipe II autologus (CII) untuk manifestasi penyakit. Model collagen induced arthritis (CIA) pertama dibuat melalui imunisasi tikus dengan kolagen tipe II. Kemudian, model CIA direproduksi pada tikus dan monyet (Choudhary *et al.*, 2018).

**1.7. *Proteoglycan induced arthritis.*** Setelah pengembangan model CIA pada akhir tahun 1970-an, beberapa protein lain yang ditemukan di sendi, seperti link protein, proteoglikan dan gp-39 ditemukan menyebabkan artritis pada hewan pengerat. Proteoglikan dapat digunakan untuk menginduksi artritis pada kelinci dan anjing serta tikus BALB/c. PG itu besar molekul ( $\sim 3 \times 10^6$  Da) yang mengandung inti protein rantai samping glikosaminoglikan termasuk kondroitin sulfat dan keratin sulfat melekat. Oligosakarida yang terikat N dan O juga melekat pada wilayah inti ini (Choudhary *et al.*, 2018).

## **2. Metode Analisa**

**2.1. Pengukuran berat badan tikus.** Berat badan pada evaluasi pertama (hari ke 0 sebelum imunisasi) hampir sama pada semua kelompok hewan, sedangkan pada tikus yang diimunisasi selalu lebih rendah secara signifikan dibandingkan pada tikus kontrol pada periode berikutnya. Selama seminggu terakhir, berat badan tikus yang diimunisasi cenderung kembali ke berat badan tikus kontrol.

Perubahan berat badan tikus diukur sebagai salah satu parameter untuk menilai perjalanan penyakit karena penurunan berat badan menunjukkan penyakit aktif, sedangkan penambahan berat badan menunjukkan pemulihan. Pertambahan berat badan yang lebih rendah yang diamati pada semua kelompok yang diimunisasi dibandingkan dengan kelompok kontrol sesuai dengan fakta bahwa RA dikaitkan dengan hilangnya massa tubuh tanpa lemak, yang dikenal sebagai rheumatoid cachexia, yang merupakan komorbiditas utama. Yang terakhir ini dianggap sebagai hasil akhir dari hipermetabolisme yang dipicu oleh sitokin, yang, pada gilirannya, meningkatkan aktivitas jalur proteolitik ubiquitin-proteasome yang bertanggung jawab atas pengecilan otot dan karenanya penurunan berat badan (Nasuti *et al.*, 2019).

**2.2. Pengukuran volume udem kaki.** Volume kaki belakang yang disuntikkan dan kontralateral (diukur hingga garis rambut) dinilai pada hari 0 (sebelum imunisasi dengan CFA 5, 10, 15, 20 dan 25 dengan plethysmograph (Ugo Basile, Gemonio (VA), Italia). Kenaikan volume telapak kaki ( $\Delta V$ ) atau edema pada waktu (t) dihitung dengan rumus: Volume telapak kaki (t0) – volume telapak kaki (t), dimana volume telapak kaki (t0) diukur pada hari ke 0 sebelum imunisasi. Sebelum pengukuran volume, hewan dibius dengan isofluran 3% dalam oksigen.

Data volume kaki kontralateral dianalisis dengan menentukan area di bawah kurva dosis (AUC) dari hari ke 0 hingga hari. 25. Nilai rata-rata untuk masing-masing kelompok ditentukan dan % penghambatan edema kaki sehubungan dengan kelompok CFA dihitung menggunakan rumus berikut: % penghambatan edema kaki =  $B/A \times 100$ , dimana A = rata-rata kelompok kontrol yang sehat rata-rata dari kelompok CFA dan B = rata-rata kelompok CFA yang diberi perlakuan rata-rata kelompok CFA. Metode ini memperhitungkan nilai bukan nol untuk kelompok kontrol yang sehat. Persentase penghambatan yang mendekati 100% menunjukkan efektivitas pengobatan dalam mencegah/menurunkan kejadian artritis dibandingkan kelompok CFA artritis.

Perkembangan artritis dan aktivitas obat anti-rematik dapat dinilai melalui pengukuran beberapa parameter seperti volume kedua kaki belakang dan skor artritis. Pembengkakan pada kaki belakang yang disuntik (lesi rematik primer) digunakan untuk mengevaluasi respon inflamasi pada fase akut setelah imunisasi CFA, sedangkan peningkatan volume pada kaki belakang kontrol (lesi rematik sekunder) diukur untuk memperkirakan respon imun umum yang menyebabkan poliartritis. dalam fase kronis (Nasuti *et al.*, 2019).

Persentase penghambatan volume telapak kaki dihitung dari perbedaan rata-rata volume telapak kaki pada kelompok yang diberi obat dan kelompok kontrol dengan menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ penurunan volume udem} = \frac{V_0 - V_t}{V_0} \times 100\%$$

Keterangan:  $V_0$  = volume udem pada hari ke-0

$V_t$  = volume udem pada hari ke-t (1,2,3,...) (Perumal *et al.*, 2017)

**2.3. Estimasi parameter hematologi.** Kaki belakang tikus percobaan difoto untuk melihat morfologi kondisi artritis. Pada akhir percobaan, semua hewan dikorbankan dengan memberikan kloroform dosis tinggi sebagai anestesi dan darah dikumpulkan melalui tusukan jantung dalam tabung biasa dan tabung berisi EDTA untuk pemisahan serum.

Penurunan jumlah sel darah merah dan kadar hemoglobin pada kelompok kontrol artritis menunjukkan adanya kondisi anemia pada tikus artritis. Anemia adalah manifestasi ekstraartikular yang paling umum dari rheumatoid arthritis, diperkirakan terjadi pada 30% sampai 60% pasien. Dua penyebab paling umum terjadinya anemia pada pasien radang sendi adalah

kehilangan darah gastrointestinal akibat pengobatan radang sendi dan perubahan sumsum tulang pada pasien radang sendi yang mencegah pelepasan zat besi untuk dimasukkan ke dalam sel darah merah (Perumal *et al.*, 2017).

**2.4. Uji histopatologi persendian.** Sendi interphalangeal dikeluarkan dari kaki belakang, dicuci dengan garam dan difiksasi selama 24 jam dalam formalin 10%. Setelah dekalsifikasi, bagian yang diperoleh diwarnai dengan pewarnaan eosin hematoxilin dan dilihat dengan perbesaran 100x. Perbedaan pada sendi pergelangan kaki normal dan sendi tikus artritis yang diinduksi adjuvan. Dalam penelitian ini, studi histopatologi sendi kaki belakang pada kelompok kontrol artritis menunjukkan kelainan yang menonjol seperti kerusakan sumsum tulang dan infiltrasi sel yang luas pada permukaan articular. Infiltrasi seluler berlimpah pada lapisan sinovial pada tikus kontrol artritis.

Studi histopatologi menunjukkan perbedaan pada sendi pergelangan kaki normal dan sendi tikus artritis yang diinduksi adjuvan. Secara umum, studi histopatologi pada sendi artritis menunjukkan kelainan yang menonjol dari sendi normal seperti pembentukan edema, degenerasi dengan erosi parsial pada tulang rawan, kerusakan sumsum tulang dan infiltrasi eksudat inflamasi yang luas pada permukaan articular. Dalam penelitian ini, studi histopatologi sendi kaki belakang pada tikus kontrol artritis menunjukkan kelainan yang menonjol seperti kerusakan sumsum tulang dan infiltrasi sel yang luas pada permukaan articular (Perumal *et al.*, 2017).

## **C. Tanaman Sambiloto**

### **1. Sistematika Tanaman**

Sambilloto disebut "*King of Bitter*" yang dimana diduga berasal dari India. Tanaman ini tumbuh di wilayah Asia yang beriklim tropis dan subtropis, antara lain India, Semenanjung Malaya, dan India.

Klasifikasi tanaman sambiloto:

Divisi : Spermatophyta.

Sub Divisi : Angiospermae.

Kelas : Dicotyledonae.

Ordo : Solanaceae

Famili : Acanthaceae.

Genus : Andrographis

Spesies : Andrographis Paniculata Nees (Ischak & Botutihe, 2018).

## 2. Kandungan Kimia Tanaman

Daun tanaman sambiloto yang mengandung bahan kimia yang memberikan rasa pahit dan dingin, mengandung zat-zat sebagai berikut: Daun dan rantingnya mengandung lakton, antara lain andrographolide, deoxyandrographolide, 11, 12-didehydro-14-deoxyandrographolide, dan neoandrographolide. Juga mengandung flavonoid, alkana, keton, aldehida, mineral (kalium, akar mengandung flavotioid, yang paling terisolasi adalah polimetoksiflavin, andrograf, panikulin mono-O-metilwithin dan apigenin-7,4-dimetil eter) (Zahrina, 2015). Sambiloto mengandung senyawa-senyawa metabolit sekunder golongan terpenoid, flavonoid, xanton dan asam kuanat (Ischak & Botutihe, 2018).

*Andrographis paniculata* telah digunakan dalam pengobatan tradisional Tiongkok selama berabad-abad. *Andrographolide* (AD) merupakan senyawa biologis diterpenoid penting yang berasal dari *Andrographis paniculata*, dengan berbagai efek obat, termasuk sifat hepatoprotektif, antiangiogenik, antitrombotik, antiinflamasi dan antiarthritis. AD menghambat diferensiasi osteoklas, dan memicu apoptosis dan penghentian siklus sel sinoviosit mirip fibroblas. AD juga mencegah produksi radikal oksigen dan migrasi neutrofil yang diinduksi N-Formyl-l-methionyl-l-leucyl-l-phenylalanine. Namun, mekanisme molekuler yang mendasari AD pada reumatoid arthritis masih belum jelas (Li *et al.*, 2019).

## 3. Aktivitas Antiarthritis

Neutrofil memainkan peran penting dalam timbulnya dan kelangsungan RA. Sitokin dan mediator yang diproduksi oleh neutrofil dapat memperkuat respon inflamasi pada RA. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa mediator inflamasi, termasuk sitokin, kemokin, dan *reactive oxygen species* (ROS), memiliki efek pleiotropik pada perkembangan peradangan. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A, dan IFN- $\gamma$  mempunyai efek penting dalam merekrut dan mengaktifkan neutrofil. Sitokin inflamasi ini dapat memperkuat respon imun dengan menginduksi produksi sitokin dan kemokin lain. Sitokin ini juga terlibat dalam patogenesis RA dengan mengaktifkan kondrosit dan osteoklas. Tingkat ekspresi IFN- $\gamma$  secara signifikan lebih tinggi pada pasien RA setelah timbulnya penyakit dibandingkan dengan kontrol kesehatan. Sebagai faktor sitokin anti-inflamasi, IL-10 memiliki kapasitas untuk menghambat aktivasi, migrasi, dan degranulasi neutrofil. Menargetkan sitokin inflamasi termasuk

TNF- $\alpha$ , IL-17A, dan IL-6 adalah strategi penting untuk pengobatan RA. Inhibitor TNF- $\alpha$  (Adalimumab, Etanercept, Certolizumab) dan inhibitor IL-6 (Tocilizumab) telah dilisensikan oleh *Food and Drug Administration* (FDA) untuk mengobati pasien RA. Dalam penelitian ini, menemukan bahwa pengobatan AD menurunkan kadar sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17A), sekaligus meningkatkan kadar sitokin antiinflamasi IL-10 pada pasien. plasma tikus AA. Data ini menunjukkan bahwa AD memiliki efek antiinflamasi sistematis pada tikus AA (Li *et al.*, 2019).

Pemberian ekstrak sambiloto secara oral menunjukkan aktivitas anti-inflamasi yang sangat signifikan pada tikus PID yang diinduksi patogen. Efek antiinflamasi ditunjukkan dengan mencegah infiltrasi neutrofil dan limfosit serta mengurangi produksi sitokin dan kemokin. Mekanisme ini melibatkan aktivasi jalur NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B adalah kompleks protein yang berikatan secara kovalen dengan I $\kappa$ B yang terletak di sitoplasma sel dalam keadaan istirahat. Ketika TLR mengenali patogen pada permukaan sel, I $\kappa$ B terfosforilasi dan terdegradasi sehingga NF- $\kappa$ B bertranslokasi ke nukleus dan berikatan dengan elemen penambah NF- $\kappa$ B yang bertindak cis, memicu ekspresi mediator proinflamasi seperti IL-1 $\beta$ . dan IL-6 (Harahap *et al.*, 2023).

## **D. Tanaman Jahe Merah**

### **1. Sistematika Tanaman**

Sistematika tanaman jahe merah adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae  
 Divisi : Spermatophyta  
 Subdivisi : Angiospermae  
 Kelas : Monocotyledoneae  
 Ordo : Zingiberales  
 Family : Zingiberaceae  
 Genus : Zingiber  
 Species : Zingiber officinale var. rubrum (Anindita, 2018).

### **2. Kandungan Kimia Tanaman**

Analisis kimia menunjukkan bahwa jahe mengandung lebih dari 400 senyawa berbeda. Komponen utama jahe adalah karbohidrat (50-70%), lipid (3-8%) dan campuran terpen dan fenol. Komponen terpen pada jahe antara lain zingerene,  $\beta$ -bisabolene,  $\alpha$ -farnesene,  $\beta$ -sesquiphellandrene, dan  $\alpha$ -

curcumene. Sedangkan senyawa fenoliknya adalah gingerol, paradol dan shogaol, dengan jumlah gingerol dan shogaol yang lebih tinggi (Anindita, 2018).

Hal ini mendeteksi vanillylacetone, 6-gingerol, shogaol, dan 1,4-cineol sebagai senyawa utama dalam ekstrak jahe melalui analisis HPLC. Pola HPLC yang diperoleh konsisten dengan laporan sebelumnya. 6-shogaol dan 6-gingerol merupakan senyawa bioaktif utama dalam jahe dengan berbagai efek menguntungkan, termasuk sifat analgesik dan anti-inflamasi. Baru-baru ini, senyawa fenolik termasuk 6-gingerol, 6-shogaol, dan zingerone dalam rimpang jahe ditemukan memiliki berbagai aktivitas farmakologis dan fisiologis dengan sifat anti-oksidan, anti-inflamasi, dan anti-kanker. Sehubungan dengan penyakit arthritis, telah dilaporkan sifat anti-katabolik dan anti-inflamasi dari 6-gingerol dan 6-shogaol pada arthritis tikus yang diinduksi oleh dinding sel streptokokus, dalam peradangan kronis tikus yang diinduksi *Complete Freund Adjuvant*, dan di kondrosit. 6-gingerol dikenal sebagai senyawa yang bertanggung jawab atas penurunan regulasi respon alergi yang dimediasi sitokin tipe Th<sub>2</sub> (Hwang *et al.*, 2017).

### 3. Aktivitas Antiarthritis

Faktor-faktor yang disebutkan di atas mempengaruhi perubahan pasca transkripsional dan melepaskan protein tersitrullinasi, faktor rheumatoid dan protein mandiri lainnya seperti vimentin,  $\alpha$ -enolase, histon, fibronectin, fibrinogen, dan kolagen. Protein ini tidak dianggap sebagai protein mandiri, sehingga *Anti Citrullinated Protein Antibodies* (ACPA) diproduksi sebagai respons terhadapnya. Beberapa mekanisme pensinyalan antar dan intraseluler terlibat dalam pembentukan kompleks imun. Sel mast, makrofag, dan sel pembunuh alami merupakan pemain penting dalam patologi perkembangan RA. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, dan IL-23 merupakan beberapa sitokin yang disekresikan oleh makrofag, terutama TNF- $\alpha$  dan IL-6 yang mengatur aktivasi sitokin dan kemokin yang memperburuk reaksi inflamasi dan menyebabkan kerusakan tulang rawan. Saat ini, DMARD biologis ekstra seluler spesifik seperti sarilumab dan adalimumab tersedia untuk mengurangi peradangan. Namun, NSAID hanya bertindak sebagai pengurang rasa sakit yang tepat waktu dan bukan memiliki modifikasi mekanistik jangka panjang dalam mencegah kerusakan sendi dan tulang (Murugesan *et al.*, 2020).

Manfaat terapeutik jahe untuk artritis termasuk efek analgesik dan anti-inflamasi yang baik. Ekstrak jahe mengurangi pelepasan mediator inflamasi, prostaglandin E2 (PGE2), *nitric oxide* (NO), dan sitokin inflamasi (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-6) pada makrofag dan sel sinovial. Ekstrak jahe dalam kisaran 100–500 mg/kg juga menekan peradangan sistemik akut yang diinduksi LPS dan peradangan kronis yang diinduksi bahan pembantu pada model hewan dan memperbaiki gejala lutut pasien OA. Berdasarkan temuan sebelumnya, peneliti menyelidiki efek anti artritis dari ekstrak jahe pada 100 dan 200 mg/kg pada tikus CIA dan pada fibroblas sinovial pasien RA, dengan fokus pada pengaturan sitokin Th<sub>1</sub> dan Th<sub>17</sub> dan MMP (Hwang *et al.*, 2017).

## **E. Tanaman Brotowali**

### **1. Sistematika Tanaman**

Berdasarkan penggolongan dan tata nama tumbuhan, tanaman brotowali termasuk kedalam klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom : Plantae  
 Divisi : Spermatophyta  
 Kelas : Monocotyledoneae  
 Filum : Menispermales  
 Ordo : Menispermaceae  
 Genus : *Tinospora*  
 Spesies : *Tinospora crispa* (Safitri, 2018).

### **2. Kandungan Kimia Tanaman**

Brotowali menunjukkan variasi yang luas namun sesuai dengan monografi standar. Analisis kualitatif ekstrak bagian batang brotowali menunjukkan adanya kandungan alkaloid, karbohidrat, glikosida, fitosterol, tanin, dan saponin pada ekstrak encer (Ramya & Maheswari, 2016). Brotowali banyak mengandung senyawa kimia yang efektif mengobati berbagai penyakit. Senyawa kimia ini terdapat di seluruh bagian mulai dari akar, batang hingga daun. Secara umum tanaman brotowal mengandung berbagai senyawa kimia seperti alkaloid, resin lunak, pati, glikosida, picoretoside, rosin, zat pahit picoretin, tinocrisposide, barberine, palmatine, columbine dan kaoculin. Alkaloid yang terkandung dalam tanaman ini berbahaya. Rasa pahitnya mempengaruhi pertahanan tanaman, karena mengurangi nafsu makan (anti

pemakan). Sifat ini dapat mempengaruhi tekanan osmotik antara hama dan habitatnya (Safitri, 2018).

### 3. Aktivitas Antiartritis

Sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-6, dan IL-1 $\beta$ ; kemokin seperti RANTES dan MCP-1; serta mediator biokimia seperti RANKL dan MMP memulai dan menyebarkan peradangan sendi dan kerusakan jaringan. Di antara sitokin pro-inflamasi, IL-17 telah terbukti memainkan peran penting dalam patogenesis artritis. Sitokin ini diproduksi oleh sel Th17 dan dapat memfasilitasi produksi sitokin proinflamasi lainnya seperti TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-6. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sitokin pro-inflamasi berkurang secara signifikan pada SAC (misalnya, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23, dan TNF $\alpha$ ) dan pengeringan LNC (misalnya, IL-17) pada tikus artritis yang diobati dengan TCE. Hasil ini diperkuat oleh penelitian yang menunjukkan bahwa sitokin proinflamasi juga berkurang pada supernatan kultur SIC (misalnya, IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-6, dan TNF $\alpha$ ) dan serum (misalnya, IL-1 $\beta$  dan IL-17.) dari tikus yang diobati dengan TCE. Namun, tidak banyak perubahan pada tingkat anti-inflamasi IL-10 dan sitokin lainnya (data tidak ditampilkan). Dengan demikian, TCE mengubah keseimbangan sitokin pro-versus anti-inflamasi terutama dengan menurunkan regulasi sitokin pro-inflamasi, khususnya IL-17 dan IL-1 $\beta$  (Sannegowda *et al.*, 2015).

## F. Tanaman Lidah Buaya

### 1. Sistematika Tanaman

Klasifikasi dari lidah buaya adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae  
 Divisi : Spermatophyta  
 Kelas : Monocotyledoneae  
 Ordo : Liliiflorae  
 Famili : Liliceae  
 Genus : Aloe  
 Spesies : Aloe vera (Sari, 2021)

### 2. Kandungan Kimia Tanaman

Sejumlah penelitian telah menunjukkan potensi penyembuhan AV yang luar biasa dan mengidentifikasi banyak senyawa bioaktif yang bertanggung

jawab atas penyembuhan luka. Struktur daun lidah buaya dikonfigurasi dalam bentuk tiga lapisan. Lapisan dalam terdiri dari gel transparan yang mengandung 99% air dan 1% bahan padat yang memampatkan lebih dari 75 senyawa berbeda (seperti glukomanan, asam amino, lipid, sterol, dan vitamin), lapisan tengah berupa lateks pahit dalam bentuk jus kuning kaya akan glikosida dan antrakuinon, dan lapisan luarnya adalah korteks tebal yang menghasilkan karbohidrat dan protein (Chelu *et al.*, 2023).

### 3. Aktivitas Antiartritis

Flavonoid merupakan senyawa yang paling banyak ditemukan pada tanaman obat. Flavonoid yang terkandung di dalamnya lidah buaya dapat meningkatkan fungsi sel neutrofil. Flavonoid berperan dalam membatasi pelepasan mediator inflamasi seperti IL-1, IL-6, IL-8, Interleukin  $\gamma$ , dan TNF- $\alpha$ . Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenolik terbesar yang memiliki sifat antiaktivitas inflamasi melalui penghambatan siklooksigenase dan lipoksigenase sehingga membatasi sejumlah sel inflamasi seperti sel neutrofil hingga jaringan yang meradang. Hal ini menyebabkan peradangan proses berlangsung lebih singkat sehingga perkembangbiakannya proses terjadi segera.

### G. Simplisia dan Penyarian

Secara umum pembuatan simplisia melalui tahapan sebagai berikut: pengumpulan simplisia, sortasi basah, pencucian, pemotongan, pengeringan, sortasi kering, pengepakan dan penyimpanan.

Tanaman dipanen dengan tangan dan seluruh bagian tanaman sambilanoto (*Andrographis paniculata* Nees.) yang berada di atas tanah diambil. Hal ini dilakukan untuk memisahkan kotoran atau benda asing lainnya dari tanaman sebelum dicuci, membuang bagian-bagian yang tidak diperlukan sebelum dikeringkan agar jamu layak digunakan. Cara ini bisa dilakukan secara manual. Hal ini dilakukan untuk menghilangkan tanah dan kotoran lain yang menempel pada tanaman. Pencucian dilakukan dengan air bersih, seperti mata air, air sumur atau air keran. Pencucian dilakukan sesingkat mungkin agar unsur hara tidak hilang dari tanaman. Penghancuran dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan, pengepakan dan penggilingan. Cuci seluruh tanaman di bawah sinar matahari selama sehari sebelum dipotong. Itu bisa dibalik dengan pisau atau potongan khusus. Mengering dengan kombinasi

sinar matahari dan sentuhan. Setelah dijemur di bawah sinar matahari selama sehari, dikeringkan pada suhu 45 °C selama 4 jam.

Hal ini dilakukan untuk memisahkan zat-zat asing seperti bagian tanaman yang tidak diinginkan dan kotoran lain yang tertinggal dalam media pengering. Proses ini dilakukan secara manual. Mudah pecah selama penyimpanan. Oleh karena itu, pilihlah wadah yang tidak beracun dan non-reaktif yang tidak menimbulkan reaksi atau perubahan warna, bau, rasa, dan lain-lain. Foil tahan panas memerlukan wadah untuk melindungi permukaan dari cahaya, seperti aluminium foil, wadah gelap atau plastik, kaleng. Simplisia kering dapat disimpan pada suhu ruangan (15 °C - 30 °C) (Rivai *et al.*, 2014).

Pembuatan serbuk Simplisia merupakan langkah awal pembuatan ekstrak. Bubuk simplisia dibuat dari bagian-bagian simplisia yang terbaik dan dikeringkan dengan menggunakan peralatan untuk membuat bubuk tersebut tanpa merusak atau menghilangkan seluruh simplisia dan komponen kimia yang diperlukan, dan menunggu hingga menjadi bubuk yang sangat halus. Derajat serbuk Simplisia yaitu serbuk sangat halus, serbuk murni, serbuk semi halus, serbuk halus dan serbuk sangat halus.

Ekstrak dibuat dengan cara maserasi menggunakan etanol 95%. Satu bagian serbuk kering herba sambiloto dimasukkan ke dalam maserator, ditambahkan 10 bagian etanol 95%, direndam selama 6 jam sambil sesekali diaduk, lalu didiamkan selama 24 jam. Perendaman dipisahkan dan proses diulangi sebanyak 2 kali dengan pelarut dan jumlah yang sama. Seluruh maserat dikumpulkan dan diuapkan dalam evaporator vakum hingga diperoleh ekstrak kental. Hasil yang diperoleh ditimbang dan dicatat.

Persentase rendemen dihitung berdasarkan rendemen yang diperoleh dan persentase berat (b/b) serbuk simplisia yang digunakan (Rivai *et al.*, 2014).

## **H. Pengujian Anti Arthritis dengan Metode CFA**

Beberapa model eksperimental telah dikembangkan pada tikus untuk menguji potensi manfaat obat anti arthritis, salah satunya adalah CFA. CFA adalah model eksperimental terbaik untuk mempelajari efek arthritis dan masih digunakan dalam uji coba RA awal (Noor, 2020).

Berbagai jenis protein yang berasal dari tulang rawan dapat digunakan untuk menginduksi arthritis pada tikus kolagen tipe II, kolagen tipe XI dan protein matriks oligomer tulang rawan. Dalam hal ini, peneliti fokus pada arthritis yang disebabkan oleh kolagen tipe II karena kolagen ini paling banyak

digunakan. Suntikan kolagen tipe II intradermal yang diemulsikan dalam bahan pembantu Freund yang tidak lengkap menyebabkan perkembangan poliartritis parah pada tikus DA dan Lewis, dimulai dua minggu setelah imunisasi. Cakar kaki depan dan belakang membengkak, yang berlangsung selama beberapa minggu, mengecil dan kemudian muncul kembali sehingga mengakibatkan radang sendi kronis dengan kejadian parah seperti malformasi pada kaki. tulang. Model tikus digunakan untuk mengatasi efek senyawa pada arthritis tahap akhir yang kronis. Kerentanan terhadap arthritis terkait dengan gen MHC tertentu. Karena sejumlah besar sel MHC kelas II terdapat pada sendi, dan telah dihipotesiskan bahwa antigen presenting cells (APC) ini berinteraksi dan mengaktifkan sel T CD4<sup>+</sup> yang terdapat pada sendi, sehingga mengakibatkan peradangan yang berkelanjutan. TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  adalah sitokin kunci pada tikus CIA.

Model ini dimulai pada strain tikus yang rentan dengan injeksi intradermal bahan CFA di pangkal ekor atau belakangnya. wilayah kaki. Latar belakang genetik tikus itu penting, karena gen *major histocompatibility complex* (MHC) dan non MHC berkontribusi terhadap kerentanan mereka terhadap AIA; Di mana okus sifat tertentu dikaitkan dengan tingkat keparahan penyakit. AIA ditandai dengan timbulnya dan perkembangan yang cepat terhadap peradangan poliartikular. Setelah 10–14 hari, gejala radang sendi dapat terlihat. Tingkat keparahan RA menurut induksi adjuvan menyebabkan malformasi sendi permanen, termasuk ankilosis. Dibandingkan dengan RA manusia, AIA berbagi gejala umum seperti pembengkakan sendi, limfosit infiltrasi dan degradasi tulang rawan.

Pada tikus dengan AIA, sel T yang diaktifkan dapat dideteksi di sendi yang meradang. Sendi tersebut diinfiltrasi dengan sel T yang berasal dari berbagai kompartemen termasuk limpa, Peyer tambalan, mengeringkan kelenjar getah bening dan sel T yang bersirkulasi kolam. Respon imun terlihat diinduksi oleh antigen *heat shock protein* (Hsp65), dengan peptide 180–186 menjadi epitop yang bertanggung jawab. Selama awal tahap peradangan, sitokin diekspresikan dalam sendi termasuk IL-17, IFN dan TNF- $\alpha$ , disertai sitokin terlibat dalam stimulasi makrofag. Sebagai tingkat keparahan peradangan berkembang di sendi, peningkatan kadar IL-4, IL-6, protein kemotaktik monosit 1 dan TGF- $\beta$  dapat terdeteksi. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-21 dan IL-17 semuanya terlibat dalam patologi penyakit ini (Choudhary *et al.*, 2018).

Suntikan PG-PS 10 S intra-peritoneal menginduksi artritis poliartikular pada tikus Lewis betina yang mengakibatkan peradangan akut respon dan pembengkakan sendi. Selama lima hari pertama, peradangan sendi berlangsung dan diikuti oleh a periode jeda, setelah itu terjadi reaktivasi yang cepat, mengakibatkan artritis kronis. Model ini memberikan peluang untuk mempelajari fase awal dan fase artritis yang lebih kronis. Respon awal yang diamati bukanlah sel T tergantung. Ada keterlibatan monosit di keduanya fase akut dan perkembangan lebih lanjut dari artritis. Selama fase kronis, tingkat keparahan artritis dapat dikorelasikan dengan status aktivasi sel T, sel B dan monosit. Ada juga keterkaitan antara derajat peradangan dan produksi TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1. Beberapa ciri khas model ini pada kemiripannya RA pada manusia meliputi hiperplasia sinovial, infiltrasi sel inflamasi, keterlibatan sendi simetris, dan peradangan relaps (Choudhary *et al.*, 2018).

Artritis yang parah bisa jadi diinduksi pada strain tikus, terutama DA dan Lewis, melalui imunisasi dengan COMP asli dan terdenaturasi di IFA (*incomplete Freund's adjuvant*). Sediaan COMP yang dilarutkan diemulsi dengan jumlah IFA yang sama. Setiap tikus disuntik secara intradermal dengan COMP di pangkal ekor. Dalam kasus yang parah artritis, COMP dilepaskan dari tulang rawan selama erosi jaringan. Ini adalah fitur menarik dari COMP dan ini menjadikannya penanda artritis yang berguna pada RA. KOMP adalah juga dilepaskan pada tikus yang menderita radang sendi kronis setelah induksi dengan pristane, bahan pembantu dengan berat molekul rendah, dan kadar dalam serum berkorelasi kuat dengan terjadinya artritis erosif (Choudhary *et al.*, 2018).

Model hewan baru untuk rheumatoid radang sendi yang diinduksi dengan bantuan minyak pembantu sintetik yang terdefinisi dengan baik, pristane. Tikus mengalami radang sendi yang parah dan kronis, dalam waktu dua minggu, setelah suntikan intradermal tunggal 150 ul pristane. Peradangan terbatas pada persendian dan melibatkan pembentukan pannus, ekspresi MHC kelas II dan Infiltrasi limfosit T. Penyakit ini bergantung pada sel T. Di dalam Model PIA, erosi sendi disertai peninggian kadar protein matriks oligomer tulang rawan. Penyakitnya adalah sangat berbeda dari model tikus yang diinduksi murni karena tidak ditemukan kelainan sistemik dan bahwa peradangan hanya terbatas pada sendi (Choudhary *et al.*, 2018).

## I. Landasan Teori

Tanaman sambiloto ini dengan ciri kimia pahit, berasa dingin, daunnya mengandung komposisi kimia sebagai berikut: daun dan rantingnya mengandung lakton yang terdiri dari andrographolide, deoxyandrographolide, 11,12-didehydro-14-deoxyandrographolide dan neoandrographolide. Andrographolide (AD) merupakan senyawa bioaktif diterpenoid penting yang berasal dari *Andrographis paniculata* dengan berbagai aktivitas farmakologis, termasuk efek hepatoprotektif, anti angiogenik, anti trombotik, anti inflamasi dan anti artritis. Sitokin dan mediator yang diproduksi neutrofil dapat meningkatkan respons inflamasi pada artritis reumatoid. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa mediator inflamasi, termasuk sitokin, kemokin, dan *reactive oxygen species* (ROS), memiliki efek pleiotropik pada perkembangan peradangan. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A, dan IFN- $\gamma$  mempunyai efek penting dalam merekrut dan mengaktifkan neutrofil. Sitokin inflamasi ini dapat memperkuat respon imun dengan menginduksi produksi sitokin dan kemokin lain. Sitokin ini juga terlibat dalam patogenesis RA dengan mengaktifkan kondrosit dan osteoklas. Sebagai faktor sitokin anti-inflamasi, IL-10 memiliki kapasitas untuk menghambat aktivasi, migrasi, dan degranulasi neutrofil. Menargetkan sitokin inflamasi termasuk TNF- $\alpha$ , IL-17A, dan IL-6 adalah strategi penting untuk pengobatan RA. Dalam penelitian ini, peneliti menemukan bahwa pengobatan AD mengurangi kadar sitokin pro-inflamasi (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17A) sekaligus meningkatkan kadar sitokin anti-inflamasi IL-10 pada pasien. Data ini menunjukkan bahwa AD mempunyai efek anti-inflamasi sistemik pada tikus AA (Li *et al.*, 2019).

Pemberian ekstrak rambut secara oral menunjukkan efek anti-inflamasi yang sangat signifikan pada tikus PID yang diinduksi patogen. Efek anti-inflamasi ditunjukkan pada menghambat invasi neutrofil dan limfosit serta mengurangi produksi sitokin dan kemokin NF- $\kappa$ B adalah kompleks protein yang berikatan secara kovalen dengan I $\kappa$ B yang terletak di sitoplasma sel istirahat. Ketika TLR mengenali patogen pada permukaan sel, I $\kappa$ B terfosforilasi dan terdegradasi sehingga NF- $\kappa$ B bertranslokasi ke nukleus dan berikatan dengan elemen penambah NF $\kappa$ B yang bekerja cis, memicu ekspresi mediator proinflamasi seperti IL-1 $\beta$ . Analisis kimia menunjukkan bahwa jahe mengandung lebih dari 400 senyawa berbeda. Namun senyawa fenoliknya adalah gingerol, paradol dan shogaol, sedangkan gingerol dan shogaol ditemukan dalam jumlah yang lebih tinggi (Anindita, 2018).

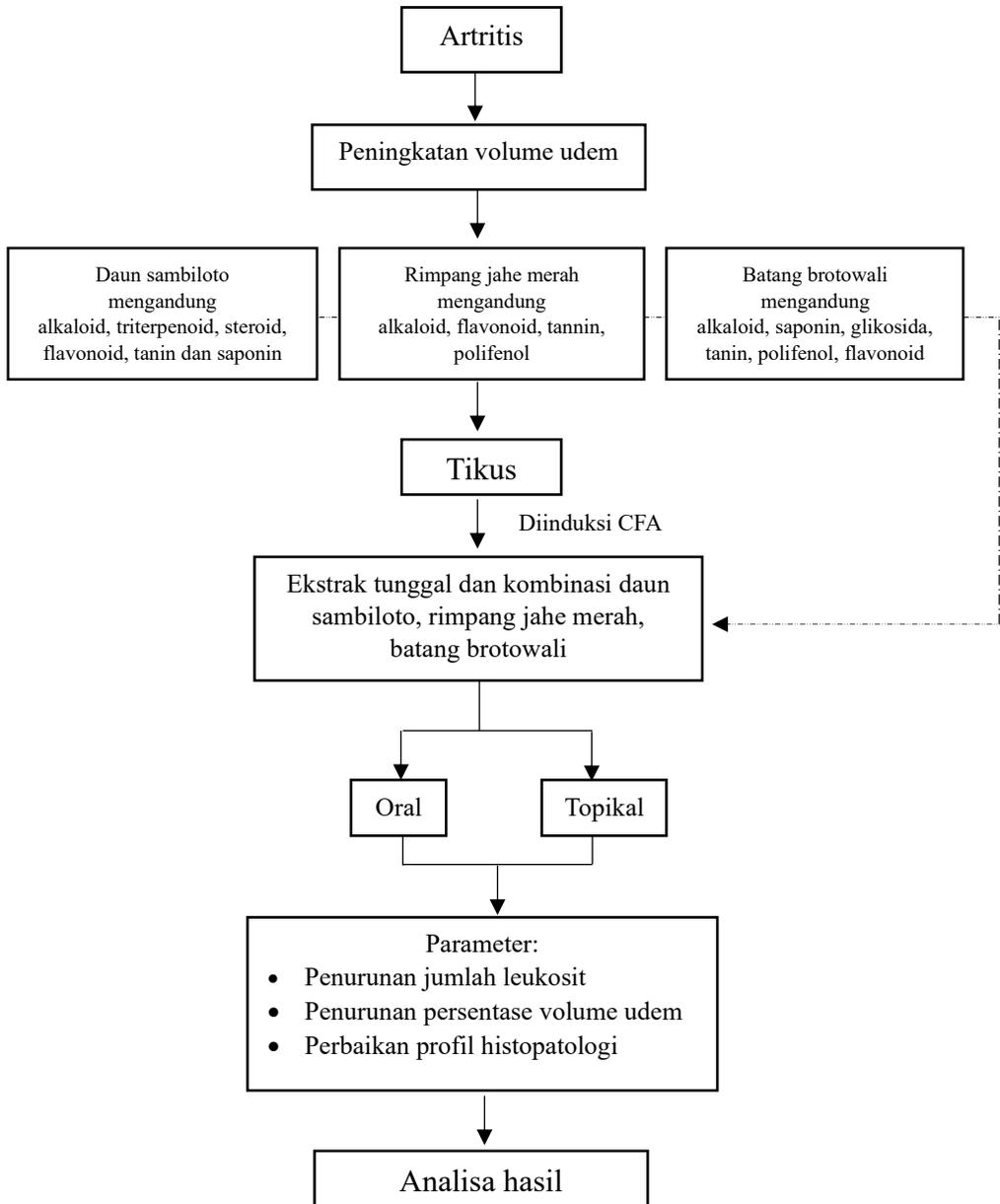
Sehingga mengidentifikasi vanillyl aseton, 6-gingerol, shogaol dan 1,4-cineole sebagai senyawa utama dalam ekstrak jahe melalui analisis HPLC. 6-shogaol dan 6-gingerol merupakan senyawa bioaktif utama dalam jahe dengan berbagai efek menguntungkan, termasuk efek analgesik dan anti inflamasi. Baru-baru ini, senyawa fenolik dalam jahe, termasuk 6-gingerol, 6-shogaol dan zingerone, ditemukan memiliki berbagai efek farmakologis dan fisiologis dengan sifat antioksidan, anti-inflamasi dan anti-kanker. Sifat anti-katabolik dan anti-inflamasi dari 6-gingerol dan 6-shogaol telah dilaporkan pada penyakit rematik pada artritis yang disebabkan oleh dinding sel streptokokus tikus pada peradangan tikus kronis CFA. 6-Gingerol dikenal sebagai senyawa yang bertanggung jawab atas regulasi respons alergi yang dimediasi oleh sitokin tipe Th<sub>2</sub> (Hwang *et al.*, 2017). Namun, NSAID hanya bertindak sebagai pereda nyeri yang tepat waktu dan tidak memiliki perubahan mekanis jangka panjang untuk mencegah sendi dan kerusakan tulang (Murugesan *et al.*, 2020).

Manfaat terapeutik jahe untuk artritis termasuk efek analgesik dan anti-inflamasi yang baik. Ekstrak jahe mengurangi pelepasan mediator inflamasi, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), *nitric oxide* (NO), dan sitokin inflamasi (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-6) pada makrofag dan sel sinovial. Ekstrak jahe dalam kisaran 100 - 500 mg/kg juga menekan peradangan sistemik akut yang diinduksi LPS dan peradangan kronis yang diinduksi bahan pembantu pada model hewan dan memperbaiki gejala lutut pasien OA. Berdasarkan temuan sebelumnya, peneliti menyelidiki efek anti-artritis dari ekstrak jahe pada 100 dan 200 mg/kg pada tikus CIA dan pada fibroblas sinovial pasien RA, dengan fokus pada pengaturan sitokin Th<sub>1</sub> dan Th<sub>17</sub> dan MMP (Hwang *et al.*, 2017).

CFA adalah model eksperimental terbaik untuk mempelajari efek artritis dan masih digunakan dalam penelitian RA awal (Noor, 2020). Berbagai jenis protein yang berasal dari tulang rawan dapat digunakan untuk menginduksi artritis kolagen tipe II, kolagen tipe XI, dan protein matriks oligomer tulang rawan pada tikus. Injeksi kolagen tipe II intradermal yang diemulsi dalam bahan *incomplete freund adjuvant* menyebabkan poliartritis parah pada tikus DA dan Lewis mulai 2 minggu setelah imunisasi. Kuku kaki depan dan belakang menjadi bengkak, berlangsung selama beberapa minggu, mengecil, lalu kambuh lagi. Akibatnya adalah artritis kronis dengan konsekuensi serius seperti kelainan bentuk kaki. Suntikan PG-PS 10S intraperitoneal menginduksi artritis poliartikular pada tikus DA dan Lewis, menyebabkan respon inflamasi akut dan pembengkakan sendi. Peradangan

sendi berlangsung selama lima hari pertama, kemudian berhenti, tetapi kemudian aktif kembali dengan cepat, menyebabkan artritis kronis. Model ini memberikan kesempatan untuk mempelajari artritis tahap awal dan lebih kronis. Hal ini dapat diinduksi pada model tikus, khususnya model DA dan Lewis, dengan menyuntikkan COMP asli dan pewarnaan dalam IFA (dengan efek tambahan Freund yang minimal). Pada rematik parah, COMP dilepaskan dari tulang rawan selama kontraksi otot. Kadar KOMP serum juga diberikan kepada tikus dengan penyakit ginjal kronis setelah infus norphytane, senyawa dengan berat molekul rendah, dan berkorelasi signifikan dengan adanya penyakit (Choudhary *et al.*, 2018).

## J. Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 1. Kerangka Konsep Penelitian

## **K. Hipotesis**

Berdasarkan uraian di atas dapat disusun suatu hipotesis dalam penelitian ini bahwa:

1. Pemberian ekstrak etanol tunggal daun sambiloto, rimpang jahe merah dan batang brotowali memiliki aktivitas antiartritis dalam bentuk oral dan topikal.
2. Pemberian ekstrak etanol kombinasi daun sambiloto, rimpang jahe merah dan batang brotowali memiliki aktivitas antiartritis dalam bentuk oral dan topikal.
3. Pemberian ekstrak etanol daun sambiloto, rimpang jahe merah dan batang brotowali memiliki aktivitas antiartritis yang paling baik terhadap pengujian *in vivo* yaitu penurunan udem, penurunan angka leukosit dan perbaikan secara gambaran histopatologi.