

1. ANTI TOXIC EFFECT
2. INFLAMMATION
TESIS

KU
TKG. OS/0-
Budi
P

**PENGARUH PEMBERIAN NIMESULIDE (*COX2INHIBITOR*)
TERHADAP KADAR *MALONDIALDEHYD* (MDA)
PADA JARINGAN TELAPAK KAKI TIKUS
YANG DIINDUKSI KARAGEN**



Oleh :

**HENDRIK SETIA BUDI
090214783 M**

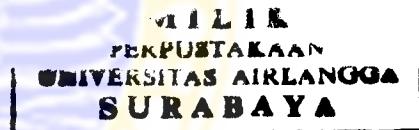
**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2005

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN NIMESULIDE (*COX2INHIBITOR*)
TERHADAP KADAR *MALONDIALDEHYD* (MDA)
PADA JARINGAN TELAPAK KAKI TIKUS
YANG DIINDUKSI KARAGEN**

**Untuk memperoleh Gelar Magister
Dalam Progam Studi Ilmu Kesehatan Gigi
Pada Progam Pascasarjana Universitas Airlangga**



Oleh :

**HENDRIK SETIA BUDI
090214783 M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2005

Lembar Pengesahan

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL, 3 JANUARI 2005**

Oleh :

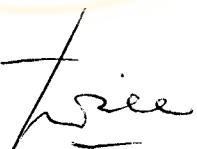
Pembimbing Ketua


Sri Agus Sudjarwo, drh. phD

NIP. 131 406 098

Mengetahui,

**Ketua Program Studi
Ilmu Kedokteran Gigi**



Dr. Trijodani Widodo, drg. M.Kes

NIP. 130 368 691

Telah diuji

Tanggal, 13 Januari 2005

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. R. Darmawan S., drg. MKes

Anggota :

- 1. Drh. Sri Agus Sudjarwo, PhD**
- 2. M. Soedjak N., dr. SpFK**
- 3. Eha Renwi A., drg. MKes. SpRKG**
- 4. Aniek Setiya B., dra. MS. Apt**



UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga tesis yang berjudul **“PENGARUH PEMBERIAN NIMESULIDE (COX-2 INHIBITOR) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHYD (MDA) PADA JARINGAN TELAPAK KAKI TIKUS YANG DIINDUKSI KARAGEN “** dapat terselesaikan dengan baik.

Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati yang paling dalam, saya menyampaikan ucapan terima kasih dan apresiasi yang sebesar-besarnya kepada :

- Prof. Drg. Retno Lakminingsih Soebagyo, MHPEd, (Alm), selaku pembimbing ketua yang selalu memberikan masukan , bimbingan, semangat serta dorongan sehingga tesis ini dapat terselesaikan.
- Drh. Sri Agus Soedjarwo, PhD, selaku pembimbing yang menyediakan waktunya untuk membimbing, mendorong, mengarahkan dan memberikan masukkan sejak penulisan awal hingga tesis ini terselesaikan.
- Prof. Dr. med. H. Puruhito, dr, selaku Rektor Universitas Airlangga yang memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Magister ini.
- Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr, selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Magister ini.

- Prof. DR. Drg. M Rubianto, MS. SpPerio, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Magister ini.
- Dr. drg. Trijoedani Widodo, M.Kes, selaku Kepala Program Studi Ilmu Kedokteran Gigi Pascasarjana Universitas Airlangga dalam memberikan kesempatan, masukkan dan arahan sehingga tesis ini terselesaikan.
- Drg. Markus Budi R., Mkes, selaku Kepala Laboratorium Biologi Oral yang memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh Program Pascasarjana di Universitas Airlangga.
- dr. Hamzah, SpFK, selaku Kepala Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang memberikan ijin menggunakan peralatan laboratorium serta masukan dan arahan sehingga tesis ini terselesaikan.
- Rekan-rekan sejawat di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Unair dan Laboratorium Biologi Oral Fakultas Gigi Unair yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu dalam membantu terselesainya tesis ini.
- Istri saya tercinta, Rachmi Irawati, SE yang selalu memberikan semangat selama proses penulisan tesis ini dan anak-anak tersayang Maura dan Arya.
- Tidak lupa orang tua tercinta yang selalu mendoakan dan memberikan semangat dalam menyelesaikan studi di Pascasarjana Universitas Airlangga.

Semoga penulisan tesis ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Surabaya, Januari 2005

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
Lembar Prasyarat Gelar.....	ii
Lembar Pengesahan.....	iii
Susunan Panitia Penguji.....	iv
Ucapan Terima Kasih.....	v
Ringkasan.....	vi
Summary.....	viii
Abstrak.....	x
Daftar isi.....	xi
Daftar gambar.....	xv
Daftar tabel.....	xvi
Daftar lampiran.....	xvii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Permasalahan.....	5
1.3. Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1 Tujuan Umum.....	6
1.3.2 Tujuan Khusus.....	6
1.4. Manfaat Penelitian.....	7
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. Oksidan dan Radikal Bebas.....	8
2.1.1 Senyawa oksigen reaktif.....	9

2.1.2 Pembentukan senyawa oksigen reaktif.....	11
2.1.3 Peranan radikal bebas terhadap penyakit	13
1. Peranan radikal bebas pada DNA.....	14
2. Peranan radikal bebas pada Asam Lemak Tak Jenuh Jamak (PUFA).....	15
3. Peranan radikal bebas pada Protein.....	16
2.2. Antioksidan.....	17
2.2.1 Antioksidan pencegah.....	18
2.2.2 Antioksidan pemutus reaksi rantai	18
2.3. Tinjauan Tentang <i>Nonsteroid Anti Inflammatory Drugs</i> (NSAID).....	19
2.3.1 Obat-obat nonsteroid anti inflamasi.....	19
2.3.2 Mekanisme kerja NSAID.....	19
2.3.3 Nimesulide.....	22
1. Struktur kimia.....	22
2. Farmakokinetik.....	22
3. Farmakodinamik.....	22
4. Peranan Nimesulide terhadap radikal bebas	23
2.4. Karagen	25
2.4.1 Metode pengujian efek anti-inflamasi.....	26
2.4.2 Pengukuran edema telapak kaki tikus.....	28
BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA	29
3.1. Kerangka Konseptual.....	29
3.2. Hipotesis.....	30

BAB IV METODE PENELITIAN.....	31
4.1. Jenis Penelitian.....	31
4.2. Rancangan Penelitian.....	31
4.3. Unit Sampel.....	31
4.4. Besar Sampel.....	31
4.5. Variabel Penelitian.....	32
4.5.1 Variabel tergantung.....	32
4.5.2 Variabel bebas.....	32
4.5.3 Variabel terkendali.....	32
4.6. Definisi Operasional.....	32
4.7. Bahan.....	33
4.8. Alat.....	33
4.9. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	33
4.10. Prosedur Penelitian.....	33
4.10.1 Tahap Persiapan.....	33
4.10.2 Tahap perlakuan.....	34
4.10.3 Penetapan kadar MDA dalam jaringan.....	35
4.11. Analisa Data.....	36
4.12. Skema Penelitian.....	37
BAB V. HASIL PENELITIAN.....	38
5.2. Efek Hambatan Nimesulide Terhadap Kadar <i>Malondialdehyd</i> (MDA).....	38
5.1. Efek Hambatan Nimesulide Terhadap Volume Edema.....	40

5.3. Hubungan antara Hambatan Kadar

<i>Malondialdehyd (MDA) Terhadap Volume Edema</i>	42
BAB VI. PEMBAHASAN.....	44
BAB VII. KESIMPULAN dan SARAN.....	50
7.1. Kesimpulan.....	50
7.2. Saran.....	50
DAFTAR PUSTAKA.....	51



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Kerusakan jaringan pada stress oksidatif.....	13
Gambar 2.2. Pembentukan radikal bebas oksigen.....	16
Gambar 2.3. Ratio COX-2/ COX-1.....	20
Gambar 2.4. Klasifikasi NSAID.....	21
Gambar 2.5. Struktur kimia Nimesulide.....	22
Gambar 5.1. Pengaruh pemberian Nimesulide terhadap kadar MDA jaringan telapak kaki tikus.....	38
Gambar 5.2. Pengaruh pemberian Nimesulide terhadap volume edema telapak kaki tikus.....	40
Gambar 5.3. Hubungan kadar MDA terhadap volume edema	42

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Oksidan dan sifatnya.....	9
Tabel 5.1. Rerata dan simpangan baku hambatan Nimesulide terhadap kadar MDA dari masing-masing kelompok perlakuan.....	38
Tabel 5.2. Uji LSD hambatan Nimesulide terhadap kadar MDA antar kelompok perlakuan.....	39
Tabel 5.3. Rerata dan simpangan baku hambatan Nimesulide terhadap volume oedem dari masing-masing kelompok perlakuan.....	40
Tabel 5.4. Uji LSD hambatan Nimesulide terhadap volume oedem antar kelompok perlakuan.....	41



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Tabel konversi dosis	55
Lampiran 2. Foto pelaksanaan penelitian	57
Lampiran 3. Data pengukuran volume oedem	59
Lampiran 4. Penghitungan kadar MDA	62
Lampiran 5. Data absorban dan berat jaringan	63
Lampiran 6. kadar MDA	65
Lampiran 7. Analisa statistik	67



BAB I

PENDAHULUAN

**BAB I
PENDAHULUAN**

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

1.1 Latar Belakang Masalah

Inflamasi atau radang merupakan reaksi jaringan hidup terhadap semua bentuk jejas. Radang sebenarnya adalah respon yang menguntungkan dari pertahanan tubuh untuk menetralisasi dan membuang agen penyerang, penghancuran jaringan nekrosis dan pembentukan keadaan yang dibutuhkan untuk perbaikan jaringan. Selama terjadinya proses inflamasi, banyak mediator yang dilepaskan secara lokal antara lain histamin, 5-hidroksitriptamin (5-HT), faktor kemotaktik, bradikinin, leukotrien dan prostaglandin. Prostaglandin dan leukotrien dilepaskan karena adanya rangsangan mekanik, kimia, suhu, dan bakteri, yang berperan penting sebagai tanda-tanda dan gejala tejadinya inflamasi. Adanya beberapa mediator inflamasi pada daerah radang menyebabkan perubahan permeabilitas dan aliran pembuluh darah lokal, sehingga tampak adanya edema pada daerah tersebut (Goodman and Gilman's, 2001). Bahan kimia seperti bradikinin, IL-1 dan karagen dapat digunakan untuk menimbulkan inflamasi. Pembentukan edema pada kaki tikus menunjukkan adanya hubungan sinergis antara beberapa mediator inflamasi dengan meningkatnya permeabilitas pembuluh darah dan meningkatnya aliran darah (Lalenti *et al.*, 1995). Beberapa model penelitian pada pada kaki tikus yang diinduksi karagen menunjukkan adanya pelepasan histamin, 5-Hidrotriptamin, bradikinin dan prostaglandin, dan kemudian terjadi infiltrasi neutrofil serta pembentukan radikal bebas seperti hidrogen peroksid, superoksid dan radikal hidroksil (Dawson *et al.*, 1991).

Radikal bebas merupakan suatu molekul jumlah elektron ganjil atau elektron tidak berpasangan tunggal dalam lingkaran luarnya. Elektron tidak berpasangan tersebut menyebabkan instabilitas dan bersifat reaktif. Hilang atau bertambahnya satu elektron pada molekul lain menciptakan radikal bebas baru dan mengakibatkan perubahan fisik dan kimiawi (Setiati, 2003). Radikal bebas diproduksi secara endogen dan dapat juga diperoleh secara eksogen. Secara endogen, radikal bebas diproduksi oleh mitokondria, membrane plasma, lisosom, retikulum endoplasma dan inti sel. Secara eksogen, radikal bebas berasal dari asap rokok, polutan, radiasi, obat-obatan dan pestisida. Sumber utama reaksi radikal bebas pada mamalia adalah pada rantai pernapasan, proses fagositosis, sintesa prostaglandin, sistem sitokrom P-450, reaksi non enzimatik O₂ dan radiasi ion (Setiati, 2003). Radikal bebas peroksil (R0[•]) dan alkosil (R0[•]) juga dapat disintesa oleh asam lemak tidak jenuh seperti pada aktivasi lipokksigenase dan siklooksigenase (Cuzzocrea *et al.*, 1999). Kemampuan makrofag dalam melepaskan IL-1 dan TNF dapat secara langsung mengawali produksi radikal bebas melalui perangsangan pelepasan prostaglandin (PGE-2). Sitokin ini akan meningkatkan pembentukan radikal bebas sebagai perantara kerusakan jaringan (Ward *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2002). Pada fase radang akut pertahanan tubuh yang banyak berperan adalah sel-sel fagositik misalnya sel polimorfonuklear (PMN cells). PMN mampu memfagosit dan membunuh bakteri melalui mekanisme *oxygen-dependent* dan *oxygen-independent* melalui aktivasi NADPH oksidase yang bertanggung jawab pada pembentukan *superoxide*, *singlet oxygen*, dan *hidroxyl radical*. Reaktif oksigen tersebut dilepaskan oleh PMN dan dapat



menyebabkan kerusakan jaringan disamping untuk membunuh bakteri (*Shapira et al.* 1994; *Geronikaki et al.*, 2003).

Kondisi inflamasi dapat merangsang terbentuknya radikal bebas melalui proses fagositosis dan sintesa prostaglandin yang dapat menghasilkan O_2^- , H_2O_2 , NO^- , HOCl (Cuzzocrea *et al.*, 1999; Nakagawa, 1999). Proses fagositosis ini akan menghasilkan sejumlah besar superoksid sebagai bagian dari mekanisme yang bertujuan untuk membunuh mikroorganisme asing. Jika radang akut tidak dapat mengatasi, maka akan berlanjut ke proses radang kronis yang menyebabkan terjadinya pengumpulan superoksid sehingga kerusakan jaringan semakin bertambah (Bellanti, 1993). Pada proses inflamasi kronis mekanisme perlindungan tersebut justru akan bersifat merusak (Wijaya, 1996). Apabila pertahanan tubuh tidak betul-betul efektif, maka dapat menyebabkan peningkatan pembentukan radikal bebas. Hal ini akan mengakibatkan kerusakan jaringan yang lebih luas dan dinyatakan sebagai stress oksidatif. Jadi kegagalan sistem antioksidan dalam tubuh akan menyebabkan hilangnya perlindungan terhadap serangan oksidan (Wijaya, 1996). Aktivitas oksidan atau radikal bebas tersebut dapat dihambat oleh anti-oksidan. Dalam pengertian kimia, antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron, tetapi dalam arti biologis, antioksidan adalah senyawa yang dapat meredam dampak aktivitas oksidan (Suryohusodo, 1997; Lin *et al.*, 2000).

Komponen penting dalam membran sel adalah fosfolipid, glikolipid dan kolesterol, yang sangat rawan terhadap serangan radikal, terutama radikal hidroksil. Radikal hidroksil dapat menimbulkan reaksi rantai yang dikenal dengan lipid peroksidasi. Akibat dari reaksi rantai tersebut adalah terputusnya rantai

karbon asam lemak yang menghasilkan senyawa aldehid-aldehid seperti malondialdehid (MDA), 9-hidroksi nonenal serta senyawa hidrokarbon seperti etana (C_2H_6), pentana (C_5H_{12}) yang bersifat toksik terhadap sel (Wijaya, 1996; Suryohusodo, 1997). Penentuan kadar *malondialdehid* (MDA) yang terdeteksi pada jaringan dianggap proporsional dengan konsentrasi lipid peroksidasi (Okhawa *et al.*, 1979). Pelepasan radikal bebas banyak dijumpai pada penyakit degenerasi seperti penyakit jantung, arthritis, kanker, periodontitis, penyakit liver, katarak, diabetes, penyakit gastrointestinal, penyakit autoimun dan asma (Stohs , 1995; Droege , 2002).

Di bidang kedokteran Gigi, penggunaan obat nonsteroid anti-inflamasi (NSAID) sering diberikan setelah dilakukan tindakan pencabutan gigi maupun tindakan bedah lainnya. Pada kasus keradangan gigi seperti pulpitis akut dengan gejala nyeri selain dilakukan tindakan endodontik masih diperlukan pula obat analgesik-anti inflamasi (Akbar, 2001). Banyaknya NSAID yang beredar di pasaran sebagai analgesik dan anti piretik, misalnya: aspirin, parasetamol, ibuprofen, asam mefenamat, endometasin, diklofenak, piroksikan, celecoxib, nimesulide. Oleh karena itu diperlukan pemilihan obat sesuai indikasi klinik dengan memperhatikan efek samping obat (Soebagyo, 2001).

Penghambat siklooksigenase-1 (*COX-1 inhibitor*) menghambat prostaglandin yang secara fisiologis diperlukan dalam menjaga homeostasis tubuh, sehingga dapat menyebabkan gangguan pada mukosa lambung, sedangkan penghambat siklooksigenase-2 (*COX-2 inhibitor*) hanya menghambat prostaglandin pada tempat inflamasi (Goodman and Gilman's, 2001). Secara umum NSAID memiliki efektivitas dan tolerabilitas yang baik, namun seiring

dengan berkembangnya teori baru, yaitu bahwa NSAID golongan penghambat *COX-1* cenderung akan menghasilkan efek samping yang merugikan seperti gangguan gastrointestinal, gangguan fungsi ginjal dan memperpanjang waktu perdarahan, maka akhir-akhir ini ada kecenderungan untuk memilih NSAID golongan penghambat *COX-2* yang lebih sedikit menghasilkan efek samping.

Nimesulide merupakan salah satu NSAID golongan penghambat COX-2 selektif yang mempunyai efek anti-inflamasi, analgesik dan antipiretik dengan mula kerja yang cepat. Obat ini dapat pula menghambat phosphodiesterase IV yang menyebabkan peningkatan cAMP (*cyclic Adenosin Monophosphat*). Peningkatan cAMP akan merangsang pelepasan protein kinase A sehingga menyebabkan hambatan aktivitas NADPH oksidase dan kemotaksis (Davis and Brogden, 1994).

Dengan adanya peranan Nimesulide dalam menghambat sintesa prostaglandin melalui hambatan enzim siklookksigenase dan hambatan aktivitas NADPH oksidase yang berperan dalam pembentukan radikal bebas, maka perlu diteliti apakah pemberian Nimesulide (*COX-2 inhibitor*) dapat mempengaruhi kadar MDA pada jaringan telapak kaki tikus yang diinduksi karagen.

1.2 Permasalahan

Berdasarkan uraian diatas bahwa adanya peranan inflamasi dalam merangsang terbentuknya radikal bebas , maka dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Apakah pemberian Nimesulide mempengaruhi kadar *malondialdehyde* (MDA) pada jaringan telapak kaki tikus yang diinduksi karagen ?

1. Apakah pemberian Nimesulide mempengaruhi volume edema pada telapak kaki tikus yang diinduksi karagen ?
2. Apakah terdapat hubungan antara kadar *malondialdehyde* (MDA) dengan volume edema akibat pemberian Nimesulide ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Secara umum tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek Nimesulide terhadap kadar *malondialdehyd* (MDA) pada jaringan telapak kaki tikus putih (wistar) yang diinduksi karagen.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan bahwa pemberian Nimesulide mempengaruhi kadar *malondialdehyde* (MDA) pada jaringan telapak kaki tikus yang diinduksi karagen
2. Membuktikan bahwa pemberian Nimesulide mempengaruhi volume edema pada telapak kaki tikus yang diinduksi karagen
3. Membuktikan adanya hubungan antara kadar *malondialdehyde* (MDA) dengan volume edema akibat pemberian Nimesulide.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat dalam memberikan informasi ilmiah tentang pengaruh pemberian Nimesulide terhadap hambatan pembentukan radikal bebas yang juga berperan dalam proses inflamasi sehingga kerusakan jaringan dari akibat yang ditimbulkannya tidak semakin luas atau tidak berlanjut.





BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Oksidan dan Radikal Bebas

Dalam kedokteran pengertian oksidan dan radikal bebas sering dibaurkan, karena keduanya memiliki sifat-sifat yang mirip. Aktivitas kedua jenis senyawa ini sering menghasilkan akibat yang sama walaupun prosesnya berbeda. Sebagai contoh dampak H_2O_2 (hidrogen peroksid) dan radikal bebas OH (radikal hidroksil) terhadap glutation (GSH) :

a. H_2O_2 :



b. $\cdot OH$:



(radikal glutation)



Radikal bebas merupakan suatu molekul jumlah elektron ganjil atau elektron tidak berpasangan tunggal dalam lingkaran luarnya. Elektron tidak berpasangan tersebut menyebabkan instabilitas dan bersifat reaktif. Hilang atau bertambah satu elektron pada molekul lain menciptakan radikal bebas baru dan mengakibatkan perubahan secara fisik dan kimiawi (Setiati, 2003).

Jelaslah bahwa radikal bebas memiliki dua sifat yaitu :

- a. Reaktivitasnya yang tinggi, karena kecenderungan untuk menarik elektron.
- b. Dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal baru

Sifat radikal bebas yang mirip dengan oksidan terletak pada kecenderungannya untuk menarik elektron, jadi sama halnya dengan oksidan. Oleh karena itu radikal bebas digolongkan dalam oksidan, namun tidak setiap oksidan merupakan radikal bebas (Suryohusodo, 1997).

2.1.1 Senyawa oksigen reaktif

Oksidan yang terlibat dalam berbagai poses patologis sebagian besar merupakan oksidan endogen yang terbentuk dalam tubuh kita sendiri, yang disebut sebagai senyawa oksigen reaktif (Reactive Oxygen Compound, ROC, atau Reactive Oxygen species, ROS). ROS sebagian berbentuk radikal seperti radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$), radikal peroksil ($\cdot\text{OOH}$) dan superoksid (O_2^-), sebagian lagi bukan radikal yaitu hydrogen peroksid (H_2O_2), anion hipoklorit (ClO^-) dan oksigen singlet ($^1\text{O}_2$) (Suryohusodo, 1997; Stohs, 1995). Aktivitas senyawa ROS dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 2.1. Oksidan dan sifatnya (Setiati, 2003)

Nama	Sifat
Radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$)	Oksidan paling kuat Masa paruhnya pendek Bereaksi di tempat terbentuknya Menyerang kebanyakan molekul biologi Menyebabkan reaksi berantai radikal bebas
Anion superoksid (O_2^-)	Tidak aktif Oksidan lemah Lebih kuat sebagai reduktan kompleks Fe Penting sebagai sumber ($\cdot\text{OH}$) dan (H_2O_2)

Nitrogen monoksid (NO)	Radikal fisiologis Mediator tonus pembuluh darah
Peroksinitrit (NO_3^-)	Oksidan kuat, dihasilkan $\text{NO} + \text{O}_2^-$
Asam hipoklorit(HOCl)	Diproduksi fagosit aktif dari H_2O_2
Logam transisi contoh Fe, Cu	Valensi variabel, penting dalam reaksi biologis

Dalam keadaan fisiologis peristiwa ini terjadi di mitokondria, melalui apa yang disebut rantai respirasi. Pada peristiwa ini NADH bertindak sebagai senyawa pelepas elektron. Diantara senyawa-senyawa oksigen reaktif, radikal hidoksil ($^{\bullet}\text{OH}$) merupakan senyawa yang paling reaktif dan oleh karena itu menjadi yang paling berbahaya (Wijaya, 1996; Suryohusodo, 1997).

Reaksi radikal bebas dapat terjadi melalui beberapa tahapan, yaitu :
(Suryohusodo, 1997)

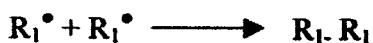
1. Tahap inisiasi, yaitu tahapan yang menyebabkan terbentuknya radikal bebas.



2. Tahap propagasi, yaitu tahap dimana radikal bebas cenderung bertambah banyak dengan membuat reaksi berantai dengan molekul lain.



3. Tahap terminasi, apabila terjadi reaksi lagi antara radikal bebas dan radikal bebas lain atau antara radikal bebas dengan senyawa pembasmi radikal (scavenger).



Daya perusak radikal bebas dengan demikian jauh lebih besar dibandingkan dengan oksidan biasa. Karena reaktivitasnya yang tinggi, radikal bebas umumnya tidak stabil dan umurnya sangat pendek sehingga sulit dideteksi kecuali dengan menggunakan metoda-metoda khusus seperti penggunaan EPR (*Electron Paramagnetic resonance*) (Cuzzocrea *et al.*, 1999).

2.1.2 Pembentukan senyawa oksigen reaktif

Senyawa oksigen reaktif yang berperan sebagai oksidan adalah hidrogen peroksida (H_2O_2), ion superokside (O_2^-), radikal peroksil ($\cdot OOH$), radikal hidroksil ($\cdot OH$), singlet oksigen (1O_2), Nitrit Oksida (NO).

a. Hidrogen Peroksida :

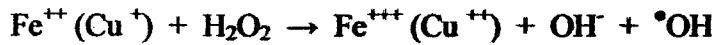
Hidrogen peroksida terbentuk karena aktivitas enzim-enzim oksidase yang terdapat dalam retikulum endoplasmik (mikrosom) dan peroksisom yang mengkatalisa reaksi :



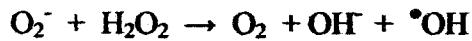
Hidrogen peroksida merupakan oksidan yang kuat dan dapat mengoksidasi berbagai senyawa yang terdapat dalam sel misalnya glutation. Daya rusaknya bukan karena merupakan oksidan kuat tetapi karena hidrogen peroksida dapat menghasilkan radikal hidroksil dan ion hipoklorit (ClO^-) melalui reaksi yang dikatalisis oleh enzim mieloperoksidase yang terdapat dalam sel-sel radang seperti granulosit, monosit dan makrofag.

b. Radikal Hidroksil :

Radikal hidroksil terbentuk bila H_2O_2 bereaksi dengan logam transisi misal Fe^{++} dan Cu^+ :



Dapat pula dibentuk dari ion superoksida dengan hidrogen peroksida :



c. Ion Superoksida :

Ion superoksida tidak terlalu reaktif, terbentuk melalui reaksi sampingan yang melibatkan Fe^{++} seperti pada proses fosforilasi oksidatif (enzim sitokrom oksidase), proses oksigenasi Hb, proses hidroksilasi oleh enzim mono-oksigenase (sitokrom P450 dan sitokrom b4), ion Fe^{++} bebas.



Ion superoksida dapat terbentuk pada reaksi yang dikatalisis oleh NADH / NADPH oksidase yang terdapat pada mitokondria dan granulosit.



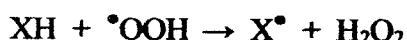
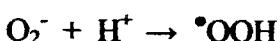
Atau reaksi yang dikatalisis oleh enzim xantin oksidase.



Asam urat

d. Radikal Peroksil

Radikal peroksil sangat reaktif dan akan membentuk radikal baru dan H_2O_2



e. Singlet Oksigen

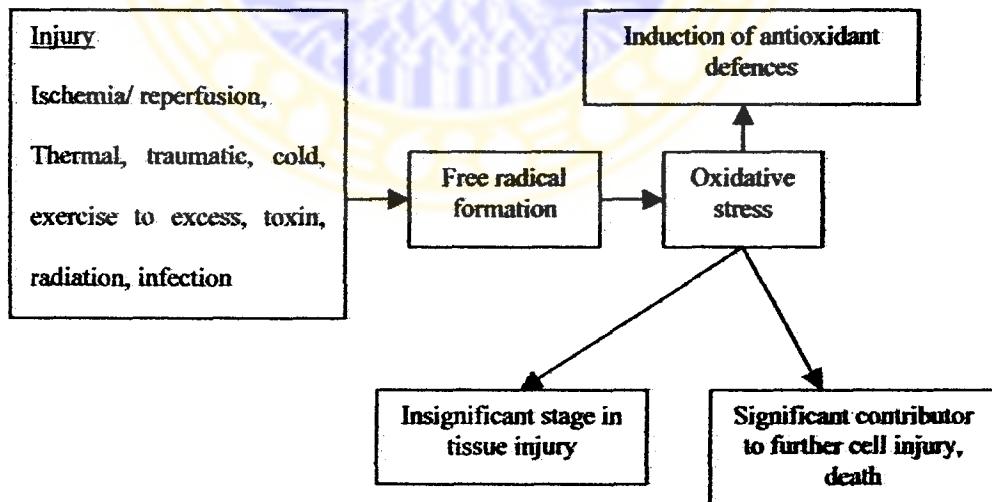
Singlet oksigen terbentuk pada reaksi-reaksi yang dikatalisis oleh enzim mono-oksigenase, enzim prostaglandin dan oleh enzim mieloperoksidase

f. Nitrit Oksida

Nitrit oksida diyakini juga mempunyai peranan pada saat terjadinya inflamasi. Reaksi dengan ion superokksida akan membentuk peroksinitrit (NO_3^-) yang sangat toksik terhadap sel (Cuzzocrea *et al*, 1999; Lin *et al*, 2000).

2.1.3 Peranan radikal bebas terhadap penyakit

Radikal bebas akan merusak molekul yang elektronnya ditarik oleh radikal bebas tersebut sehingga menyebabkan kerusakan sel, gangguan fungsi sel bahkan kematian sel (Stohs, 1995; Lin *et al*, 2000). Molekul utama di dalam tubuh yang dirusak oleh radikal bebas adalah DNA, lemak dan protein terutama oleh radikal hidroksil. Kerusakan jaringan akibat pembentukan radikal bebas dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 2.1. kerusakan jaringan pada stress oksidatif (Halliwell, 1994).

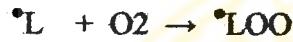
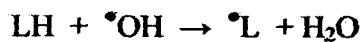
Halliwell, 1994, menyatakan bahwa pertahanan tubuh tidak selalu bekerja dengan baik sehingga radikal bebas mempunyai peranan kuat terhadap kerusakan jaringan yang semakin luas.

1. Peranan radikal bebas pada DNA

Radikal bebas yang merusak DNA dapat mengganggu beberapa bagian DNA dan menyebabkan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol, yang dapat mengakibatkan kanker. Radikal hidroksil dapat menimbulkan berbagai perubahan pada DNA antara lain berupa hidroksilasi basa timin dan sitosin, pembukaan inti pirin dan pirimidin, serta terputusnya rantai fosfodiester DNA. Bila kerusakan tidak terlalu parah, maka masih bisa diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA (*DNA Repairs System*). Namun apabila kerusakan terlalu parah misalnya rantai DNA terputus-putus diberbagai tempat, kerusakan tersebut tidak dapat diperbaiki dan replikasi akan terganggu. Kesulitannya, bahwa perbaikan DNA ini justru sering menimbulkan mutasi, karena dalam memperbaiki kerusakan DNA tersebut, sistem perbaikan DNA cenderung sering membuat kesalahan (*error prone*), dan apabila mutasi ini mengenai gen-gen tertentu yang disebut proto-oncogen, mutasi tersebut dapat menimbulkan kanker. Radikal bebas yang merusak DNA dapat menyebabkan kerusakan oksidasi low density lipoproteins (LDLs), sehingga mengakibatkan arteriosklerosis. Radikal bebas juga merusak sel endotel sehingga mengurangi kemampuan sel bereaksi cepat dan efisien untuk mempertahankan aliran darah yang optimum di organ-organ vital. Radikal bebas juga menyebabkan terjadinya proses glikosilasi (komplek karbohidrat dan protein), proses ini dapat menyebabkan timbulnya penyakit kronis (Siti, 2003).

2. Peranan radikal bebas pada asam lemak tak jenuh jamak (PUFA)

Komponen penting dalam membran sel adalah fosfolipid, glikolipid dan kolesterol, yang sangat rawan terhadap serangan radikal, terutama radikal hidroksil. Radikal hidroksil dapat menimbulkan reaksi rantai yang dikenal dengan lipid peroksidasi.

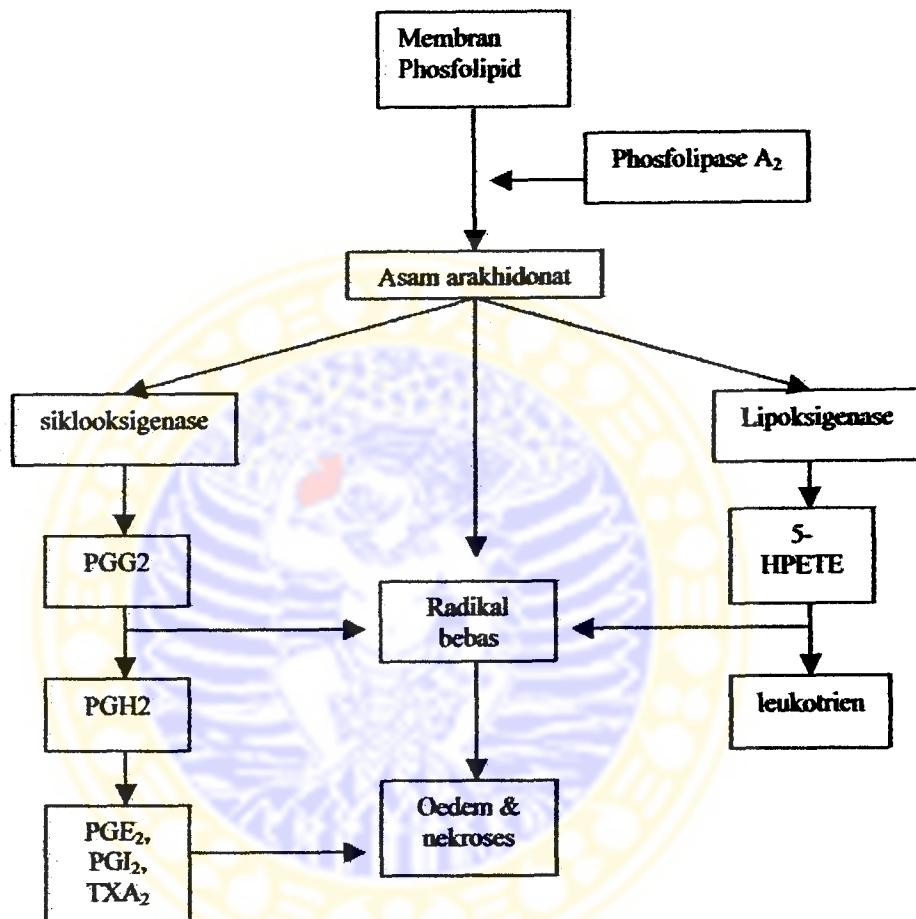


dst.

Akibat dari reaksi rantai tersebut adalah terputusnya rantai karbon asam lemak yang menghasilkan senyawa aldehid-aldehid seperti malondialdehid (MDA), 9-hidroksi nonenal serta senyawa hidrokarbon seperti etana (C_2H_6), pentane (C_5H_{12}) yang bersifat toksik sehingga membahayakan kehidupan sel (Wijaya, 1996; Suryohusodo, 1997). Dapat pula terjadi ikatan silang (*cross-linking*) antara dua rantai asam lemak antara asam lemak dan rantai peptida (protein) yang timbul karena reaksi antara dua radikal. Semua itu mengakibatkan kerusakan parah membran sel sehingga membahayakan kehidupan sel.

Di bawah ini merupakan mekanisme pembentukan oksidan pada saat terjadinya inflamasi. Asam arakhidonat merupakan prekursor prostaglandin melalui jalur sikloksigenase dan leukotrien melalui jalur lipokksigenase yang mempunyai efek terhadap mikrosirkulatori dan permeabilitas membran, sehingga

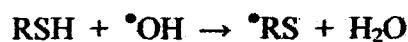
pelepasan asam arakhidonat akan memacu kerusakan terus menerus (Djoenaedi, 1992).



Gambar 2.2. Pembentukan radikal bebas oksigen (Djoenaidi, 1992).

3. Peranan radikal bebas pada protein

Oksidan dapat merusak protein karena dapat bereaksi dengan asam amino penyusun protein, khususnya asam amino yang mengandung gugusan sulfidril (-SH) misalnya sistein :



Pembentukan ikatan disulfida ($S - S$) menimbulkan ikatan intra maupun antar molekul protein sehingga protein kehilangan fungsi biologisnya, misalnya enzim menjadi kehilangan aktivitasnya (Wijaya A, 1996).

2.2 Antioksidan

Senyawa-senyawa oksigen reaktif terjadi sebagai akibat proses biologis normal, namun apabila aktivitas senyawa-senyawa tersebut tidak diredam, maka oksigen yang merupakan pembawa kehidupan organisme aerobik akan berbalik menjadi racun yang mematikan. Oleh karena itu diperlukan suatu senyawa untuk meredam dampak negatif dari oksidan yaitu senyawa antioksidan. (Suryohusodo, 1997). Dalam pengertian kimia, anti-oksidan merupakan senyawa-senyawa pemberi elektron (*electron donor*). Namun dalam arti biologis, pengertian anti-oksidan lebih luas, yaitu semua senyawa yang dapat meredam dampak negatif dari oksidan, termasuk enzim-enzim dan protein-protein pengikat logam.

Dalam meredam dampak negatif dari oksidan terdapat dua mekanisme, yaitu mencegah terhimpunnya senyawa-senyawa oksidan secara berlebihan dan mencegah reaksi rantai yang berkelanjutan. Berdasarkan dua mekanisme pencegahan dampak negatif oksidan tersebut, antioksidan terbagi menjadi dua golongan, yaitu antioksidan pencegah (*preventive antioxidant*) dan antioksidan pemutus reaksi rantai (*chain-breaking antioxidant*).

2.2.1 Antioksidan pencegah

Anti-oksidan pencegah pada dasarnya, tujuannya adalah untuk mencegah terbentuknya radikal hidroksil, yaitu radikal yang paling berbahaya. Antioksidan tersebut adalah (Tjokroprawiro, 1995) :

1. Superokksida dismutase (SOD), berada dalam mitokondria dikenal dengan Mu SOD dan sitoplasma (Cu Zn SOD). Enzim ini berperan dalam mencegah penimbunan O_2^- .
2. Katalase, berada dalam sitoplasma. Dapat menetralisir H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 .
3. Peroksidase, antara lain yang penting adalah glutation peroksidase (GSPx) yaitu dengan mengkatalisa H_2O_2 menjadi H_2O melalui sistem *Glutation Redox Cycle*.
4. Senyawa-senyawa yang mengandung gugus sulfhidril (Glutation dan Sistein), yaitu mencegah penimbunan radikal hidroksil dengan mengkatalisanya menjadi H_2O .

2.2.2 Antioksidan pemutus reaksi rantai

Kelompok antioksidan ini termasuk vitamin E (tokoferol), vitamin C (askorbat), beta-karoten dan dua senyawa yang juga berperan sebagai anti-oksidan pencegah yaitu glutation dan sistein. Vitamin E dan beta-karoten bersifat lipofilik sehingga dapat berperan pada membran sel untuk mencegah peroksidasi lipid. Sebaliknya vitamin C, glutation dan sistein bersifat hidrofilik dan berperan dalam sitosol dan cairan ekstrasel (Suryohusodo, 1997).

2.3 Tinjauan Tentang *Nonsteroid Anti-inflammatory Drugs (NSAID)*

2.3.1 Obat-obat nonsteroid anti-inflamasi

Obat-obat anti-inflamasi, analgesik dan antipiretik merupakan sekelompok berhubungan dan mempunyai banyak persamaan dalam efek farmakologik, baik dalam efek terapi maupun dalam efek samping (Goodman and Gilman's, 2001).

NSAID merupakan obat yang sudah sangat luas digunakan untuk mengobati osteoarthritis, arthritis rheumatoid, rematik jaringan lunak dan penyakit-jaringan jaringan ikat. Penggunaan NSAID sebagai analgesik banyak digunakan pada penyakit non-rematik akut dan penyakit nyeri konik (Soebagyo, 2001).

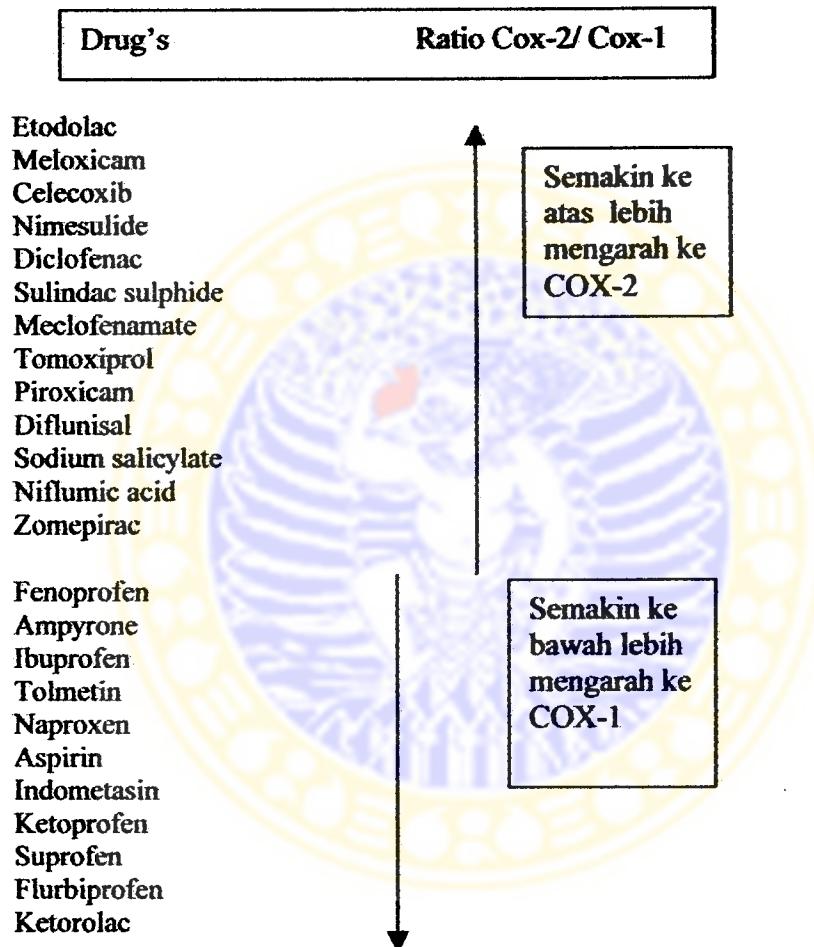
2.3.2 Mekanisme kerja NSAID

Secara umum mekanisme kerja NSAID yaitu menghambat enzim siklooksigenase dari metabolisme asam arakhidonat sehingga menyebabkan hambatan pada produksi prostaglandin (PGE_2 , PGF_2 , PGD_2), prostasiklin (PGI_2) dan tromboksan (TXA_2) yang selanjutnya menyebabkan timbulnya efek anti-inflamasi, analgesik, antipiretik dan antitrombotik (Rang, 1999).

Berdasarkan hambatan terbentuknya prostaglandin, NSAID terbagi menjadi dua tipe yaitu penghambat siklooksigenase-1 (*COX-1 inhibitor*) sehingga prostaglandin yang secara fisiologis diperlukan untuk homeostasis jaringan terhambat. Hambatan pada prostaglandin yang secara fisiologis diperlukan bisa menyebabkan timbulnya efek samping seperti gangguan pada gastrointestinal. Tipe yang kedua yaitu penghambat siklooksigenase-2 (*COX-2 inhibitor*) yang

secara selektif menghambat pembentukan prostaglandin yang berperan pada inflamasi dan sedikit menghambat COX-1 (Goodman and Gilman's, 2001).

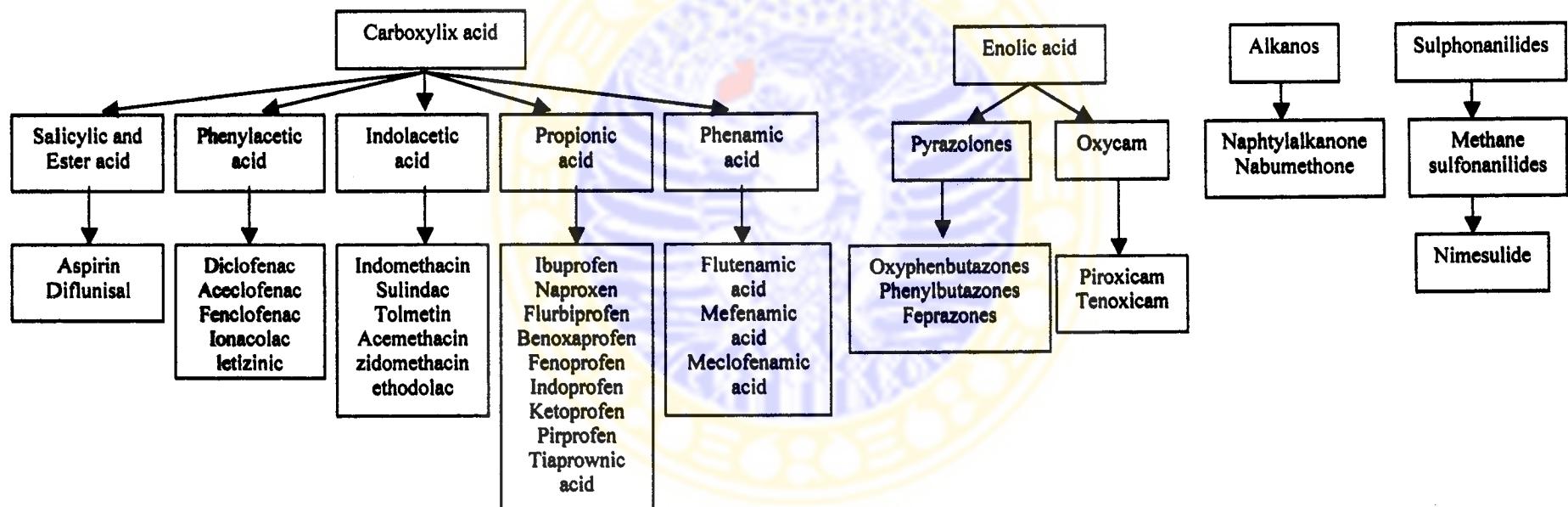
Di bawah ini merupakan gambaran perbandingan beberapa obat non steroid anti inflamasi terhadap hambatan siklooksigenase (*COX-1 and COX-2 inhibitor*).



Gambar 2.3. Ratio COX-2/ COX-1 (Vane, 1999).

Banyaknya NSAID yang beredar di pasaran sebagai analgesik dan anti piretik, misalnya: aspirin, parasetamol, ibuprofen, asam mefenamat, endometasin, diklofenak, piroksikan, celecoxib, nimesulide. Oleh karena itu diperlukan pemilihan obat sesuai indikasi klinik dengan memperhatikan efek samping obat

(Soebagyo, 2001). Gambar di bawah ini merupakan penggolongan NSAID dan turunannya menurut Goodman and Gilman's, 2001 :

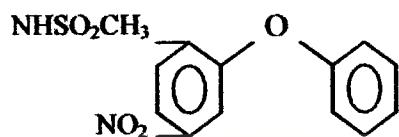


Gambar 2.4. klasifikasi NSAID (Goodman and Gilman's, 2001).

2.3.3 Nimesulide

1. Struktur kimia

Nimesulide merupakan golongan dari sulfonanilides, dengan struktur kimianya pada gambar di bawah ini :



Gambar 2.5. Struktur kimia Nimesulide (Goodman and Gilman's, 2001).

2. Farmakokinetik

Nimesulide bersifat asam lemah dengan pK_a 6,5 dan berikatan dengan protein plasma 99 %. Diabsorpsi dengan cepat di usus halus dan mencapai kadar puncak dalam darah antara 2,86 – 6,50 mg/l dalam waktu 70 – 170 menit setelah pemberian Nimesulide 100 mg. Pada 30 menit pertama dapat mencapai 25 – 80% dari konsentrasi puncaknya. Metabolisme obat ini di hati dengan menghasilkan metabolit 4-hydroxy-Nimesulide dan di ekskresikan terutama melalui urine (70%) sisanya melalui feses (Bernareggi, 1998).

3. Farmakodinamik

Nimesulide mempunyai efek analgesik, anti-inflamasi dan antipiretik dengan mula kerja sebagai analgesik yang cepat. Nimesulide menghasilkan efek yang berbeda pada konsentrasi yang rendah *in vitro*. Banyak penelitian menjelaskan bahwa pemberian 100 mg dosis tunggal, maka konsentrasi yang

diperoleh diplasma adalah 3 – 4 µg/ml. Mekanisme kerja Nimesulide melalui hambatan siklooksigenase (COX-2) sehingga pembentukan prostaglandin terhambat yang berperan penting pada inflamasi, nyeri dan demam. Hambatan siklooksigenase (COX-1) yang berperan dalam mekanisme proteksi jaringan sangat sedikit sehingga efek samping hampir sedikit pula (Soebagyo, 2001).

Nimesulide juga mempunyai peran pada hambatan Phosfodiesterase IV, yaitu enzim yang diperlukan untuk merubah cAMP (Cyclic Adenosin Mono Phosphat) menjadi AMP (Adenosin Mono Phosphat), adanya hambatan ini menyebabkan akumulasi cAMP meningkat yang kemudian bisa menyebabkan hambatan NADPH oksidase dan kemotaksis (Davis and Brogden, 1994).

4. Peranan Nimesulide terhadap radikal bebas

Sumber utama asam arakhidonat adalah membran phosfolipid karena aktivasi dari phosfolipase A2. sejumlah besar bahan dapat diproduksi melalui oksidasi asam arakhidonat adalah prostaglandin, leukotrien , hidroperoksid, endoperoksid, prostasiklin, tromboksan. Pelepasan mediator inflamasi ini disebabkan oleh rangsangan dari kolagen, trombin, bradikinin, komplek antibodi-antigen, oksigen radikal bebas faktor pertumbuhan dan esterifikasi asam arakhidonat (Peck, 1994).

Kondisi inflamasi dalam merangsang terbentuknya radikal bebas diperantara dengan adanya proses fagositosis dan sintesa prostaglandin yang dapat menghasilkan O_2^- , H_2O_2 , NO^- , HOCl (Cuzzocrea *et al*, 1999). Proses fagositosis ini akan menghasilkan sejumlah besar superoksid sebagai bagian dari mekanisme yang bertujuan untuk membunuh mikroorganisme asing. Pada proses

inflamasi kronis mekanisme perlindungan tersebut justru akan bersifat merusak (Wijaya, 1996). Apabila pertahanan tubuh tidak betul-betul efektif, maka menyebabkan peningkatan pembentukan radikal bebas. Hal ini akan mengakibatkan kerusakan jaringan yang lebih luas dan dinyatakan sebagai stress oksidatif. Jadi kegagalan sistem antioksidan dalam tubuh akan menyebabkan perlindungan terhadap serangan oksidan hilang (Wijaya, 1996).

Komponen penting dalam membran sel adalah fosfolipid, glikolipid dan kolesterol, yang sangat rawan terhadap serangan radikal, terutama radikal hidroksil. Radikal hidroksil dapat menimbulkan reaksi rantai yang dikenal dengan lipid peroksidasi. Akibat dari reaksi rantai tersebut adalah terputusnya rantai karbon asam lemak yang menghasilkan senyawa aldehid-aldehid seperti malondialdehid (MDA), 9-hidroksi nonenal serta senyawa hidrokarbon seperti etana (C_2H_6), pentana (C_5H_{12}) yang bersifat toksik terhadap sel (Wijaya, 1996; Suryohusodo, 1997).

Prostaglandin dan leukotrien dilepaskan karena adanya rangsangan mekanik, kimia, suhu, dan bakteri, yang berperan penting pada mekanisme tejadinya inflamasi. Kemampuan makrofag dalam melepaskan IL-1 dan TNF dapat secara langsung mengawali produksi radikal bebas melalui perangsangan pelepasan prostaglandin (PGE-2). Sitokin ini akan meningkatkan pembentukan radikal bebas sebagai perantara kerusakan jaringan (Ward *et al.*, 1998). Pada fase radang akut pertahanan tubuh banyak diperankan oleh sel-sel fagositik misalnya sel polimorfonuklear (PMN cells). PMN mampu memfagosit dan membunuh bakteri melalui mekanisme *oxygen-dependent* dan *oxygen-independent* melalui aktivasi NADPH oksidase yang bertanggung jawab pada pembentukan

superoxide, singlet oxygen, dan hidroxyl radical. Reaktif oksigen tersebut yang dilepaskan oleh PMN dapat menyebabkan kerusakan jaringan disamping untuk membunuh bakteri (Shapira *et al.* 1994) Jika radang akut tidak dapat mengatasi, akan diteruskan proses radang kronis yang menyebabkan terjadinya pengumpulan superoksid sehingga kerusakan jaringan semakin bertambah (Bellanti, 1993). Nimesulide berperan dalam penghambatan pembentukan prostaglandin yang dihasilkan pada saat terjadinya stress oksidatif dan kerusakan sel. Hambatan pembentukan prostaglandin akan menurunkan sensasi nyeri, kemerahan dan pembengkakkan. Nimesulide mempunyai peran pada hambatan Phosfodiesterase IV, yaitu enzim yang diperlukan untuk merubah cAMP (*Cyclic Adenosin Mono Phosphat*) menjadi AMP (*Adenosin Mono Phosphat*), adanya hambatan ini menyebabkan akumulasi cAMP meningkat yang kemudian bisa menyebabkan hambatan NADPH oksidase dan kemotaksis (Davis and Brogden, 1994) .

NADPH oksidase berperan pada pembentukan superosid, singlet oksigen, dan radikal hidroksil. Reaktif oksigen tersebut yang dilepaskan oleh PMN dapat menyebabkan kerusakan jaringan disamping untuk membunuh bakteri (Shapira *et al.* 1994) Jika radang akut tidak dapat mengatasi, akan diteruskan proses radang kronis yang menyebabkan terjadinya pengumpulan superoksid sehingga kerusakan jaringan semakin bertambah (Bellanti, 1993).

2.4 Karagen

Prostaglandin dan leukotrien dilepaskan karena adanya rangsangan mekanik, kimia, suhu, dan bakteri, yang berperan penting pada mekanisme tejadinya inflamasi. Bahan kimia yang dapat digunakan untuk dapat menimbulkan

inflamasi seperti bradikinin, IL-1 dan karagen. Induksi karagen menunjukkan adanya pelepasan histamin, 5-hidroksitriptamin, bradikinin, prostaglandin dan infiltrasi neutrofil serta diikuti radikal bebas seperti hidrogen peroksida, ion superoksida dan radikal hidroksil (Dawson *et al.*, 1991).

Karagen merupakan ekstrak kering yang mengandung air dari spesies *Chondrus*, *Gigartina*, *Eucheuna* dan lain-lainnya dari familia *Gigartinaceae* dan *Soliericeae*. Karagen terdiri dari campuran amonium, kalsium, kalium dan garam-garam natrium dari dua polisakarida. Terdiri dari 3 jenis, yaitu Kappa karagen, Lambda dan Iota (Reynolds, 1982). Kegunaanya sebagai *emulsifying*, *suspending* dan *gelling agent*, juga dapat berfungsi sebagai *inflammatory agent*.

2.4.1 Metode pengujian efek anti-inflamasi

Ada beberapa metode yang digunakan untuk pengujian efek anti-inflamasi menurut Thompson, 1990 yaitu :

1. Metode pengujian berdasarkan simptom inflamasi

- a. Bengkak

Digunakan metode induksi edema telapak kaki tikus. Metode ini merupakan metode yang paling populer. Prosedur umum yaitu menyuntikan sejumlah suspensi atau larutan edmogen ke jaringan plantar kaki belakang tikus. Pengukuran respon ditentukan pada saat terjadi pembengkakan maksimum. Untuk menentukan besarnya pembengkakan telapak kaki tikus, dapat dilakukan dengan mengukur tebalnya telapak kaki, besarnya ataupun pemindahan sejumlah volume air atau air raksa

b. Kulit merah

Digunakan metode eritema ultraviolet. Tes ini dilakukan dengan berbagai cara, misalnya radiasi ultraviolet diberikan selama 20 detik pada kulit mamot yang dicukur. Eritema yang timbul diberi skor. Kesulitan percobaan ini yaitu untuk mendapatkan hasil yang obyektif dan tepat.

c. Panas

Digunakan metode hiperereksi lokal dan hiperereksi sistemik

d. Nyeri

Pada pengujian ini bisa digunakan hiperestesi radang telapak kaki dan tes geliat pada mencit.

e. Terganggunya fungsi

Digunakan metode grip strength tikus atritis dan aktivitas lokomotorik mencit dengan radang telapak kaki

2. Metode pengujian dengan cara inhibisi biosintesis prostaglandin *in vitro*

Uji inhibisi biosintesis prostaglandin dilakukan dengan menggunakan mikrosom ginjal kelinci dan asam 1-C arakhidonat. Setelah diisolasi dengan kromatografi lapisan tipis preparatif keradioaktidan PGE2 diukur dengan pencacah sintilasi.

3. Metode pengujian dengan cara inhibisi eksudat radang

Metode yang banyak juga digunakan yaitu yang didasarkan pada masuknya protein plasma yang berikatan dengan zat warna ke dalam daerah radang. Zat warna azo seperti biru eveans atau biru tripan berinteraksi dengan normal dari albumin plasma hingga kalau disuntikan secara intravena , maka zat warna

ini merupakan maker yang baik untuk mengetahui apakah ada protein yang masuk ke daerah radang. Metode ini dapat dibuat kuantitatif dengan mengekstraksi zat warna dari daerah tersebut.

4. metode pengujian emigrasi leukosit

suatu antigen disuntikan pada hewan yang sudah disensitisasi secara intrakutan atau subkutan. Daerah itu kemudian diambil dan sejumlah leukosit yang ada dapat dihitung.

5. Metode penanaman pelet

Tikus dianestesi dan 30 mg pelet abses ditempatkan di bawah kulit dalam bagian punggung dan 2 jam setelah pembedahan diberi 0,1 ml suspensi steroid dibawah kulit.

2.4.2 Pengukuran edema telapak kaki tikus

Pada penelitian ini digunakan metode induksi karagen pada telapak kaki tikus dengan mengukur volume edema yang terjadi dengan menggunakan alat Pletismometer. Alat ini bekerja berdasarkan hukum Archimedes yang menyatakan bahwa sebuah benda yang dicelupkan dalam zat cair akan mengalami gaya ke atas sebesar zat cair yang dipindahkan. Pletismometer menggunakan prinsip pipa U. tabung berisi air raksa pada bagian pipa U dan biru metilen pada bagian tabung berskala. Air raksa digunakan sebagai pengukur mengingat sifatnya kohesif, sehingga kaki tikus yang dicelupkan ke dalamnya tidak terbasahi dan dapat mendorong biru metilen naik, menyebabkan perubahan volume yang dapat dibaca pada skala yang ada (Di Rosa, 1971).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

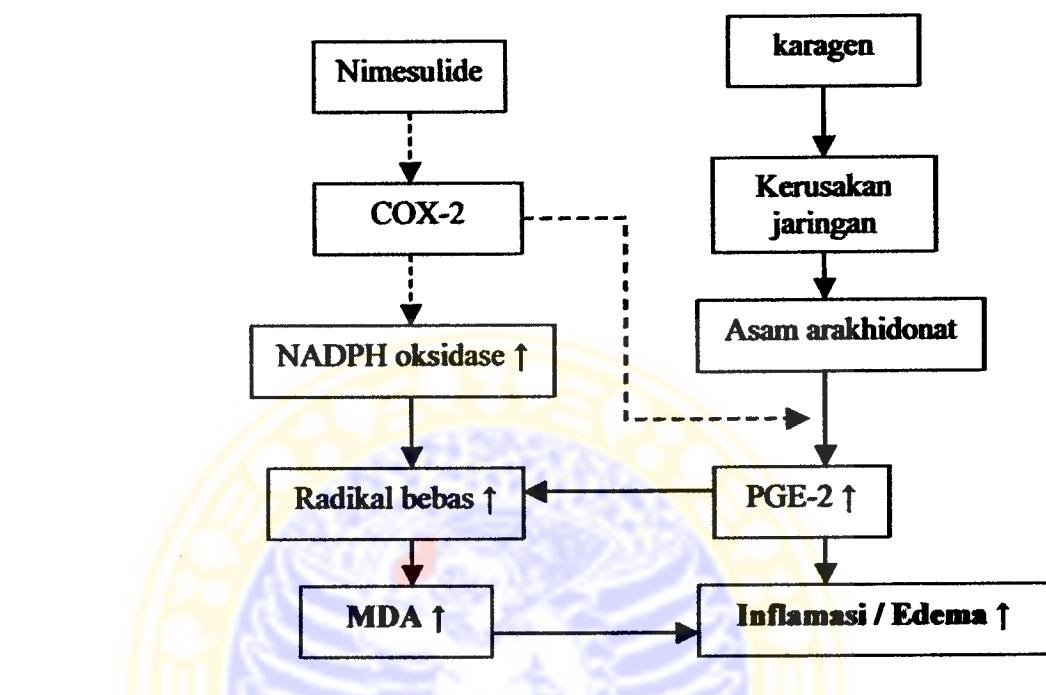
BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual

Kerusakan jaringan dapat disebabkan karena adanya rangsangan dari luar seperti karagen. Kerusakan ini menyebabkan membran sel fosfolipid rusak, aktivasi dari enzim fosfolipase A₂ akan merubah fosfolipid menjadi asam arakhidonat. Adanya enzim sikloksigenase-lipokksigenase menyebabkan asam arakhidonat dirubah menjadi endoperoksid dan hidroperoksid yang kemudian akan berubah lagi, salah satunya yaitu PGE-2 yang banyak berperan pada terjadinya inflamasi. Pada daerah radang tersebut terjadi pengumpulan sel-sel radang, produk radang dan sitokin pro-inflamatori. Radikal bebas dapat terbentuk selama aktivasi enzim sikloksigenase dan proses fagositosis, yang kemudian radikal bebas ini dapat mengeliminasi adanya bakteri dan sekaligus dapat pula menyebabkan kerusakan lebih luas karena dari pembentukan senyawa-senyawa yang toksik. Nimesulide yang diberikan secara per-oral pada tikus yang diinduksi karagen dapat menyebabkan hambatan sikloksigenase , hambatan jalur ini menyebabkan pembentukan superoksid melalui proses aktivasi sikloksigenase menurun dan adanya peranan Nimesulide pada hambatan fosfodiesterase IV menyebabkan akumulasi cAMP sehingga merangsang protein kinase A. Protein kinase A menyebabkan hambatan kemotaksis dan aktivitas NADPH oksidase yang juga berperan pada pembentukan radikal bebas. Penurunan pembentukan radikal bebas kemudian berlanjut pada penurunan pembentukan lipid peroksidasi dalam hal ini senyawa MDA akan turun. Jadi terhambatnya kadar MDA pada jaringan yang

diinduksi karagen sekaligus dapat menghambat terjadinya inflamasi (edema), sehingga kerusakan jaringan yang terjadi, tidak semakin bertambah luas.



keterangan skema :

→ Merangsang
---→ Menghambat

3.2 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah :

1. Pemberian Nimesulide dapat mempengaruhi kadar *malondialdehyde* (MDA) pada jaringan telapak kaki tikus yang diinduksi karagen
2. Pemberian Nimesulide dapat mempengaruhi volume edema pada telapak kaki tikus yang diinduksi karagen
3. Terdapat hubungan antara kadar *malondialdehyde* (MDA) dengan volume edema akibat pemberian Nimesulide.

BAB IV

METODE PENELITIAN

BAB IV

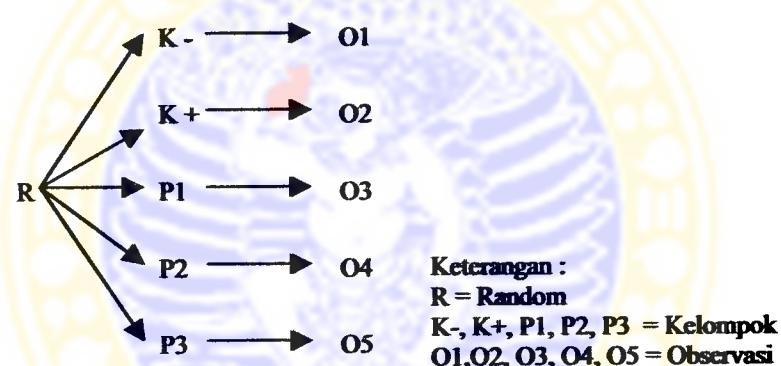
METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris. Sampel penelitian diambil secara simple random sampling.

4.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dipergunakan pada pengukuran kadar MDA dan volume edema menggunakan The Postest-Only Control Group Design.,



4.3 Unit Sampel

Pada penelitian ini menggunakan sampel tikus putih strain Swiss Wistar jantan berumur 2 - 3 bulan dengan berat badan 100-200 gr yang diperoleh dari Pusvetma Surabaya.

4.4 Besar Sampel

Besar sampel diperoleh setelah dilakukan eksplorasi dosis menggunakan rumus menurut Lameshow *et al*, 1990 :

$$n = \frac{\sigma^2 (Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta})^2}{(\mu_0 - \mu_a)^2}$$

keterangan :

- n = jumlah sampel
- σ = standard deviasi populasi
- $Z_{1-\alpha}$ = taraf kemaknaan = 1,645
- $Z_{1-\beta}$ = kekuatan test = 1,282
- $\mu_0 - \mu_a$ = rerata populasi – rerata sampel

Setelah dilakukan eksplorasi, diperoleh jumlah sampel sebesar 6 ekor tiap kelompok.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Tergantung : Kadar MDA dan Volume edema

4.5.2 Variabel Bebas : Nimesulide dosis 2,1; 4,2 dan 8,4 mg/ 200 gbb
tikus

4.5.3 Variabel Terkendali : Karagen, umur, berat badan dan jenis kelamin
hewan coba, cara memberi pakan, cara
memelihara, prosedur, laboratoris, analisa
sampel

4.6 Definisi Operasional :

- a. Volume edema adalah hasil pengukuran ml dari volume telapak kaki tikus yang telah diinduksi karagen menggunakan pletismometer.
- b. Kadar MDA adalah hasil pengukuran nmol/g jaringan dari telapak kaki tikus yang telah diinduksi karagen dengan menggunakan spektrofotometer 532 nm.

- c. Nimesulide adalah dosis 2.1; 4.2 dan 8.4 mg/ 200 gbb tikus yang dilarutkan dalam larutan CMC 1% yang diberikan pada tikus secara per-oral dan mempunyai potensi sebagai anti inflamasi yang diperoleh dari Jambone sebagai produsen obat.
- d. Karagen adalah 1% bahan penginduksi radang yang dilarutkan dalam larutan fisiologis NaCl 0,9% yang diinjeksikan pada telapak kaki tikus sebesar 0,1ml sehingga menimbulkan inflamasi yang diperoleh dari laboratorium farmakologi FK Unair.

4.7 Bahan

Bahan yang dipakai pada penelitian ini meliputi makanan baku tikus, Nimesulide, larutan KCl 1.15 %, larutan SDS 8.1 %, larutan Asam asetat, larutan TBA 0.8%, air destilasi, karagen 1% dalam larutan NaCl 0.9%, larutan CMC 1% (*Carboxyl Metil cellulose*), anestesi eter.

4.8 Alat

Peralatan yang digunakan selama penelitian meliputi kandang tikus, sonde tumpul, Homogenisasi, Sentrifuse, Spektrofotometri, Pletismometer, alat bedah.

4.9 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Unair dan di Fakultas Farmasi Unair selama 3 bulan.

4.10 Prosedur Penelitian

4.10.1 Tahap Persiapan

Seluruh hewan percobaan yang diperoleh dari Pusvetma Surabaya diadaptasikan dengan lingkungan pencobaan selama 2 minggu dan diberi makan standar.

4.10.2 Tahap perlakuan

Percobaan dimulai melalui tahapan sebagai berikut :

1. Sebelum perlakuan binatang coba dirandom sesuai kriteria, kemudian dibagi menjadi 5 kelompok yaitu :

Kelompok K (-) : kelompok kontrol negatif terdiri dari 6 ekor tikus diberi CMC 1 ml/100 gBB.

Kelompok K (+) : kelompok kontrol positif terdiri dari 6 ekor tikus diberi CMC 1 ml/100 gBB dan diinjeksi karagen 1% 0.1 ml.

Kelompok D1 : kelompok dosis 1 terdiri dari 6 ekor tikus diberi Nimesulide 2.1 mg/200 g BB dan diinjeksi karagen 1% 0.1 ml.

Kelompok D2 : kelompok dosis 2 terdiri dari 6 ekor tikus diberi Nimesulide 4.2 mg/200 g BB dan diinjeksi karagen 1% 0.1 ml.

Kelompok D3 : kelompok dosis 3 terdiri dari 6 ekor tikus diberi Nimesulide 8.4 mg/200 g BB dan diinjeksi karagen 1% 0.1 ml.

2. Binatang coba dipuaskan pada malam hari sebelumnya penelitian dilakukan keesokan harinya untuk menghilangkan adanya pengaruh makanan.
3. Semua tikus ditimbang untuk menyesuaikan pemberian obat dilanjutkan dengan pengukuran volume telapak kaki kiri sebelum diberi bahan penginduksi inflamasi pada semua kelompok.
4. 1 jam kemudian dilakukan injeksi karagen 1% dalam larutan NaCl 0.9% secara intraplantar pada telapak kaki kiri tikus sebanyak 0.1 ml pada kelompok kontrol positif, kecuali pada kelompok kontrol negatif
5. Pada kelompok perlakuan dan pembanding diberi obat yang diuji satu jam sebelum diinjeksi karagen sedangkan kelompok kontrol negatif diberi bahan pelarut obat yaitu CMC 1%, kemudian semua tikus diukur volume edema segera setelah diinjeksi karagen kemudian diulang setiap 15 menit sampai 3 jam menggunakan pletismometer (Di Rosa, 1971).
6. Selesai pengukuran volume edema, tikus dibunuh dengan cara dieter kemudian jaringan dari telapak kaki yang diinduksi karagen di eksisi dengan skalpel 5mm dan diambil dengan tissue punch untuk dimasukkan ke dalam alat homogenisasi. Ukur kadar MDA dengan spektrofotometer 532 Nm (Okhawa *et al.*, 1979).

4.10.3 Penetapan Kadar MDA dalam jaringan

Penetapan kadar MDA jaringan telapak kaki tikus yang diinduksi karagenin menggunakan reagen asam Tiobarbiturat. Kadar MDA yang terdeteksi dianggap proporsional dengan konsentrasi peroksida lipid plasma (Ohkawa *et al.*, 1979).

Tahapan penetapan kadar MDA sebagai berikut : (modifikasi Sudjarwo, 2001)

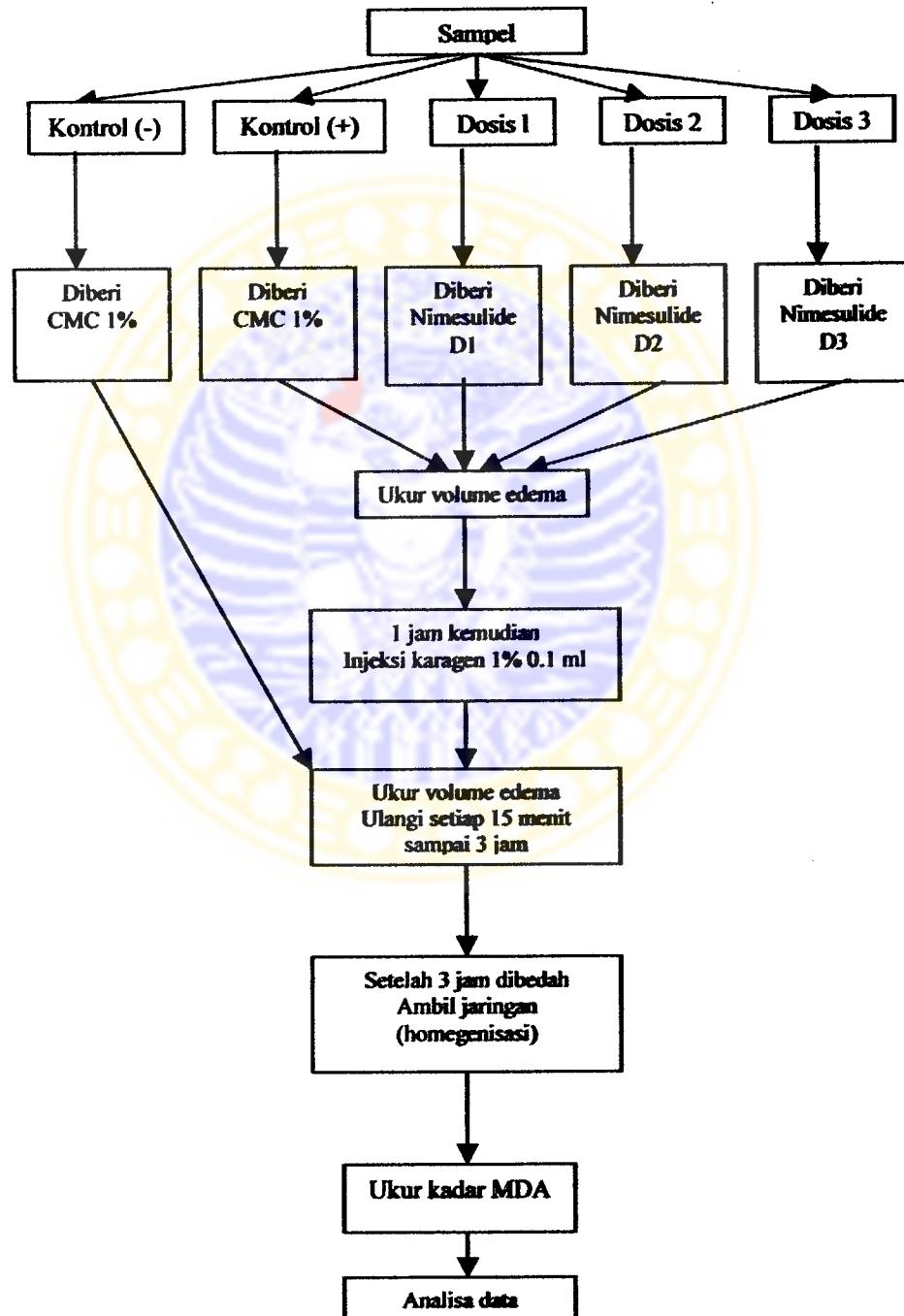
1. Jaringan dihomogenisasi dengan 2 ml KCl 1.15 %
2. Kemudian ditambahkan 3 ml Asam Asetat 20 % dan 0.4 ml SDS 8,1 %.
3. Selanjutnya ditambahkan 3 ml Thiobarbituric Acid (TBA) 1 % dan HCl 0.1 N hingga volume 10 ml.
4. Diinkubasi di atas water bath selama 135 menit.
5. Warna yang terjadi diamati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm.
6. Hitung kadar MDA dengan menggunakan persamaan garis regresi dari kurva baku larutan 1.1.3.3-tetrametoksipropane.

4.11 Analisa Data

Data hasil penelitian tentang kadar MDA dan volume oedem masing-masing kelompok kemudian ditabulasi . Untuk mengetahui adanya perbedaan efek hambatan kadar MDA dan volume edema dilakukan uji dengan uji anava satu arah dengan derajat signifikan sebesar 5 %. Apabila terdapat perbedaan yang bermakna, maka dilanjutkan dengan uji LSD untuk mengetahui kelompok yang berbeda.

Untuk mengetahui adanya hubungan antara hambatan kadar MDA terhadap volume edema dilakukan uji korelasi momen pearson.

4.12 Skema Penelitian



BAB V

HASIL PENELITIAN

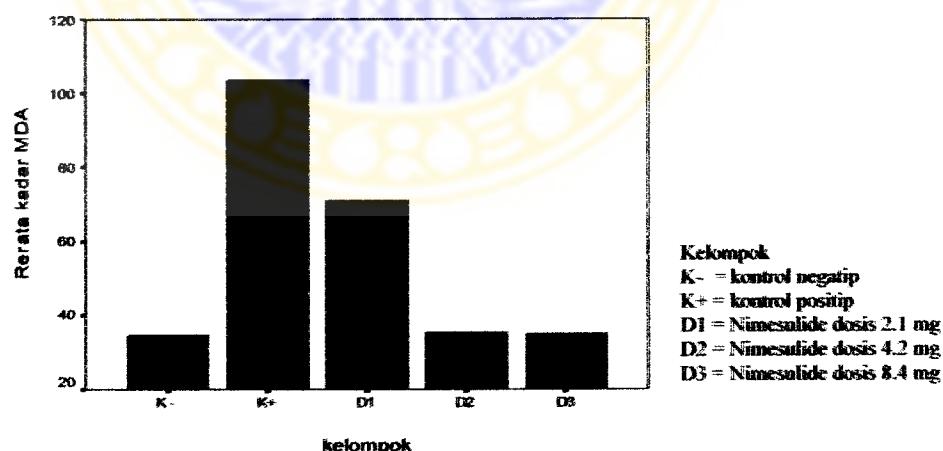
BAB V**HASIL PENELITIAN****5.1 Efek Hambatan Nimesulide Terhadap Kadar Malondialdehyd (MDA)**

Berdasarkan dari penelitian diperoleh rata-rata dan simpangan baku kadar MDA jaringan telapak kaki tikus pada masing-masing kelompok yang dapat dilihat seperti pada tabel 5.1. di bawah ini.

Tabel 5.1. Rerata dan simpangan baku hambatan Nimesulide terhadap kadar MDA dari masing-masing kelompok perlakuan

Kelompok	MDA (nmol/g) $X \pm SD$
kontrol negatif	34.45 ± 0.82
kontrol positif	103.30 ± 0.75
Nimesulide dosis 2.1 mg	71.09 ± 1.24
Nimesulide dosis 4.2 mg	35.27 ± 0.70
Nimesulide dosis 8.4 mg	34.91 ± 0.32

Pada gambar 5.1 di bawah ini ditunjukkan besarnya hambatan kadar MDA pada masing-masing kelompok.



Gambar 5.1. Pengaruh pemberian Nimesulide terhadap kadar MDA jaringan telapak kaki tikus.

Hasil data kadar MDA dari masing-masing kelompok kemudian dianalisis dengan menggunakan uji Anova satu arah untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan hambatan MDA dengan $\alpha = 0.05$. Setelah dilakukan uji anova satu arah, diperoleh adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok tersebut ($p < 0.05$) dan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda dapat dilihat pada tabel 5.2. di bawah ini.

Tabel 5.2. Uji LSD hambatan Nimesulide terhadap kadar MDA antar kelompok perlakuan

Kelompok	Kontrol negatif	Kontrol positif	Nimesulide dosis 2.1 mg	Nimesulide dosis 4.2 mg	Nimesulide dosis 8.4 mg
Kontrol negatif	-	*	*		
Kontrol positif	-		*	*	*
Nimesulide dosis 2.1 mg		-		*	*
Nimesulide dosis 4.2 mg			-		
Nimesulide dosis 8.4 mg				-	

Keterangan : * = ada perbedaan bermakna

Hasil uji LSD menunjukkan :

- Terdapat perbedaan yang bermakna dalam menghambat pembentukan MDA antara kelompok kontrol positif dengan kelompok kontrol negatif, D1, D2 dan D3. ($p = 0.001$; $p = 0.001$; $p = 0.001$ dan $p = 0.001$).
- Terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok D1 terhadap kelompok kontrol negatif, D2 dan D3 dalam menghambat pembentukan MDA ($p = 0.001$, $p = 0.001$ dan $p = 0.001$).
- Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol negatif terhadap kelompok D2 dan D3 dalam menghambat pembentukan MDA ($p = 0.099$ dan $p = 0.347$), begitu pula antara kelompok D2 terhadap kelompok D3 ($p = 0.455$).

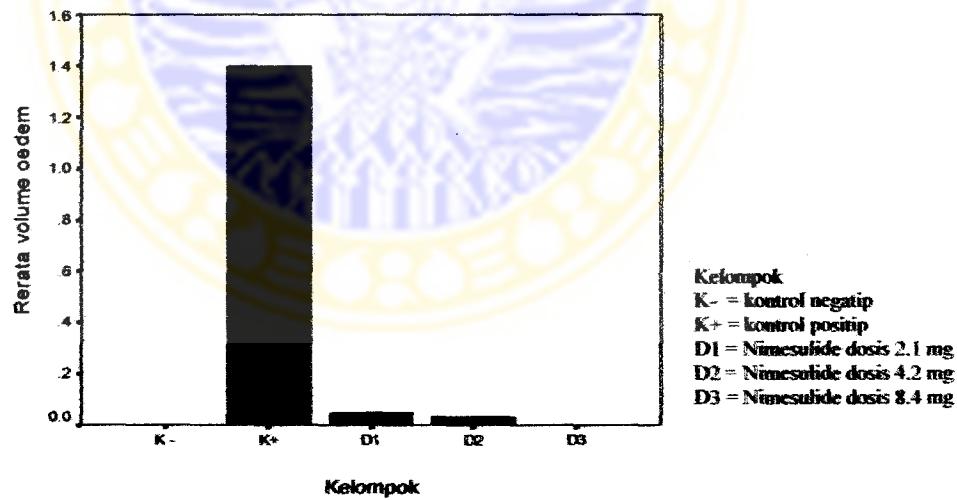
5.2 Efek Hambatan Nimesulide Terhadap Volume Edema

Berdasarkan dari hasil penelitian, diperoleh rata-rata besarnya volume edema pada telapak kaki tikus masing-masing kelompok yang dapat dilihat seperti pada tabel 5.3. di bawah ini.

Tabel 5.3. Rerata dan simpangan baku hambatan Nimesulide terhadap volume edema dari masing-masing kelompok perlakuan

Kelompok	Volume oedem (ml) $X \pm SD$
kontrol negatif	0.00 ± 0.00
kontrol positif	1.40 ± 0.14
Nimesulide dosis 2.1 mg	0.05 ± 0.05
Nimesulide dosis 4.2 mg	0.03 ± 0.05
Nimesulide dosis 8.4 mg	0.00 ± 0.00

Pada gambar 5.2. di bawah ini ditunjukkan besarnya hambatan volume edema pada masing-masing kelompok.



Gambar 5.2. Pengaruh pemberian Nimesulide terhadap volume edema telapak kaki tikus.

Hasil data volume edema dari masing-masing kelompok kemudian dianalisis dengan menggunakan uji Anova satu arah untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan hambatan volume oedem dengan $\alpha = 0.05$. Setelah dilakukan uji anova satu arah diperoleh adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok tersebut dalam menghambat terjadinya oedem ($p < 0.05$) dan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda dapat dilihat pada tabel 5.4. di bawah ini.

Tabel 5.4. Uji LSD hambatan Nimesulide terhadap volume oedem antar kelompok perlakuan

Kelompok	Kontrol negatif	Kontrol positip	Nimesulide dosis 2.1 mg	Nimesulide dosis 4.2 mg	Nimesulide dosis 8.4 mg
Kontrol negatif	-	*			
Kontrol positip	-	*	*	*	*
Nimesulide dosis 2.1 mg			-		
Nimesulide dosis 4.2 mg			-		
Nimesulide dosis 8.4 mg				-	

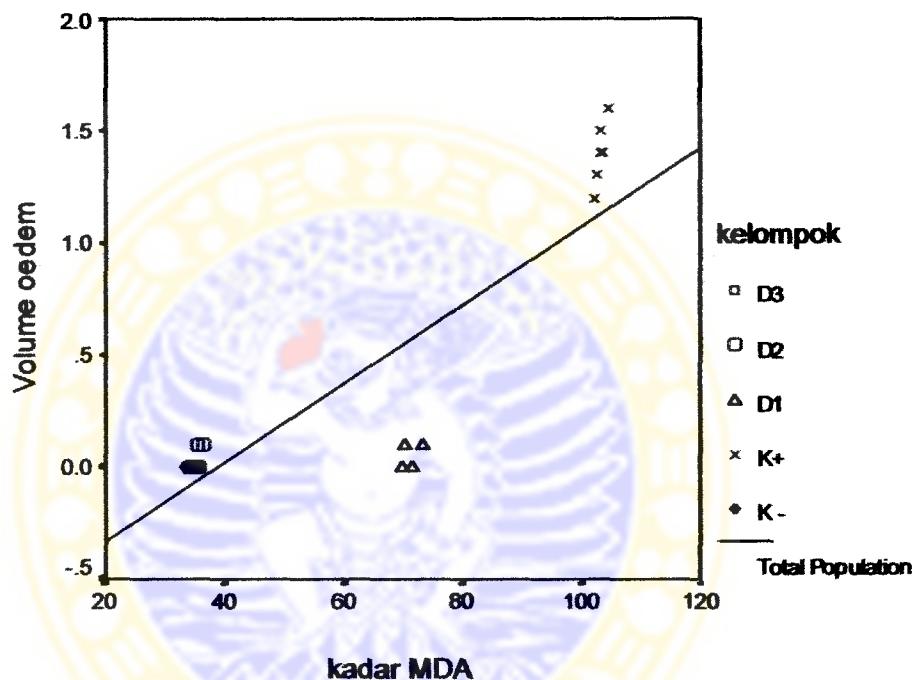
Keterangan : * = ada perbedaan bermakna

Hasil uji LSD menunjukkan :

- Adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol positip dengan kelompok kontrol negatif, D1 , D2 dan D3 dalam menghambat terjadinya oedem ($p = 0.001$; $p = 0.001$; $p = 0.001$; $p = 0.001$).
- Tidak ada perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok D1, D2 dan D3 dalam menghambat terjadinya oedem ($p = 0.238$; $p = 0.428$ dan $p = 1.00$).

5.3 Hubungan Hambatan Kadar *Malondialdehyd* (MDA) Terhadap Volume Edema

Berdasarkan hasil dari penelitian ini, diperoleh rata-rata kadar MDA dan volume edema pada jaringan telapak kaki tikus masing-masing kelompok, yang dapat dilihat seperti pada gambar 5.3. di bawah ini.



Gambar 5.3. Hubungan antara kadar MDA dengan volume edema

Data dari hasil penelitian didapatkan bahwa kadar MDA sebesar 34.45 nmol/g, maka volume edema sebesar 0 ml, dan apabila kadar MDA sebesar 103.3 nmol/g, maka volume edema sebesar 1.4 ml. Adanya peneingkatan kadar MDA akan diikuti dengan kenaikan volume edema, begitu pula sebaliknya apabila kadar MDA menurun maka volume edema akan turun. Untuk mengetahui adanya hubungan antara hambatan kadar MDA terhadap volume edema dilakukan uji

korelasi moment pearson. Hasil uji korelasi menunjukkan bahwa adanya hubungan yang kuat ($r = 0.884$) antara hambatan kadar MDA terhadap volume edema. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin kecil kadar MDA pada telapak kaki tikus, maka akan semakin kecil volume edema yang terjadi.



BAB VI

PEMBAHASAN

BAB VI

PEMBAHASAN

Telah dilakukan penelitian mengenai pengaruh pemberian Nimesulide terhadap kadar *malondialdehyd* (MDA) jaringan telapak kaki tikus yang diinduksi karagen. Pengukuran volume edema menggunakan alat plethysmometer yang berisi air raksa, dengan mencelupkan telapak kaki tikus yang diberi induksi karagen 0.1 ml dengan konsentrasi 1% dalam larutan NaCl 0.9%. Volume edema telapak kaki tikus diukur berdasarkan bertambah besarnya telapak kaki tersebut hingga 3 jam setelah diberi induksi karagen. Kemudian dilanjutkan dengan pengukuran kadar MDA jaringan telapak kaki tikus yang telah diinduksi dengan karagen tersebut.

Hasil penelitian terhadap hambatan kadar MDA pada telapak kaki tikus menunjukkan bahwa, telapak kaki tikus yang diinduksi dengan karagen 0.1 ml dengan konsentrasi 1% dalam larutan NaCl 0.9% dijumpai adanya peningkatan kadar MDA pada kelompok kontrol positif secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok yang diberi Nimesulide dosis 2.1; 4.2 dan 8.4 mg, hal ini disebabkan karena injeksi karagen pada telapak kaki tikus menyebabkan terjadinya inflamasi. Kondisi inflamasi tersebut dapat merangsang terbentuknya radikal bebas melalui proses fagositosis dan sintesa prostaglandin yang dapat menghasilkan O_2^- , H_2O_2 , NO^- , HOCl (Cuzzocrea *et al*, 1999; Nakagawa, 1999). Beberapa model penelitian pada pada kaki tikus yang diinduksi karagen menunjukkan adanya pelepasan histamin, 5-Hidrotriptamin, bradikinin dan prostaglandin, dan kemudian terjadi infiltrasi neutrofil serta pembentukan

radikal bebas seperti hidrogen peroksid, superoksid dan radikal hidroksil (Dawson *et al.*, 1991).

Pada pemberian Nimesulide dosis 2.1mg hambatan MDA pada jaringan telapak kaki tikus yang diinduksi karagen tidak sekuat dibandingkan dengan pemberian Nimesulide dosis 4.2 dan 8.4 mg. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya perbedaan yang bermakna terhadap kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan kelompok yang diberi Nimesulide dosis 4.2 dan 8.4 mg. Adanya perbedaan dalam menghambat MDA pada telapak kaki tikus yang diinduksi karagen pada kelompok yang diberi Nimesulide dosis 2.1 mg terhadap kelompok yang lain berarti bahwa pada dosis tersebut masih memungkinkan radikal bebas masih terbentuk. Sesuai penelitian Cuzzocrea *et al*, 1999, bahwa pembentukan radikal bebas akan semakin meningkat karena terjadi peningkatan infiltrasi PMN pada daerah radang dan kemudian pembentukan radikal bebas terjadi selama proses fagositosis. Kecilnya hambatan MDA pada jaringan telapak kaki tikus pada pemberian Nimesulide dosis 2.1 mg dapat pula menunjukkan bahwa aktivitas PMN pada daerah radang tidak terganggu sehingga hambatan MDA terjadi hanya melalui hambatan aktivitas siklooksigenase yang juga berperan pada pembentukan radikal bebas.

Dalam keadaan normal, senyawa oksigen reaktif selalu terbentuk dalam proses metabolisme fisiologis dan akan dieliminasi oleh enzim-enzim pembersih (*scavenging enzym*) yang bertindak sebagai antioksidan intra dan ekstra seluler. Enzim-enzim yang berperan dalam proses antioksidatif tersebut antara lain superokside dismutase (SOD), katalase dan glutation peroksidase. Tetapi bila jumlah oksidan terlalu banyak atau berlebihan sehingga melampaui anti-oksidan,

maka terjadilah stres oksidatif yang membahayakan dan menimbulkan keadaan yang patologis (Tjokroprawiro, 1995).

Pada pemberian Nimesulide dosis 4.2 dan 8.4 mg hambatan kadar MDA dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif tidak berbeda bermakna, hal ini karena MDA pada jaringan telapak kaki tikus yang diinduksi karagen bisa dihambat melalui siklooksigenase-2 dan phosphodiesterase IV, adanya hambatan ini menyebabkan akumulasi cAMP meningkat yang kemudian bisa menyebabkan hambatan NADPH oksidase dan kemotaksis (Davis and Brogden, 1994) . Tidak adanya perbedaan yang bermakna antara pemberian Nimesulide dosis 4.2 mg dengan dosis 8.4 mg menunjukkan bahwa Nimesulide dosis 4.2 mg merupakan dosis yang efektif dalam menghambat kadar MDA. NSAID dapat menghambat pembentukan radikal bebas melalui aktivitas NADPH oksidase. Aktivasi NADPH oksidase akan menyebabkan pembentukan *superoxide*, *singlet oxygen*, dan *hidroxyl radical*. (Shapira *et al.* 1994).

Proses konversi asam arakhidonat menjadi prostaglandin dan leukotrien oleh siklooksigenase dan lipoksigenase serta Proses fagositosis oleh PMN ini akan menghasilkan sejumlah besar superoksid yang digunakan sebagai bagian dari mekanisme yang bertujuan untuk membunuh mikroorganisme asing, tetapi apabila tubuh tidak dapat mengatasi keadaan tersebut akan diteruskan proses radang kronis yang menyebabkan terjadinya pengumpulan superoksid sehingga kerusakan jaringan akan semakin bertambah luas (Bellanti, 1993; Geronikaki *et al.*, 2003).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian induksi karagen 0.1 ml dengan konsentrasi 1% dalam larutan NaCl 0.9% pada kelompok kontrol positif,

dapat menimbulkan terjadinya inflamasi yang ditunjukkan dengan meningkatnya volume telapak kaki tikus dibandingkan kelompok kontrol negatif yang hanya diberi pelarut obat tanpa diberi induksi karagen. Adanya peningkatan volume pada telapak kaki tikus yang ditimbulkan setelah pemberian karagen berarti bahwa karagen merupakan salah satu penginduksi terjadinya inflamasi. Hal ini karena karagen dapat menyebabkan pelepasan mediator inflamasi seperti histamin, 5-hidroksitriptamin, bradikinin, prostaglandin dan infiltrasi neutrofil serta diikuti pembentukan radikal bebas seperti hidrogen peroksida, ion superoksida dan radikal hidroksil, sehingga dapat menyebabkan peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan aliran darah yang ditunjukkan dengan peningkatan volume edema pada telapak kaki tikus (Lalenti *et al.*, 1995; Dawson *et al.*, 1991).

Karagen merupakan ekstrak kering yang mengandung air dari spesies *Chondrus*, *Gigartina*, *Eucheuna* dan lain-lainnya dari familia *Gigartinaceae* dan *Soliericeae*. Karagen terdiri dari campuran amonium, kalsium, kalium dan garam-garam natrium dari dua polisakarida. Terdiri dari 3 jenis, yaitu Kappa karagen, Lambda dan Iota (Reynolds, 1982), yang kegunaanya sebagai *emulsifying*, *suspending* dan *gelling agent*, juga dapat berfungsi sebagai *inflammatory agent*.

Pada kelompok perlakuan yang diberi Nimesulide dosis 2.1; 4.2 dan 8.4 mg kemudian diberi induksi karagen 0.1 ml dengan konsentrasi 1% dalam larutan NaCl 0.9% menunjukkan adanya hambatan terjadinya inflamasi. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya perbedaan volume edema yang bermakna dibandingkan kelompok kontrol positif sedangkan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yang hanya diberi pelarut obat CMC tidak berbeda bermakna. Adanya hambatan volume edema yang terjadi karena Nimesulide dapat

menghambat sikloksigenase-2 yang berperan pada konversi asam arakhidonat sehingga pembentukan prostaglandin yang berperan penting pada inflamasi tidak terjadi (Goodman and Gilman's, 2001). Inflamasi yang terjadi meliputi kerusakan mikrovaskuler, peningkatan permeabilitas kapiler dan migrasi leukosit ke jaringan radang. Gejala proses inflamasi yaitu berupa tumor, rubor, calor, dolor dan *functio laesa*. Selama berlangsungnya inflamasi akan dilepaskan banyak mediator inflamasi antara lain 5-hidroksitriptamin (5HT), faktor kemotaktik, bradikinin, leukotrien dan prostaglandin. Secara in vitro bahwa prostaglandin (PGE-2) dan prostasiklin (PGI-2) dalam jumlah nanogram, menimbulkan eritema, vasodilatasi dan peningkatan aliran darah lokal. Histamin dan bradikinin dapat meningkatkan permeabilitas vaskuler tetapi efek vasodilatasi tidak besar. Akibat adanya prostaglandin efek eksudasi bradikinin dan histamin menjadi lebih jelas (Goodman and Gilman's, 2001).

Secara umum mekanisme kerja NSAID yaitu menghambat enzim sikloksigenase dari metabolisme asam arakhidonat sehingga menyebabkan hambatan pada produksi prostaglandin (PGE₂, PGF₂, PGD₂), prostasiklin (PGI₂) dan tromboksan (TXA₂) yang selanjutnya menyebabkan timbulnya efek anti-inflamasi, analgesik, antipiretik dan antitrombotik (Rang, 1999).

Pemberian Nimesulide dosis 2.1; 4.2 dan 8.4 mg menunjukkan adanya hubungan dosis, yang berarti bahwa semakin tinggi dosis maka hambatan terhadap volume edema pada telapak kaki tikus akan semakin kuat, begitu pula apabila dosis Nimesulide diturunkan maka kekuatan hambatan volume edema akan semakin rendah, oleh karena itu pada dosis 2.1 mg merupakan dosis yang efektif untuk menghambat terjadinya edema, hal tersebut dikarenakan pada dosis

2.1 mg tidak menunjukkan adanya perbedaan dengan kelompok kontrol negatif dalam menghambat volume edema. Apabila dosis tersebut dikonversikan terhadap manusia diperoleh sebesar 100 mg, maka sesuai dengan penelitian Bernareggi, 1998, bahwa Nimesulide dosis 100 mg yang diberikan pada manusia efektif dalam menghambat terjadinya inflamasi.

Pada penelitian mengenai hubungan antara hambatan kadar MDA terhadap volume edema menunjukkan adanya korelasi yang kuat (0.884). Penghambatan pembentukan radikal bebas pada jaringan telapak kaki tikus yang diinduksi karagen menunjukkan adanya hambatan pada volume edema. Hal ini karena pemberian Nimesulide pada dosis 2.1; 4.2 dan 8.4 mg dapat menghambat pembentukan radikal bebas sehingga proses inflamasi yang terjadi tidak bertambah luas. Cuzzocrea *et al*, 1999, menyatakan bahwa pemberian antioksidan selama proses inflamasi dapat mengurangi terjadinya inflamasi melalui hambatan aktivitas mieloperoksidase. Telah dilaporkan bahwa Nimesulide selain dapat menghambat aktivitas sikloksigenase-2 dapat pula menghambat phosphodiesterase IV, akibat dari adanya hambatan ini menyebabkan akumulasi cAMP meningkat, kemudian menyebabkan hambatan NADPH oksidase dan kemotaksis (Davis and Brogden, 1994) . aktivasi NADPH oksidase akan menyebabkan pembentukan *superoxide*, *singlet oxygen*, dan *hidroxyl radical* (Shapira *et al*. 1994). Adanya efek Nimesulide pada hambatan NADPH oksidase dan kemotaksis dapat meningkatkan hambatan pembentukan radikal bebas selain dari hambatan sikloksigenase-2, sehingga menyebabkan hambatan kadar MDA yang disertai adanya hambatan terjadinya inflamasi, dalam hal ini adalah volume edema sesuai penelitian Cuzzocrea *et al*, 1999.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 KESIMPULAN

Hasil dari penelitian pada telapak kaki tikus yang diinduksi karagen sebagai penginduksi inflamasi bahwa :

1. Pemberian Nimesulide dosis 2.1; 4.2 dan 8.4 mg/200 gBB, dapat mempengaruhi kadar *malondialdehyde* (MDA) pada jaringan telapak kaki tikus putih (wistar) yang diinduksi karagen
2. Pemberian Nimesulide dosis 2.1; 4.2 dan 8.4 mg/200 gBB dapat mempengaruhi volume edema pada telapak kaki tikus putih (wistar) yang diinduksi karagen
3. Terdapat hubungan antara hambatan kadar *malondialdehyde* (MDA) dengan volume edema pada telapak kaki tikus putih (wistar) yang diinduksi karagen.

7.2 SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek Nimesulide sebagai antioksidan terhadap gambaran histologis pada jaringan yang mengalami inflamasi.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui jenis radikal bebas yang berperan pada kondisi inflamasi sehingga dalam terapi nantinya digunakan antioksidan yang lebih tepat.



DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar S, 2001. Inhibitor Multifaktor Nyeri Untuk Terapi Pasca tindakan Endodontik Akut. Paper Beyond Cox-2 Pain and Inflammation. Temu Ilmiah Nasional Ilmu Kedokteran Gigi II:23-31
- Basu S, 2001. Theorized Mechanism of Non-Steoidal Anti-Inflammatory Drugs Againts Alzheimer's Disease Onset and Progression. American Neurology 45:1441-1445.
- Bellanti JA, 1993. Imunologi Umum. Immunology III. Alih bahasa Samik Wahab dan noerhajati Soeripto. Yogyakarta : Gajah Mada Upress, hal 18-57.
- Bernareggi A, 1998. Clinical Phamacokinetics of Nimesulide. Clin Pharmaco 35: 247-274.
- Cuzzocrea S, Tan DX, Costantino G, Mazzon E, Caputi AP, Reiter RJ, 1999. The Protective Role of Endogenous Melatonin in Carragenan-Induced Pleurisy in The Rat. Faseb Journal 13:1930-1938.
- Cuzzocrea S, Costantino G, Mazzon E, Zingarelli B, De Sarro A, Caputi AP, 1999. Protective Effect of Mn(III) Tetrakis (4-Benzoic Acid) Porphyrin (MnTBAP), a Superoxide Dismutase Mimetic, in Paw Oedem Induced by Carrageenan in the Rat. Biochemical Pharmacology 58:171-176.
- Davis R and Brogden RN, 1994. Nimesulide : An Update of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Efficacy Drugs 48(3) : 431-454.
- Dawson J, sedgwick AD, Edward JC and Lees P, 1991. A Comparativestudy of The Cellular, Exudative and Histological Responses to Carragenan, Dextran and Zymosan In The Mouse. Int J Tissue React 13: 171-185.
- Di Rosa M, and Willoughby DA, 1971. Screens for Anti Inflammatory drugs. J Pharm Pharmacol 23: 297-306
- Djoenaidi W, Pengobatan Gangguan Peredaran Darah Otak Akut (Stoke) Atas Dasar patofisiologinya. Neurona 10: 19-22.

- Droge W, 2002. Free Radical in The Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 82(1): 47-95.
- Geronikaki A, Hadjipavlou-Lilina D, Chatziopoulos C, and Soloupis G. Synthesis Biological Evaluation of New 4,5-Disubstituted-Thiazolyl Amides Derivates of 4-Hydroxy-Piperidine or of 4-N-Methyl Piperazine. *Molecul* 8:472-479.
- Goodman & Gilman's, 2001. Pharmacology Basic of Therapeutics : Analgesic-Antipyretic and Anti-Inflammatory Agents and Drugs Employed in The Treatment of Gout. 10th Ed. New York : McGraw-Hill Medical Publishing Division, p 687-731.
- Halliwell B, 1994. Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease : Curiosity, Cause, or Consequence ?. *Lancet* 344: 721-724.
- Lalenti A, Ianaro A, Moncada S, Dirosa M, 1995. Modulation of Acute Inflammation by Endogenous Nitric oxide. *Eur J Phamacol* 211: 177-182.
- Lameshow S, Hosmer DW, Klar J, 1990. Adequacy of Sample Size in Health Studies. New York : John Wiley and Sons Ltd, WHO, p 36-38.
- Lin JK, Chen PC, Hoct, Lin-Shiau SY, 2000. Inhibition of Xanthin Oxidase and Suppression of Intracellular Reactive Oxygen Species in HL-60 Cells by Theavlafin-3,3'-Digallate, (-)-Epigallocatechin-3-Gallate, and Propyl Gallate. *J Agric Food Chem* 48(7):2736-2743.
- McMillan DC, 2000. Changes in Micronutrient Concentrations Following Anti-Inflammatory Treatment in Patients with Gastrointestinal Cancer. *Nutrition* 16: 425-428.
- Nakagawa K, 1999. Catechin Supplementation Increases Antioxidant Capacity and Prevent Phospholipid Hydroperoxidation in Plasma of Human. *J Agric Food Chem* 47(10):3967-3973.
- Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K, 1979. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem* 95:351-358.

- Offenbacher S, Heasmann P.A, Collins J.G, 1993. Modulation of Host PGE-2 Secretion as a Determinant of Periodontal Disease Expression. *J. Periodontal* 64:432-444.
- Paget G & Barnes JM, 1964. Evaluation Drug Activities : Pharmacometries. Vol.1. London : Academic Press, p 161.
- Peck M.D, 1994. Interaction of Lipids with Immune Function. Experimental Clinical Studies of Lipids and Immunity. *J.Nutr Biochem* 5: 514-521.
- Rang, 1999. Pharmacology : Local Hormones, Inflammation, and Allergy. 4th Ed. Eidenburg, Churchil Livingstone : Longman Group, p 243-280.
- Ramelan W, 2003. Antioksidan : Peranannya dalam Kedokteran. *Medika*. 6: 370-372.
- Reynold JEF, 1982. Martindale the extra pharmacopoeia. 28th Ed. London : The Pharmaceutical Press, p 273.
- Rich JB, Rastrusson DX., Folstein DX., Carson KA.,Brandt J.,1995. NonSteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Alzheimer's Disease. *Neurology* 45: 51-5.
- Sandoval M, Okuhama NN, Zhang XJ, Condezo LA, Lao J., Angeles's FM, Muzah RA, Bobrowski P, Miller MJ, 2002. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of Cat's Claw (*Uncaria Tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are Indipendent of Their Alkaloid Content. *Phytomedicine* 9(4): 325-37.
- Saphira L, Champagne C, Gordon B, Amar S, Dyke TE, 1994. Inflammation. Basic and Clinical Immunology. 9th ed. Pentice-Hall International Inc. pp. 124-129.
- Setiati S, 2003. Radikal Bebas, Antioksidan dan Proses Menua. *Medika* 6:366-369.
- Soebagyo RL, 2001. Nimesulide : an NSAID that preferentially inhibits COX-2. Paper Beyond Cox-2 Pain and Inflammation. Temu Ilmiah Nasional Ilmu Kedokteran Gigi II:1-10.

Stohs SJ, 1995. The Role of Free Radical in Toxicity and Disease. J.Basic Clin Physiol Pharmacol. 6(3-4): 205-28.

Suryohusodo P, 1997. Oksidan dan Antioksidan pada Diabetes Melitus. Diabetes Update III. Surabaya, 14-15 november. hal. 27-39.

Tjokroprawiro A, 1995. Peranan Stres Oksidatif Pada Diabetes Mellitus dan Komplikasinya. Simposium Dampak Negatif Radikal Bebas Pada Organ Tubuh dan Manfaat Anti-Oksidan. Hal. 23-31.

Vane JR, 1999. Nonsteroid Drugs Selektivities for Cyclo-oxygenase-1 rather than Cyclo-oxygenase-2 are Associated with Human gastrointestinal Toxicity. Proc. Netl. Acad. Sci. USA. Vol. 96. pp. 7563-7568.

Ward PA, Warren JS, Johnson K.J, 1998. Oxygen Radical, Inflammation and Tissue Injury. Free radical Biology & Medicine. 5: 403-408.

Wijaya A, 1996. Radikal Bebas dan Parameter Status Antioksidan. Forum Diagnosticum Prodia. Surabaya : Diagnostic Educational Services, hal 1- 2.

Wilmana PF, 1996. Farmakologi dan Terapi : Analgesik-Antipiretik Analgesik Anti-inflamasi Nonsteroid dan Obat Pirai, Bagian Farmakologi FK UI. Edisi 4. hal. 207-222.

Wu D, Yu L, Nair MG, Dewitt DL, Ramsewak RS, 2002. Cyclooxygenase enzyme inhibitory compounds with antioxidant activities from piper methysticum (Kava-kava) roots. Phytomedicine 9(1):41-47.

Lampiran 1. Tabel konversi dosis

Tabel perbandingan dosis

	20 g Mouse	200 g Rat	400 g Guinea pig	1.5 kg Rabbit	2.0 kg Cat	4.0 kg Monkey	12.0 kg Dog	70 kg Man
20 g Mouse	1.0	7.00	12.25	27.80	29.70	64.10	124.20	387.90
200 g Rat	0.14	1.0	1.74	3.90	4.20	9.20	17.80	56.00
400 g Guinea pig	0.08	0.57	1.0	2.25	2.40	5.20	10.20	31.50
1.5 kg Rabbit	0.04	0.25	0.44	1.0	1.08	2.40	4.50	14.20
2.0 kg Cat	0.03	0.23	0.41	0.92	1.0	2.20	4.10	13.00
4.0 kg Monkey	0.02	0.11	0.19	0.42	0.45	1.0	1.90	6.10
12.0 kg Dog	0.01	0.06	0.10	0.22	0.24	0.52	1.0	3.10
70 kg Man	0.00	0.02	0.03	0.07	0.08	0.16	0.32	1.0

Sumber : Paget G & Barnes JM, 1964. Evaluation Drug Activities : Pharmacometries. Vol.1. London : Academic Press, p 161.

Perhitungan dosis : dosis Nimesulide = $2 \times 100 \text{ mg/ hari} / 60 \text{ kgBB}$

Nimesulide dosis terapi = 100 mg

Dosis rat berat 200 g :

$$= 70/60 \times 100 \times 0,018$$

$$= 2,1 \text{ mg/ 200 gbb rat}$$

$$= 10,5 \text{ mg/ kg}$$

$$= 1,05 \text{ mg/ cc} \rightarrow \mathbf{D1}$$

Nimesulide dosis 2 kali = 200 mg

Dosis rat berat 200 g :

$$= 70/60 \times 200 \times 0,018$$

$$= 4,2 \text{ mg/ 200 gbb rat}$$

$$= 21 \text{ mg/ kg}$$

$$= 2,1 \text{ mg/ cc} \rightarrow \mathbf{D2}$$

Nimesulide dosis 3 kali = 300

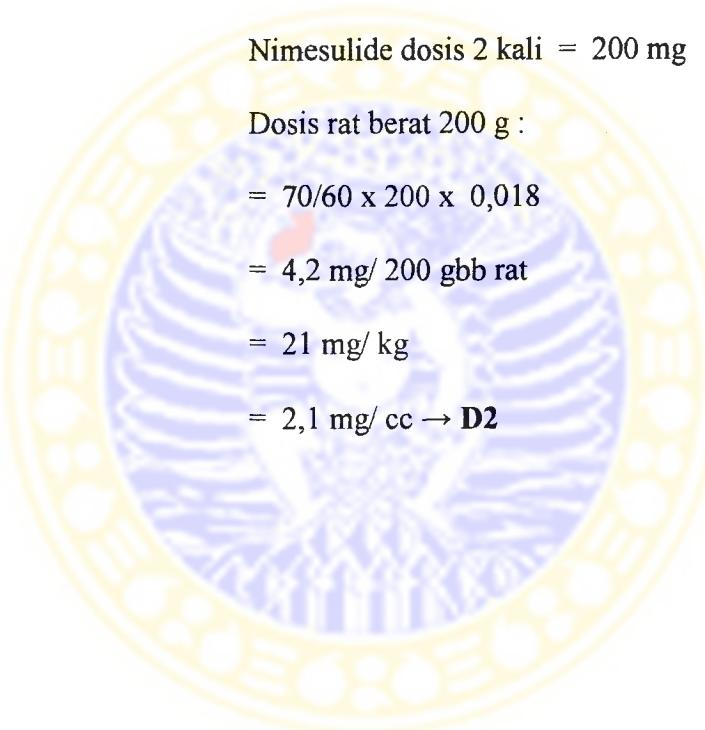
Dosis rat berat 200 g :

$$= 70/60 \times 300 \times 0,018$$

$$= 6,4 \text{ mg/ 200 gbb rat}$$

$$= 42 \text{ mg/ kg}$$

$$= 4,2 \text{ mg/ cc} \rightarrow \mathbf{D3}$$



Lampiran 2. Photo pelaksanaan penelitian



Photo 1. Pengukuran Volume odem



Photo 2. Ttelapak kaki tikus yang telah diambil jaringan inflamasi



Photo 3. Pembekuan jaringan telapak kaki tikus yang akan diperiksa kadar MDA

Lampiran 3. Data pengukuran volume oedem

Kontrol negatif (K-)

No	waktu														
	0'	15'	30'	45'	60'	75'	90'	105'	120'	135'	150'	165'	180'		
1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		

Kontrol Positif (K+)

No	waktu														
	0'	15'	30'	45'	60'	75'	90'	105'	120'	135'	150'	165'	180'		
1	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8	0.9	0.9	1.1	1.2	1.2	1.4		
2	0.0	0.2	0.3	0.5	0.7	0.7	0.8	0.8	1.0	1.1	1.2	1.3	1.6		
3	0.0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.8	0.9	1.0	1.1	1.2	1.3	1.3	1.5		
4	0.0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.1	1.2	1.2	1.4		
5	0.0	0.0	0.2	0.3	0.5	0.7	0.8	0.9	0.9	1.0	1.1	1.2	1.3		
6	0.0	0.1	0.2	0.3	0.5	0.7	0.8	0.9	0.9	1.0	1.1	1.1	1.2		

Nimesulide dosis 2,1 mg (D1)

No	waktu														
	0'	15'	30'	45'	60'	75'	90'	105'	120'	135'	150'	165'	180'		
1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
5	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Nimesulide dosis 4,2 mg (D2)

No	waktu														
	0'	15'	30'	45'	60'	75'	90'	105'	120'	135'	150'	165'	180'		
1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Lampiran 4. Penghitungan kadar MDA

Larutan Baku (μg)	Absorban (532 nm)
0.502	0.027
0.756	0.040
1.004	0.052
1.255	0.064
1.506	0.074
2.51	0.128

Persamaan regresi :

$$r = 0,9992$$

$$Y = C + bX$$

$$Y = 1,5417 \cdot 10^{-3} + 0,0499 X$$

Keterangan :

R = rho = koefisien korelasi

Y = absorban

C = konstanta

X = kadar MDA

Contoh :

$$Y = 0,099 \rightarrow X = 1,9531 \mu\text{g} / 10 \text{ ml}$$

Berat jaringan W = 0,3555 g

$$\rightarrow \frac{1,9531}{0,3555} = 5,4939 \mu\text{g} / \text{g jaringan}$$

berat molekul larutan standar = 164,2

$$\rightarrow \frac{5,4939}{164,2} = 0,0335 \mu\text{mol} / \text{g jaringan}$$

maka X = 33,4584 nmol / g jaringan

Nimesulide dosis 8,4 mg (D3)

No	waktu													
	0'	15'	30'	45'	60'	75'	90'	105'	120'	135'	150'	165'		
1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

lampiran 5. Data absorban dan berat jaringan

Kontrol Negatif (K -)

Kelompok	No	Berat Jaringan (g)	Absorban
K -	1	0,2564	0,0754
K -	2	0,2520	0,0706
K -	3	0,2530	0,0725
K -	4	0,2520	0,0751
K -	5	0,2515	0,0723
K -	6	0,2531	0,0717

Kontrol Positif (K +)

Kelompok	No	Berat Jaringan (g)	Absorban
K+	1	0,2564	0,0754
K+	2	0,2520	0,0706
K+	3	0,2530	0,0725
K+	4	0,2520	0,0751
K+	5	0,2515	0,0723
K+	6	0,2531	0,0717

Nimesulide dosis 2,1 mg (D1)

Kelompok	No	Berat Jaringan (g)	Absorban
D1	1	0,2564	0,0754
D1	2	0,2520	0,0706
D1	3	0,2530	0,0725
D1	4	0,2520	0,0751
D1	5	0,2515	0,0723
D1	6	0,2531	0,0717

Nimesulide dosis 4,2 mg (D2)

Kelompok	No	Berat Jaringan (g)	Absorban
D2	1	0,2564	0,0754
D2	2	0,2520	0,0706
D2	3	0,2530	0,0725
D2	4	0,2520	0,0751
D2	5	0,2515	0,0723
D2	6	0,2531	0,0717

Nimesulide dosis 8,4 mg (D3)

Kelompok	No	Berat Jaringan (g)	Absorban
D3	1	0,2564	0,0754
D3	2	0,2520	0,0706
D3	3	0,2530	0,0725
D3	4	0,2520	0,0751
D3	5	0,2515	0,0723
D3	6	0,2531	0,0717

lampiran 6. Kadar MDA

Kontrol Negatif (K -)

Kelompok	No	MDA (nmol/g)
K -	1	35.17
K -	2	33.45
K -	3	34.26
K -	4	35.66
K -	5	34.35
K -	6	33.84

Kontrol Positif (K +)

Kelompok	No	MDA (nmol/g)
K+	1	103.24
K+	2	104.51
K+	3	103.41
K+	4	103.62
K+	5	102.65
K+	6	102.37

Nimesulide dosis 2,1 mg (D1)

Kelompok	No	MDA (nmol/g)
D1	1	73.23
D1	2	69.97
D1	3	71.42
D1	4	70.11
D1	5	70.28
D1	6	71.57

Nimesulide dosis 4,2 mg (D2)

Kelompok	No	MDA (nmol/g)
D2	1	36.23
D2	2	34.1
D2	3	35.21
D2	4	35.67
D2	5	35.14
D2	6	35.29

Nimesulide dosis 8,4 mg (D3)

Kelompok	No	MDA (nmol/g)
D3	1	35.15
D3	2	34.47
D3	3	35.14
D3	4	34.56
D3	5	34.93
D3	6	35.22

Lampiran 7. Analisa statistik

Oneway**Descriptives**

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
Malondialdehyd	K- = Kontrol negatif	6	34,4550	,8247	,3367
	K+ = Kontrol Positif	6	103,3000	,7576	,3093
	D1 = Nimesulide 2,1 mg	6	71,0967	1,2482	,5096
	D2 = Nimesulide 4,2 mg	6	35,2733	,7030	,2870
	D3 = Nimesulide 8,4	6	34,9117	,3234	,1320
	Total	30	55,8073	28,0628	5,1235
Oedem	K- = Kontrol negatif	6	,0000	,0000	,0000
	K+ = Kontrol Positif	6	1,4000	,1414	5,774E-02
	D1 = Nimesulide 2,1 mg	6	5,000E-02	5,477E-02	2,236E-02
	D2 = Nimesulide 4,2 mg	6	3,333E-02	5,164E-02	2,108E-02
	D3 = Nimesulide 8,4	6	,0000	,0000	,0000
	Total	30	,2967	,5654	,1032

Descriptives

		95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
		Lower Bound	Upper Bound		
Malondialdehyd	K- = Kontrol negatif	33,5895	35,3205	33,45	35,66
	K+ = Kontrol Positif	102,5050	104,0950	102,37	104,51
	D1 = Nimesulide 2,1 mg	69,7868	72,4065	69,97	73,23
	D2 = Nimesulide 4,2 mg	34,5355	36,0111	34,10	36,23
	D3 = Nimesulide 8,4	34,5722	35,2511	34,47	35,22
	Total	45,3285	66,2862	33,45	104,51
Oedem	K- = Kontrol negatif	,0000	,0000	,00	,00
	K+ = Kontrol Positif	1,2516	1,5484	1,20	1,60
	D1 = Nimesulide 2,1 mg	-7,4800E-03	,1075	,00	,10
	D2 = Nimesulide 4,2 mg	-2,0859E-02	8,753E-02	,00	,10
	D3 = Nimesulide 8,4	,0000	,0000	,00	,00
	Total	8,555E-02	,5078	,00	1,60

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Malondialdehyd	1,919	4	25	,139
Oedem	6,250	4	25	,001

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Malondialdehyd	Between Groups	22821,080	4	5705,270	8363,487	,000
	Within Groups	17,054	25	,682		
	Total	22838,134	29			
Oedem	Between Groups	9,141	4	2,285	445,195	,000
	Within Groups	,128	25	5,133E-03		
	Total	9,270	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Malondialdehyd	K- = Kontrol negatif	K+ = Kontrol Positif	-68,8450*	,4769	,000
		D1 = Nimesulide 2,1 mg	-36,6417*	,4769	,000
		D2 = Nimesulide 4,2 mg	,8183	,4769	,099
		D3 = Nimesulide 8,4	-,4567	,4769	,347
	K+ = Kontrol Positif	K- = Kontrol negatif	68,8450*	,4769	,000
		D1 = Nimesulide 2,1 mg	32,2033*	,4769	,000
		D2 = Nimesulide 4,2 mg	68,0267*	,4769	,000
		D3 = Nimesulide 8,4	68,3883*	,4769	,000
	D1 = Nimesulide 2,1 mg	K- = Kontrol negatif	36,6417*	,4769	,000
		K+ = Kontrol Positif	-32,2033*	,4769	,000
		D2 = Nimesulide 4,2 mg	35,8233*	,4769	,000
		D3 = Nimesulide 8,4	36,1850*	,4769	,000
	D2 = Nimesulide 4,2 mg	K- = Kontrol negatif	,8183	,4769	,099
		K+ = Kontrol Positif	-68,0267*	,4769	,000
		D1 = Nimesulide 2,1 mg	-35,8233*	,4769	,000
		D3 = Nimesulide 8,4	,3617	,4769	,455
	D3 = Nimesulide 8,4	K- = Kontrol negatif	,4567	,4769	,347
		K+ = Kontrol Positif	-68,3883*	,4769	,000
		D1 = Nimesulide 2,1 mg	-36,1850*	,4769	,000
		D2 = Nimesulide 4,2 mg	-,3617	,4769	,455
Oedem	K- = Kontrol negatif	K+ = Kontrol Positif	-1,4000*	4,137E-02	,000
		D1 = Nimesulide 2,1 mg	-5,0000E-02	4,137E-02	,238
		D2 = Nimesulide 4,2 mg	-3,3333E-02	4,137E-02	,428
		D3 = Nimesulide 8,4	,0000	4,137E-02	1,000
	K+ = Kontrol Positif	K- = Kontrol negatif	1,4000*	4,137E-02	,000
		D1 = Nimesulide 2,1 mg	1,3500*	4,137E-02	,000
		D2 = Nimesulide 4,2 mg	1,3667*	4,137E-02	,000
		D3 = Nimesulide 8,4	1,4000*	4,137E-02	,000
	D1 = Nimesulide 2,1 mg	K- = Kontrol negatif	5,000E-02	4,137E-02	,238
		K+ = Kontrol Positif	-1,3500*	4,137E-02	,000
		D2 = Nimesulide 4,2 mg	1,667E-02	4,137E-02	,690
		D3 = Nimesulide 8,4	5,000E-02	4,137E-02	,238
	D2 = Nimesulide 4,2 mg	K- = Kontrol negatif	3,333E-02	4,137E-02	,428
		K+ = Kontrol Positif	-1,3667*	4,137E-02	,000
		D1 = Nimesulide 2,1 mg	-1,6667E-02	4,137E-02	,690
		D3 = Nimesulide 8,4	3,333E-02	4,137E-02	,428
	D3 = Nimesulide 8,4	K- = Kontrol negatif	,0000	4,137E-02	1,000
		K+ = Kontrol Positif	-1,4000*	4,137E-02	,000
		D1 = Nimesulide 2,1 mg	-5,0000E-02	4,137E-02	,238
		D2 = Nimesulide 4,2 mg	-3,3333E-02	4,137E-02	,428

LSD

Dependent Variable	(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Malondialdehyd	K- = Kontrol negatif	K+ = Kontrol Positif	-69,8271	-67,8629
		D1 = Nimesulide 2,1 mg	-37,6238	-35,6596
		D2 = Nimesulide 4,2 mg	-1,8004	,1638
		D3 = Nimesulide 8,4	-1,4388	,5254
	K+ = Kontrol Positif	K- = Kontrol negatif	67,8629	69,8271
		D1 = Nimesulide 2,1 mg	31,2212	33,1854
		D2 = Nimesulide 4,2 mg	67,0446	69,0088
		D3 = Nimesulide 8,4	67,4062	69,3704
	D1 = Nimesulide 2,1 mg	K- = Kontrol negatif	35,6596	37,6238
		K+ = Kontrol Positif	-33,1854	-31,2212
		D2 = Nimesulide 4,2 mg	34,8412	36,8054
		D3 = Nimesulide 8,4	35,2029	37,1671
	D2 = Nimesulide 4,2 mg	K- = Kontrol negatif	-,1638	1,8004
		K+ = Kontrol Positif	-69,0088	-67,0446
		D1 = Nimesulide 2,1 mg	-36,8054	-34,8412
		D3 = Nimesulide 8,4	-,6204	1,3438
	D3 = Nimesulide 8,4	K- = Kontrol negatif	-,5254	1,4388
		K+ = Kontrol Positif	-69,3704	-67,4062
		D1 = Nimesulide 2,1 mg	-37,1671	-35,2029
		D2 = Nimesulide 4,2 mg	-1,3438	,6204
Oedem	K- = Kontrol negatif	K+ = Kontrol Positif	-1,4852	-1,3148
		D1 = Nimesulide 2,1 mg	-,1352	3,519E-02
		D2 = Nimesulide 4,2 mg	-,1185	5,186E-02
		D3 = Nimesulide 8,4	-8,5194E-02	8,519E-02
	K+ = Kontrol Positif	K- = Kontrol negatif	1,3148	1,4852
		D1 = Nimesulide 2,1 mg	1,2648	1,4352
		D2 = Nimesulide 4,2 mg	1,2815	1,4519
		D3 = Nimesulide 8,4	1,3148	1,4852
	D1 = Nimesulide 2,1 mg	K- = Kontrol negatif	-3,5194E-02	,1352
		K+ = Kontrol Positif	-1,4352	-1,2648
		D2 = Nimesulide 4,2 mg	-6,8527E-02	,1019
		D3 = Nimesulide 8,4	-3,5194E-02	,1352
	D2 = Nimesulide 4,2 mg	K- = Kontrol negatif	-5,1861E-02	,1185
		K+ = Kontrol Positif	-1,4519	-1,2815
		D1 = Nimesulide 2,1 mg	-,1019	6,853E-02
		D3 = Nimesulide 8,4	-5,1861E-02	,1185
	D3 = Nimesulide 8,4	K- = Kontrol negatif	-8,5194E-02	8,519E-02
		K+ = Kontrol Positif	-1,4852	-1,3148
		D1 = Nimesulide 2,1 mg	-,1352	3,519E-02
		D2 = Nimesulide 4,2 mg	-,1185	5,186E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Correlations

Correlations

		kadar MDA kelompok	volume oedem
kadar MDA kelompok	Pearson Correlation	1.000	.884**
	Sig. (1-tailed)		.000
	N	30	30
volume oedem	Pearson Correlation	.884**	1.000
	Sig. (1-tailed)	.000	
	N	30	30

**. Correlation is significant at the 0.01 level (1-tailed).

