



**PENGARUH PEMBERIAN MINYAK IKAN LEMURU (*Sardinella longiceps*)
TERHADAP DENSITAS SERABUT KOLAGEN KARTILAGO
SENDI TEMPOROMANDIBULA TIKUS YANG
MENGALAMI OSTEOARTRITIS**

SKRIPSI

Oleh

**Dwi Riski Saputra
NIM 121610101037**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



**PENGARUH PEMBERIAN MINYAK IKAN LEMURU (*Sardinella longiceps*)
TERHADAP DENSITAS SERABUT KOLAGEN KARTILAGO
SENDI TEMPOROMANDIBULA TIKUS YANG
MENGALAMI OSTEOARTRITIS**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh

Dwi Riski Saputra
NIM 121610101037

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2016

PERSEMBAHAN

Dengan setulus hati karya tulis ini saya persembahkan untuk :

1. Ibunda Sri Indarti, S.Pd. MM. dan ayahanda Sudarjo, yang selalu memberikan kasih sayang, mendukung, memotivasi, membantu dan mengiringi setiap langkah saya. Terima kasih atas segala nasehat, perhatian, pengorbanan, dan doa-doa yang telah dilantunkan setiap hari.
2. Para guru dan dosen saya yang telah memberikan ilmu yang bermanfa'at bagi saya.
3. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang saya banggakan.

MOTTO

“Hai orang-orang beriman apabila dikatakan kepadamu: "Berlapang-lapanglah dalam majlis", maka lapangkanlah niscaya Allah akan memberi kelapangan untukmu. Dan apabila dikatakan: "Berdirilah kamu", maka berdirilah, niscaya Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antaramu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat. Dan Allah Maha Mengetahui apa yang kamu kerjakan”

(Surat Al-Mujadalah ayat 11)*

Dan apabila hamba-hamba-Ku bertanya kepadamu tentang Aku, maka (jawablah), bahwasanya Aku adalah dekat. Aku mengabulkan permohonan orang yang berdoa apabila ia memohon kepada-Ku, maka hendaklah mereka itu memenuhi (segala perintah-Ku) dan hendaklah mereka beriman kepada-Ku, agar mereka selalu berada dalam kebenaran.

(Surat Al-Baqarah ayat 186)**

*) Q.S Al-Mujadalah ayat 11, Al-Qur'an

**) Q.S Al-Baqarah ayat 186, Al-Qur'an

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama: Dwi Riski Saputra

NIM : 121610101037

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Pengaruh Pemberian Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) Terhadap Densitas Serabut Kolagen Kartilago Sendi Temporomandibula Tikus yang Mengalami Osteoarthritis” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada insitusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 9 Mei 2016
Yang menyatakan

Dwi Riski Saputra
NIM 121610101037

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN MINYAK IKAN LEMURU (*Sardinella longiceps*)
TERHADAP DENSITAS SERABUT KOLAGEN KARTILAGO SENDI
TEMPOROMANDIBULA TIKUS YANG
MENGALAMI OSTEOARTRITIS**

Oleh

Dwi Riski Saputra
NIM 121610101037

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Dwi Merry Christmarini Robin, M. Kes

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Suhartini, M. Biotech

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Pemberian Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) Terhadap Densitas Serabut Kolagen Kartilago Sendi Temporomandibula Tikus yang Mengalami Osteoarthritis” ini telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada :

Hari, tanggal : Senin, 9 Mei 2016

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Dosen Penguji Ketua,

Dosen Penguji Anggota

Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes
NIP 197005091999032001

Dr. drg. Didin Erma Indahyani, M.Kes
NIP 196903031997022001

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Pendamping,

drg. Dwi Merry Christmarini Robin, M.Kes
NIP. 197712232008122002

drg. Suhartini, M. Biotech
NIP 197909262006042002

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedoktera Gigi Universitas Jember,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prost
NIP. 196901121999601001

RINGKASAN

Pengaruh Pemberian Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) Terhadap Densitas Serabut Kolagen Kartilago Sendi Temporomandibula Tikus yang Mengalami Osteoarthritis, Dwi Riski Saputra, 121610101037; 2016: 82 halaman: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Permukaan artikulasi sendi temporomandibula dilapisi oleh jaringan fibrokartilago yang berperan sebagai peredam benturan (Herb dkk, 2006; Tanaka dan Van, 2003 dalam Kuroda dkk, 2009; Mescher, 2011). Dalam rangka menunjang peranan tersebut, kartilago sendi temporomandibula memiliki komponen utama berupa serabut kolagen yang memberikan sifat elastis pada kartilago (Singh, 2008 dalam Kuroda dkk, 2009). Berkurangnya densitas serabut kolagen kartilago sendi dapat meningkatkan resiko terjadinya gesekan antar permukaan artikulasi yang dapat meningkatkan progresivitas penyakit inflamasi sendi (Bhosale dan Richardson, 2008).

Osteoarthritis merupakan salah satu penyakit sendi temporomandibula yang bersifat kronik, memiliki progresivitas lambat, serta ditandai dengan menipisnya kartilago sendi (Tanaka, 2008 dalam Kuroda dkk, 2009). Etiologi osteoarthritis sendi temporomandibula belum diketahui secara pasti, dan bersifat multifaktorial, trauma, infeksi, beban berlebih, serta penuaan diduga berpotensi memicu terjadinya osteoarthritis (Manfredini dan Lobbezoo, 2011).

Minyak ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) mengandung *eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *docosahexaenoic acid* (DHA) tertinggi dibandingkan dengan jenis minyak ikan lainnya (Suseno dkk, 2014). Produk eikosanoid dari EPA dan DHA minyak ikan memiliki sifat antiinflamasi dengan menurunkan produksi eikosanoid poten berupa prostaglandin E₂ (PGE₂) dan leukotrin B₄ (LTB₄). Produk eikosanoid dari EPA dan DHA berpotensi menghambat sintesis sitokin proinflamator berupa interleukin I- β (IL-1 β) dan *tumor necrotizing factor- α* (TNF- α) yang menjadi mediator utama dalam proses insiasi dan perkembangan kerusakan sendi (Calder, 2012;

Cleland dkk, 2003). Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian minyak ikan Lemuru (*S. longiceps*) selama 7, 14 dan 21 hari terhadap densitas serabut kolagen sendi temporomandibula tikus yang mengalami osteoarthritis. Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan menggunakan rancangan penelitian *post test only control group design*. Sampel yang digunakan sebanyak 24 ekor tikus dibagi dalam dua kelompok yaitu kelompok kontrol dan perlakuan. Induksi osteoarthritis dilakukan dengan menginjeksikan *complete freund's adjuvant (CFA)* secara intraartikular pada sendi temporomandibula tikus sebelah kanan. Empat minggu pasca injeksi CFA, dilakukan pemberian salin pada kelompok kontrol dan minyak ikan Lemuru (*S. longiceps*) pada kelompok perlakuan. Dekapitasi dilakukan pada hari ke-7, hari ke-14, dan hari ke-21 yang dilanjutkan dengan tahapan pemrosesan jaringan. Setelah itu dilakukan pembuatan preparat histologis dengan metode blok paraffin dan dilakukan pengecatan menggunakan *Mallory Trichrome*. Pengamatan densitas serabut kolagen dilakukan dibawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 400 kali.

Hasil penelitian menunjukkan pemberian minyak Ikan Lemuru dapat meningkatkan densitas serabut kolagen kartilago sendi temporomandibula tikus secara signifikan ($P < 0,05$) yaitu antara kelompok kontrol dan perlakuan pada hari ke-14 dan 21, sedangkan didapatkan perbedaan yang tidak signifikan ($P > 0,05$) antara kelompok kontrol dan perlakuan hari ke-7. Densitas serabut kolagen paling tebal terdapat pada kelompok perlakuan hari ke-21 sedangkan densitas serabut kolagen tipis didapatkan pada kelompok kontrol hari ke-14 dan hari ke-21. Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian minyak ikan Lemuru selama 7, 14 dan 21 hari berpengaruh terhadap densitas serabut kolagen kartilago sendi temporomandibula tikus yang mengalami osteoarthritis.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah Subhanahuwata'ala atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) Terhadap Densitas Serabut Kolagen Kartilago Sendi Temporomandibua Tikus yang Mengalami Osteoarthritis.” Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua, Ibunda Sri Indarti, S.Pd. M.M. dan Ayahanda Sudarjo yang selalu mengiringi disetiap perjuangan, mendidik saya dengan penuh kesabaran untuk menjadi seseorang yang tangguh dan berani sukses.
2. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp.Prost., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
3. drg. Dwi Merry Christmarini Robin, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. Suhartini, M.Biotech., selaku Pembimbing Pendamping yang telah memberikan bimbingan, saran serta motivasi dengan penuh kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
4. Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes., selaku Dosen Penguji Ketua dan Dr. drg. Didin Erma Indahyani, M.Kes., selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan masukan pemikiran yang sangat membangun demi kesempurnaan skripsi ini.
5. drg. Raditya Nugroho, Sp. KG selaku Dosen Pembimbing Akademik yang selalu memotivasi dan memberikan saran dalam menempuh masa studi di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

6. Sahabat saya semua Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember angkatan 2012 yang tidak bisa saya ucapkan satu persatu, terima kasih atas kerja samanya dan semoga semua personel menjadi pribadi yang sukses.
7. Sahabat-sahabat saya ikhwah Unit Kegiatan Mahasiswa Kerohanian Islam Fakultas Islamic Dentistry (ID), dan Forum Ukhuwah Lembaga Dakwah Mahasiswa Kedokteran Gigi (FULDMKG) se-Indonesia yang telah memberikan motivasi dan doa-doa dalam penyusunan skripsi ini.
8. Pihak-pihak lain yang turut membantu dalam penyelesaian skripsi ini Ibu Wahyu staf Laboratorium Patologi Anatomi FKG Universitas Jember, Mbak Dinik dan Mbak Fitri staf Laboratorium Biomedik Fakultas Farmasi Universitas Jember, Ibu Sumaryati staf Laboratorium Histologi dan Biologi Sel Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.
9. Semua pihak yang turut terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini.

Pada kesempatan ini, penulis juga ingin menyampaikan bahwa penyusunan skripsi ini masih banyak kekurangan. Oleh karena itu, kritik serta saran yang bersifat membangun diharapkan demi kesempurnaan skripsi ini.

Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca semua.

Jember, 9 Mei 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	ii
HALAMAN MOTTO.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN.....	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.	
2.1 Sendi Temporomandibula.....	5
2.2 Kartilago Sendi Temporomandibula.....	6
2.3 Kolagen.....	9
2.4 Pewarnaan <i>Trichrome Mallory</i>.....	10
2.5 Osteoarthritis Sendi Temporomandibula.....	11
2.5.1 Pengertian.....	11
2.5.2 Etiologi.....	11

2.5.3 Patogenesis.....	12
2.5.4 Induksi Osteoarthritis Pada Hewan Coba.....	14
2.6 Ikan Lemuru.....	15
2.6.1 Minyak Ikan Lemuru.....	15
2.6.2 Metabolisme Asam Lemak.....	17
2.6.3 Peranan ω -3 PUFA Minyak Ikan Sebagai Antiinflamasi.....	17
2.7 Kerangka Konseptual.....	20
2.8 Hipotesis.....	21
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Jenis Penelitian.....	22
3.2 Rancangan Penelitian.....	22
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian.....	22
3.3.1 Tempat Penelitian.....	23
3.3.2 Waktu Penelitian.....	22
3.4 Sampel Penelitian.....	22
3.4.1 Subyek Penelitian.....	22
3.4.2 Kriteria Sampel Penelitian.....	23
3.4.3 Jumlah Sampel.....	23
3.4.4 Pengelompokan Sampel.....	23
3.5 Identifikasi Variabel Penelitian.....	24
3.6 Definisi Operasional.....	24
3.6.1 Osteoarthritis Sendi Temporomandibula.....	24
3.6.2 Minyak Ikan Lemuru (<i>Sardinella longiceps</i>).....	24
3.6.3 Densitas Serabut Kolagen.....	25
3.7 Alat dan Bahan Penelitian.....	25
3.8 Prosedur Penelitian.....	27
3.8.1 <i>Ethical Clearance</i>	27

3.8.2	Persiapan dan Pemeliharaan Hewan Coba.....	28
3.8.3	Ekstraksi Minyak Ikan Lemuru (<i>Sardinella longiceps</i>).....	28
3.8.4	Pengelompokan Hewan Coba.....	29
3.8.5	Persiapan Bahan Perlakuan.....	30
3.8.6	Prosedur Perlakuan Hewan Coba.....	30
3.8.7	Pengukuran Densitas Serabut Kolagen.....	35
3.9	Analisis Data	36
4.0	Alur Penelitian	37
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1	Hasil Pengamatan	38
4.1.2	Data Hasil Pengamatan.....	38
4.1.2	Data Hasil Penelitian.....	41
4.1.3	Analisa Data.....	42
4.2	Pembahasan	43
BAB 5.	KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1	Kesimpulan	49
5.2	Saran	49
	DAFTAR PUSTAKA	50
	LAMPIRAN	55

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Perbandingan Kadar EPA dan DHA.....	16
2.2 Komposisi Asam Lemak Minyak Ikan Lemuru.....	16
4.1 Frekuensi skor densitas serabut kolagen kartilago sendi temporomandibula tikus <i>Sprague-Dawley</i> pada masing-masing kelompok.....	42
4.2 Hasil Uji non parametrik <i>Kruskal-Wallis</i>	43
4.3 Hasil Uji <i>Man-Whitney</i>	44

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Sendi temporomandibula.....	6
2.2 Lapisan kartilago artikular kondilus mandibula.....	8
2.3 Diagram perakitan molekul kolagen menjadi.....	9
2.4 Gambaran histologi pada jaringan penghubung dengan pewarnaan <i>Masson Trichrome</i>	10
2.5 Gambaran densitas serabut kolagen kartilago sendi temporomandibula tikus.....	10
2.6 Jalur konversi <i>alpha linolenic acid</i> (ALA).....	17
2.7 Struktur rantai panjang AA, EPA dan DHA.....	18
2.8 Mekanisme aksi antiinflamasi dari asam lemak omega tiga.....	19
2.9 Kerangka konseptual.....	20
3.1 Gambar skor densitas serabut kolagen.....	36
3.2 Bagan alur penelitian.....	37
4.1 Pembengkakan daerah wajah sebelah kanan tikus yang diinduksi osteoarthritis.....	38
4.2 Gambaran radiologis sendi temporomandibula.....	39
4.3 Gambaran histopatologi sendi temporomandibula tikus <i>Sprague-Dawley</i> dengan pewarnaan <i>Trichrome Mallory</i>	40
4.4 Gambaran histopatologi sendi temporomandibula tikus <i>Sprague-Dawley</i> dengan pewarnaan <i>Trichrome Mallory</i>	41

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Surat <i>ethical clearance</i>	55
B. Surat Keterangan Ekstraksi Minyak Ikan.....	56
C. Surat Ijin Laboratorium Biomedik.....	57
D. Surat Ijin Laboratorium Radiologi.....	58
E. Surat Ijin Laboratorium Biomedik.....	59
F. Pengukuran Densitas Serabut Kolagen.....	60
G. Data Kasar Hasil Pengamatan Densitas Serabut Kolagen.....	61
H. Analisis Statistik	
H.1 Hasil Uji <i>Kruskal Wallis</i>	65
H.2 Hasil Uji <i>Mann-Whitney</i>	68
I. Prosedur Penelitian.....	74
J. Alat dan Bahan Penelitian.....	78
K. Dokumentasi Hasil Penelitian.....	82

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sendi temporomandibula merupakan sistem persendian yang paling kompleks dan sangat aktif pada tubuh manusia. Sendi tersebut memiliki kemampuan untuk bergerak ke arah depan, belakang, samping, membuka serta menutup (Kuroda dkk, 2009). Untuk menunjang fungsi pergerakan serta pembebanan yang diberikan kepada sendi temporomandibula, kedua permukaan artikular sendi dilapisi oleh jaringan fibrokartilago yang padat (Herb dkk, 2006). Jaringan fibrokartilago tersebut berperan sebagai peredam benturan dan memudahkan pergerakan tulang (Tanaka dan Van, 2003 dalam Kuroda dkk, 2009; Mescher, 2011).

Dalam rangka menunjang peranan kartilago sendi sebagai peredam benturan, jaringan fibrokartilago yang melapisi kedua permukaan artikulasi sendi temporomandibula memiliki komponen utama berupa serabut kolagen yang memberikan sifat elastis (Singh, 2008 dalam Kuroda dkk, 2009). Berkurangnya densitas serabut kolagen pada kartilago sendi tersebut dapat meningkatkan resiko terjadinya gesekan antar permukaan artikulasi yang dapat meningkatkan progresivitas penyakit inflamasi sendi (Bhosale dan Richardson, 2008).

Osteoarthritis merupakan salah satu penyakit sendi temporomandibula yang bersifat kronik, memiliki progresivitas lambat, serta ditandai dengan menipisnya kartilago sendi (Tanaka, 2008 dalam Kuroda dkk, 2009). Osteoarthritis sendi temporomandibula lebih sering terjadi pada wanita dibandingkan laki-laki, dan prevalensi meningkat seiring dengan bertambahnya usia (Johansson, 2003). Etiologi osteoarthritis sendi temporomandibula belum diketahui secara pasti, dan bersifat multifaktorial. Penuaan, beban yang berlebihan, trauma serta infeksi diduga sebagai faktor penyebab terjadinya osteoarthritis (Jayasurya dan Chen, 2013). Proses penuaan dapat menyebabkan menurunnya kemampuan kondrosit dalam mempertahankan dan memperbaiki matrik kartilago (Buckwalter dkk, 2005). Faktor biomekanik seperti

disfungsi oklusal, mastikasi, pola mengunyah unilateral, dan bruksisme juga menjadi penyebab osteoarthritis sendi temporomandibula (Manfredini dkk, 2011).

Induksi osteoarthritis sendi temporomandibula dapat dilakukan secara *in vivo* pada hewan coba dengan menginjeksikan *complete freund's adjuvant* (CFA). CFA telah digunakan sebagai penginduksi osteoarthritis pada hewan coba. Berdasarkan penelitian saat ini, injeksi CFA terbukti dapat menimbulkan tanda-tanda osteoarthritis berupa penurunan ketebalan zona matur dan hipertrofi kartilago kondilus mandibula, serta terjadi peningkatan infiltrasi sel makrofag pada jaringan intrakapsular sendi temporomandibula (Harper dkk, 2001). Pada penelitian Robin (2006) injeksi CFA sebesar 0,08 ml secara intraartikular sendi temporomandibula dapat menyebabkan terjadinya pembengkakan area sendi temporomandibula dalam kurun waktu 24 jam pasca injeksi. Dalam penelitian tersebut juga dibuktikan bahwa injeksi CFA secara intraartikular sendi temporomandibula tikus, dapat menurunkan densitas serabut kolagen kartilago yang berfungsi sebagai bantalan sendi (Robin, 2006).

Ikan Lemuru (*S. longiceps*) merupakan potensi bahari lokal terbesar Indonesia yang tersebar di pantai selatan Jawa Timur, Pulau Bali dan Lombok (Mahrus dkk, 2012). Minyak ikan Lemuru (*S. longiceps*) mengandung *eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *docosahexaenoic acid* (DHA) tertinggi dibandingkan dengan jenis minyak ikan lainnya yang sering dikapsulkan. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Suseno dkk. (2014) kadar EPA minyak ikan Lemuru terbukti paling tinggi dibandingkan dengan minyak Ikan Tuna, hati Ikan Hiu, *Herring*, *Mackerel*, *Menhaden*, dan Salmon yang sering dikapsulkan.

Minyak ikan merupakan nutrien yang paling banyak mengandung asam lemak tidak jenuh omega 3 seperti *eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *docosahexaenoic acid* (DHA) yang dapat menekan produksi mediator-mediator proinflamasi (Cleland, 2003). Minyak ikan memiliki manfaat yang besar bagi kesehatan, antara lain sebagai antiinflamasi, penghambat arthritis, antitrombosis, antiaterosklerosis, meningkatkan fungsi endotel, menurunkan tekanan darah, dan konstansi trigliserida (Calder, 2012).

Eicosapentaenoic acid (EPA) dan *docosahexaenoic acid* (DHA) yang banyak terkandung dalam minyak ikan berpotensi sebagai antiinflamasi. Mekanisme aksi minyak ikan sebagai antiinflamasi tersebut berkaitan dengan kemampuan EPA dan DHA dalam menurunkan produk eikosanoid poten berupa prostaglandin E₂ (PGE₂) dan leukotrin B₄ (LTB₄) sehingga produksi sitokin proinflamator terhambat (Calder, 2012; Cleland dkk, 2003). EPA dan DHA minyak ikan juga berpotensi menghambat sintesis Interleukin I-β (IL-1β) dan *Tumor Necrotizing Factor-α* (TNF-α) yang menjadi mediator utama pada proses insiasi dan perkembangan osteoarthritis sendi temporomandibula (Calder 2012; Ogura dan Kondoh, 2015). Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Joe dan Lokesh (1997) bahwa tikus yang diberikan minyak ikan sebanyak 1 ml/hari setelah disuntik ajuvan memiliki skor arthritis yang lebih rendah dibandingkan dengan tikus yang diberi minyak tumbuhan dan kurkuminoid. EPA dan DHA mampu menurunkan sitokin proinflamasi yang dapat memicu diferensiasi osteoklas. Hal ini dibuktikan oleh penelitian yang telah dilakukan Indahyani dkk (2003) tentang pengaruh diet minyak jagung dan minyak ikan terhadap ekspresi osteoklas tulang periapikal gigi tikus, pemberian minyak ikan 1 ml selama 14 hari dapat menurunkan ekspresi osteoklas secara signifikan. Pada penelitian tersebut, aktivitas dan jumlah osteoklas pada hari ke-14 lebih rendah dibandingkan dengan hari ke-7, hal ini mengindikasikan bahwa EPA dan DHA pada hari ke-14 telah banyak mengganti struktur AA dalam jaringan dari pada hari ke-7 (Indahyani dkk, 2003). Penelitian yang telah dilakukan Indahyani (2008) membuktikan bahwa diet minyak ikan 1 ml/hari terbukti dapat menurunkan mediator resorpsi tulang yaitu prostaglandin maupun sitokin proinflamator seperti IL1-β, dan TNF-α.

Sampai saat ini belum terdapat penelitian yang mengkaji tentang pengaruh pemberian minyak ikan Lemuru (*S. longiceps*) terhadap densitas serabut kolagen kartilago sendi temporomandibula maupun penyakit inflamasi sendi. Berdasarkan uraian diatas, penulis tertarik untuk meneliti pengaruh pemberian minyak Ikan Lemuru (*S. longiceps*) terhadap densitas serabut kolagen kartilago sendi temporomandibula tikus yang mengalami osteoarthritis.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, permasalahan yang timbul adalah Bagaimanakah pengaruh pemberian minyak ikan Lemuru (*S. longiceps*) selama 7, 14, dan 21 hari terhadap densitas serabut kolagen kartilago sendi temporomandibula tikus yang mengalami osteoarthritis ?

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

1. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian minyak ikan Lemuru (*S. longiceps*) selama 7, 14, dan 21 hari terhadap densitas serabut kolagen kartilago sendi temporomandibula tikus yang mengalami osteoarthritis.

2. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dalam penelitian ini adalah diperoleh kajian tentang pengaruh pemberian minyak ikan Lemuru (*S. longiceps*) terhadap densitas serabut kolagen kartilago sendi temporomandibula tikus yang mengalami osteoarthritis sehingga diharapkan dapat memberikan sumbangan ilmu khususnya di bidang kedokteran gigi.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

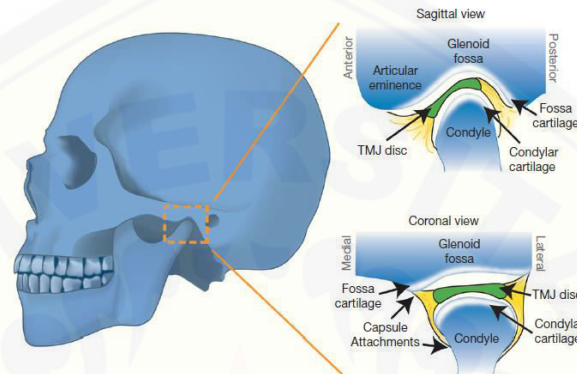
2.1 Sendi Temporomandibula

Sendi temporomandibula merupakan hubungan artikulasi permukaan artikular tulang temporal dan kondilus mandibula. Sendi temporomandibula merupakan sendi yang paling aktif dan kompleks pada tubuh manusia yang memegang peranan penting dalam fungsi bicara, pengunyahan, dan menelan (Ogura & Kondoh, 2015).

Komponen struktural sendi temporomandibula terdiri dari skuamosa tulang temporal, diskus artikularis, kondilus mandibula, ligamen dan cairan sinovial sendi yang terbungkus dalam kapsula sendi (Norton, 2012). Permukaan artikular tulang temporal dibagian anterior dibatasi oleh eminensia artikularis yang cembung. Diantara struktur tulang tersebut terdapat diskus artikularis yang melekat erat pada kutub lateral dan medial *processus condylaris*, sedangkan bagian posterior dari perlekatan tersebut bersifat elastis untuk memungkinkan pergeseran kedepan bersama dengan *processus condylaris*. Pada bagian anterior, diskus artikularis bersambung dengan *fascia pterygoideus lateralis* dan kapsula sendi. Bagian lateral kapsula sendi diperkuat oleh *ligamentum temporomandibularis lateralis*, yang berfungsi untuk membatasi gerak satuan *discus articularis-processus condylaris*. Rongga sendi bagian superior dan inferior yang dipisahkan oleh diskus artikularis dilapisi oleh jaringan sinovial yang menghasilkan cairan yang dibutuhkan untuk melumasi permukaan sendi. Otot-otot mastikasi seperti otot masseter, temporalis, pterygoideus medial dan lateral berperan dalam proses pengunyahan, serta berbicara (Glick, 2008).

Kondilus mandibula merupakan tonjolan tulang yang berbentuk menyerupai bola dan berartikulasi dengan diskus artikularis. Permukaan artikular kondilus mandibula terbungkus oleh jaringan ikat fibrus avaskular dari fibrokartilago (Norton, 2012). Permukaan artikulasi tulang temporal sendi temporomandibula juga ditutupi oleh lapisan padat fibrokartilago seperti pada permukaan kondilus. Di antara kondilus dan fossa glenoidalis terdapat diskus fibrokartilago yang melekat pada pinggiran

sendi dan bergerak bebas terhadap permukaan artikulasi bagian superior maupun inferior. Diskus artikular tersebut berfungsi untuk meningkatkan keharmonisan antara dua permukaan artikulasi, mendistribusikan beban, dan membantu proses lubrikasi sendi (Willard dkk, 2011).



Gambar 2.1 Sendi temporomandibula (Willard dkk, 2011)

Jaringan ikat merupakan jalan peredaran darah dan syaraf pada sendi temporomandibula. Pasokan pembuluh darah sendi temporomandibula didapatkan dari pembuluh darah arteri maupun vena. Arteri karotis eksterna berawal dari kelenjar parotis kemudian bercabang menjadi arteri maksila serta arteri superfisial temporalis. Sedangkan pembuluh darah vena yang berperan adalah vena superfisial temporalis, dan vena maksilaris. Suplai saraf sensoris ke sendi temporomandibula didapat dari *nervus auriculotemporalis* dan *nervus masseter* cabang dari *nervus Mandibularis* (Norton, 2012).

2.2 Kartilago Sendi Temporomandibula

Kartilago adalah jaringan ikat padat yang melapisi permukaan artikular persendian dan berfungsi sebagai bantalan sendi. Kartilago mempunyai beberapa fungsi antara lain: sebagai penutup permukaan sendi, mengurangi gesekan antar tulang pada sendi sehingga mencegah kerusakan, sedangkan permukaannya yang

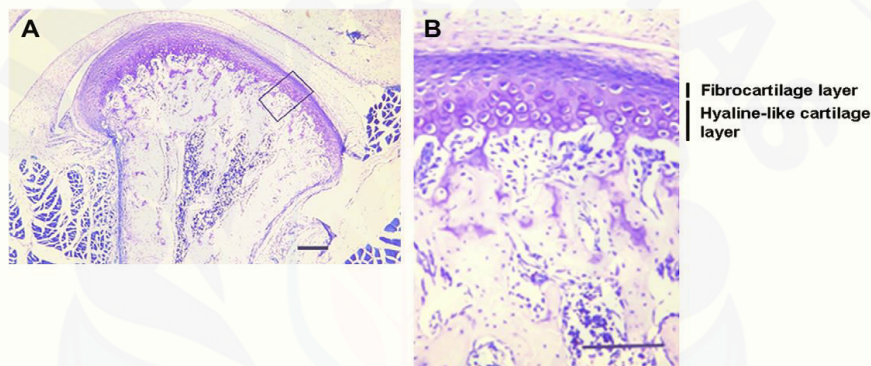
licin dan lentur berperan sebagai peredam benturan dan memudahkan pergerakan tulang (Mescher, 2011).

Kartilago terdiri atas sel-sel yang disebut kondrosit dan matrik ekstraseluler (ECM) berupa serabut kolagen dan substansi dasar. Kondrosit berperan penting dalam menyintesis dan menyekresi ECM, dan sel-selnya berada di dalam rongga-rongga matrik yang disebut lakuna. Kolagen, asam hialuronat, proteoglikan, dan sejumlah kecil glikoprotein adalah makromolekul utama yang terdapat di semua jenis matrik kartilago. Karena kolagen dan elastin bersifat fleksibel, konsistensi kartilago yang mirip gel bergantung pada ikatan elektrostatis antara serat kolagen dengan rantai samping glikosaminoglikan. Konsistensi kartilago juga bergantung pada keterikatan air (*solvation water*) pada rantai glikosaminoglikan yang bermuatan negatif, yang terjulur dari inti protein proteoglikan (Mescher, 2011).

Terdapat tiga bentuk kartilago yang telah berevolusi dengan komposisi matrik yang bervariasi. Ketiga jenis kartilago tersebut adalah kartilago hialin, elastis dan fibrokartilago. Dalam matrik kartilago hialin, kolagen tipe II merupakan tipe kolagen utama. Kartilago elastis yang lebih lentur dan dapat meregang, memiliki banyak serat elastin di dalam matriknya selain kolagen tipe II. Fibrokartilago banyak dijumpai pada bagian-bagian tubuh yang mengalami tarikan, ditandai dengan suatu matrik yang mengandung anyaman padat serabut kolagen tipe I. Ketiga kartilago tersebut tidak mempunyai pembuluh darah dan mendapat nutrisi melalui difusi dari kapiler jaringan ikat di dekatnya yakni melalui lapisan perikondrium atau melalui cairan sinovial rongga sendi (Jerosch, 2011; Mescher, 2011).

Keunikan kartilago sendi temporomandibula terletak pada struktur histologis fibrokartilago yang mirip kartilago hialin (Kuroda dkk, 2009; Willard dkk, 2011). Jaringan fibrokartilago adalah jaringan intermedia antara jaringan ikat padat dan kartilago hialin. Jaringan tersebut bersifat semi transparan, elastik dan fleksibel yang mengandung kondrosit, baik satu-satu atau dalam suatu agregat isogen, dan umumnya tersusun secara aksial dalam barisan panjang yang dipisahkan oleh serabut kolagen tipe I dan II. Bagian luar dari struktur histologis jaringan fibrokartilago dilapisi oleh

serabut membran yang tebal dan kuat yang disebut sebagai perikondrium (Willard dkk, 2011). Pada struktur histologis jaringan fibrokartilago menunjukkan daerah arsitektur yang terbagi menjadi empat daerah yakni : daerah fibrus, proliferasi, matang (*mature*), dan hipertrofi. Daerah fibrus merupakan daerah fibrokartilago yang duduk diatas daerah proliferasi yang kaya akan sel. Daerah proliferasi berperan penting sebagai pusat produksi sel-sel untuk daerah lainnya. Daerah ini menghasilkan sel-sel untuk daerah fibrus di bagian superior serta penghasil sel prekursor kondrosit untuk daerah *mature* di bagian inferior (Willard dkk, 2011).



Gambar 2.2 Lapisan kartilago artikular kondilus mandibula. 100 μm (A) dan 200 μm (B). Pewarnaan *Toluidine Blue* (Kuroda dkk, 2009).

Komponen kolagen terdistribusi secara merata disepanjang fibrokartilago. Jumlah kolagen mencapai 60% dari berat kering kartilago. Beberapa protein non kolagen membantu mengikat kondrosit kepada makromolekul dalam matrik kartilago. Kolagen tipe II menjadi komponen utama dalam kartilago yakni sebesar 90%-95%. Kolagen tipe II merupakan kolagen utama pada daerah *mature* dan hipertrofi. Kolagen tipe I lebih banyak ditemukan pada daerah fibrus dan proliferasi. Pada daerah proliferasi kaya akan sel namun di daerah ini sedikit didapatkan serabut kolagen (Willard dkk, 2011).

2.3 Kolagen

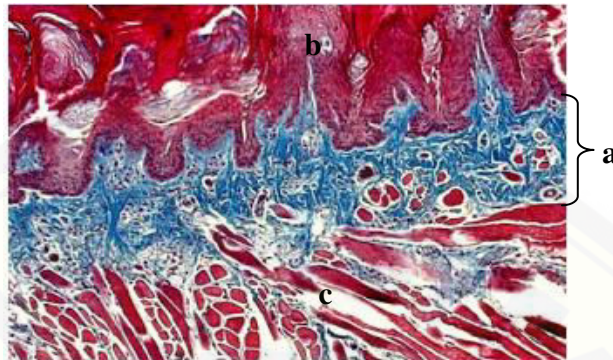
Kolagen merupakan suatu famili protein yang mengalami seleksi selama evolusi dan berfungsi untuk memperkuat dan mendukung jaringan ekstraselular. Kolagen merupakan protein terbanyak dalam tubuh manusia, yaitu sebanyak 30% dari berat keringnya (Mescher, 2011). Molekul kolagen dapat melalui proses perakitan sehingga dapat menjadi serabut kolagen. Serabut kolagen adalah struktur tipis panjang serta bergurat melintang dengan diameter yang berkisar dari 20 sampai 90 nm dan panjangnya dapat mencapai beberapa mikrometer. Pada kolagen tipe I, II, dan III molekul kolagen beragregasi membentuk serabut. Kolagen tipe II banyak dijumpai pada kartilago sendi berupa serabut, namun tidak membentuk serat ataupun berkas (Mescher, 2011).



Gambar 2.3 Diagram perakitan molekul kolagen menjadi serat kolagen (Mescher, 2011).

Pada diagram diatas memperlihatkan sekumpulan molekul kolagen, serabut, serat, serta berkas. Terdapat susunan yang tumpang tindih mirip tangga dari molekul kolagen. Masing-masing kolagen berukuran 300 nm (1). Susunan demikian berakibat terlihatnya ruang-ruang yang bergantian dan daerah tumpang-tindih (2), yang menimbulkan guratan-guratan melintang yang khas untuk serabut kolagen dan memberinya periodisitas pita gelap dan terang selebar 67 nm, bila diamati dengan mikroskop elektron (3). Serabut bergabung dan berikatan silang membentuk serat (4), yang ada pada kolagen tipe I, bergabung membentuk berkas (5) yang umumnya disebut serat kolagen bila dilihat dengan mikroskop cahaya (Mescher, 2011). Pada

pewarnaan *Mallory trichrome*, serabut kolagen terpulaskan biru ungu dan oleh pewarna *Masson's trichrome* terpulaskan biru/hijau (Gambar 2.3) (Leeson dkk, 1996).



Gambar 2.4 Gambaran histologi pada jaringan penghubung dengan pewarnaan *Masson's trichrome* terlihat matrik kolagen terpulaskan biru (a), sedangkan epitel (b) dan otot (c) terpulaskan merah (Perbesaran 100x)



Gambar 2.5 Gambaran densitas serabut kolagen kartilago sendi temporomandibula tikus (Robin, 2006)

2.4 Pewarnaan *Trichrome Mallory*

Pewarnaan *trichrome* merupakan salah satu pewarnaan khusus yang banyak digunakan pada laboratorium hisopatologi. Metode *mallory trichrome* ini menggunakan tiga pewarna yang berbeda yaitu *carbol fuchsin* untuk mewarnai nuklear, *orange G* untuk sitoplasma, dan *aniline blue* untuk pewarnaan kolagen. Asam fosfomolibdrik memegang peranan utama yang bertindak sebagai pengikat antara struktur jaringan (fibril kolagen dan membran sel) dan *aniline blue* (pewarna amfoterik). *Orange G* merupakan komponen kedua pada larutan polikrom *Mallory*

yang tidak memiliki afinitas pada asam fosfomolibdrik sehingga digunakan untuk mewarnai seluruh sisa struktur yang tidak diikat oleh asam fosfomolibdrik (Bio-Optica chemical co.).

Pewarnaan dengan *trichrome mallory* salah satunya digunakan untuk jaringan fibrokartilago. Secara histologis, matriks kartilago tampak berwarna biru (basofilik) dan terlihat pula kondrosit yang berbentuk bulat yang masuk di dalam lakuna. Lakuna pada matriks berwarna putih dan sitoplasma sel terwarnai lebih gelap.

2.5 Osteoarthritis Sendi Temporomandibula

2.5.1 Pengertian

Osteoarthritis adalah gangguan sendi yang bersifat kronik, berjalan progresif lambat, ditandai oleh kerusakan dan abrasi kartilago sendi yang menyebabkan terjadinya gesekan antar tulang sehingga dapat menimbulkan rasa nyeri dan pembengkakan (Felson, 2009 dalam Jerosch, 2011; Kuroda dkk, 2009). Morfologi abnormal yang dapat ditemukan pada osteoarthritis sendi temporomandibula adalah erosi, sklerosis, *flattening*, dan *chondro-osteophytes* pada permukaan artikular kondilus mandibula (Takano dkk, 2006). Gejala osteoarthritis yang sering ditemukan adalah timbulnya rasa sakit, pembengkakan, dan kekakuan sendi yang dihasilkan dari kerusakan kartilago sendi (Johnson dkk, 2015).

2.5.2 Etiologi

Etiologi osteoarthritis temporomandibula bersifat multifaktorial (Iliopoulos dkk, 2007). Penuaan, beban yang berlebihan, jejas kimia dan mekanik adalah penyebab terjadinya osteoarthritis (Jayasuriya dan Chen, 2013; Kuroda dkk, 2009). Faktor biomekanis seperti disfungsi oklusal dan mastikasi, kehilangan gigi, pola pengunyahan unilateral dan mikro trauma berupa bruksisme juga terlibat dalam permulaan perjalanan penyakit degenerasi sendi temporomandibula (Herb dkk, 2006; Jerolimov, 2009). Faktor penuaan berdampak pada penurunan kemampuan kondrosit

untuk memperbaiki matrik kartilago. Selain itu, cedera sendi juga berpotensi menimbulkan osteoarthritis (Buckwalter, 2005). Hal ini dibuktikan oleh penelitian yang telah dilakukan Embree dkk. (2014) pada tikus yang diberikan cedera berupa perforasi diskus sendi temporomandibula secara bedah menyebabkan terjadinya degenerasi kartilago kondilus mandibula dan osifikasi diskus.

2.5.3 Patogenesis

Osteoarthritis sendi temporomandibula ditandai dengan terjadinya kerusakan, dan abrasi kartilago artikular (Tanaka, 2008 dalam Kuroda dkk, 2009). Kondrosit berperan sebagai mekanisme mekanoresponsif kartilago dengan menstimulasi pelepasan enzim proteolitik dan kolagenase ketika beban berlebih mengenai sendi temporomandibula (Herb dkk, 2006). Hal inilah yang diduga dapat meningkatkan aktivitas metabolik dan aktivasi proses patologis yang mengakibatkan terjadinya kerusakan kartilago secara irreversibel (Kuroda dkk, 2009).

Proses inflamasi yang terjadi pada sendi temporomandibula oleh karena rangsangan tertentu mengakibatkan terjadinya kerusakan sel yang akan melepaskan fosfolipid. Asam arakidonat (AA) dilepaskan dari fosfolipid ini oleh enzim fosfolipase yang telah diaktifkan oleh rangsang mekanik, kimiawi, atau fisik. AA tersebut akan mengalami transformasi melalui dua jalur utama yaitu: siklooksigenase, yang menyintesis prostaglandin dan tromboksan, dan lipooksigenase yang menyintesis leukotrin (Ogura dan Kondoh, 2014).

a. Jalur siklooksigenase

Siklooksigenase (COX) berfungsi sebagai katalis pada tahap pertama proses biosintesis prostaglandin, tromboksan dan prostasiklin. Ada dua bentuk enzim siklooksigenase, yaitu: COX-1 adalah bentuk enzim utama yang ditemukan di banyak jaringan dan bertanggung jawab dalam menjaga fungsi normal tubuh termasuk keutuhan mukosa lambung dan pengaturan aliran darah ginjal. COX-2 tidak ditemukan di jaringan pada kondisi normal, tetapi diinduksi dalam respon

inflamasi (Kumar dkk, 2009). Pada jalur ini PGH_2 diubah menjadi prostaglandin E_2 (PGE_2), dan tromboksan A_2 (TXA_2). PGE_2 dapat memicu dilatasi pembuluh darah, meningkatkan permeabilitas kapiler dan merangsang reseptor nyeri. Selain itu, PGE_2 juga dapat menstimulasi terjadinya resorpsi tulang (Ogura dan Kondoh, 2015).

Tromboksan A_2 (TXA_2) berperan sebagai vasokonstriktor dan agregasi trombosit. Selain itu, TXA_2 juga dapat memicu aktivitas makrofag, *Fibroblast-like synoviocytes* (FLS) untuk menghasilkan Interleukin- 1β ($IL-1\beta$) dan *tumor necrotizing factor- α* ($TNF-\alpha$) yang berperan penting dalam proses inisiasi dan perkembangan kerusakan kartilago (Lee dkk, 2010 dalam Ogura dan Kondoh, 2015). $IL-1\beta$ dan $TNF\alpha$ tersebut dapat memicu terbentuknya matrik metalloproteinase (MMPs) dan kolagenase yang berperan dalam proses degradasi matrik kartilago (Pantsulaia, 2010; Cleland dkk, 2003). $IL-1\beta$ dan $TNF-\alpha$ juga menjadi regulator yang berpotensi memicu osteoklastogenesis (Kuroda dkk, 2009). Hal ini dibuktikan oleh penelitian yang telah dilakukan Kobayashi dkk. (2000) bahwa $TNF-\alpha$ dapat memicu diferensiasi osteoklas. Osteoklas dapat menghasilkan asam, kolagenase, dan enzim proteolitik lain yang menyerang matrik tulang dan membebaskan substansi dasar dan secara aktif terlibat dalam pembersihan debris yang terjadi selama resorpsi tulang (Indahyani dkk, 2010).

b. Jalur lipoksigenase

Lipoksigenase adalah enzim yang memetabolisme asam arahidonat (AA) di dalam neutrofil. Enzim lipoksigenase mengubah AA menjadi HPETE (*hydroxyperoxide-eicosatetra-enoic acid*). HPETE sangat tidak stabil dan direduksi oleh enzim peroksidase menjadi HETE (*hydroxy-eicosatetra-enoic acid*) atau diubah menjadi kelompok senyawa yang secara kolektif disebut leukotrin. Leukotrin dapat meningkatkan permeabilitas vaskuler dan adhesi sel darah putih ke kapiler selama cedera atau infeksi. Leukotrin yang dihasilkan HPETE adalah

Leukotrin B₄ (LTB₄) melalui hidrolisis enzimatis. LTB₄ merupakan agen kemotaksis poten dan menyebabkan agregasi neutrofil (Kumar dkk, 2007).

2.5.4 Induksi Osteoarthritis pada Hewan Coba

Penelitian yang berkaitan dengan osteoarthritis sendi temporomandibula dapat dilakukan secara *in vivo* pada hewan coba seperti tikus, mencit, kelinci dan hewan coba lainnya dengan memberikan bahan-bahan yang mampu menginduksi terjadinya osteoarthritis dalam waktu singkat. Salah satu ajuvan yang sering digunakan pada penelitian osteoarthritis adalah *complete freund's adjuvant* (CFA) karena bahan tersebut dapat menginduksi osteoarthritis hingga terjadi kerusakan sendi. Tiap mililiter CFA mengandung 1 mg *Mycobacterium tuberculosis* yang telah dilemahkan dalam *paraffin oil* (Harper dkk, 2001). Induksi dari CFA ini akan menyebabkan kerusakan pada membran lipid sehingga akan menekan aktivitas dari proteoglikan yang menyebabkan adanya peningkatan produksi sel polimorfonuklear (PMN), dan peningkatan sel PMN ini akan berdifusi secara bebas sehingga menyebabkan degradasi dan erosi pada jaringan tulang rawan (Vollenhoven, 1998 dalam Robin, 2006).

Dalam penelitian Robin (2006) tentang pengaruh pemberian kurkumin terhadap kepadatan serabut kolagen sendi temporomandibula tikus yang mengalami osteoarthritis, injeksi CFA sebesar 0,08 ml dalam salin 1:1 secara intraartikular pada sendi temporomandibula sebelah kanan menyebabkan terjadinya tanda-tanda inflamasi berupa kemerahan dan pembengkakan sendi temporomandibula tikus dalam waktu 24-48 jam setelah injeksi CFA. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Harper dkk. (2001) injeksi CFA secara intraartikular pada sendi temporomandibula tikus *Sprague-Dawley* jantan, dapat memicu terjadinya respon inflamasi hingga minggu ke-6 pasca injeksi. Pada pemeriksaan histopatologi, kelompok yang diinjeksi CFA terjadi kerusakan kartilago kondilus mandibula yang ditandai dengan terjadinya pengurangan ketebalan lapisan matur dan hipertrofi secara signifikan (Harper dkk, 2001).

2.6 Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*)

Ikan lemuru merupakan komoditas perairan Negara Indonesia. Ikan lemuru dikenal sebagai ikan pelagis kecil yang mengandung ω -3 PUFA dengan jumlah yang sangat tinggi. Ikan lemuru menyebar di Samudra Hindia bagian timur termasuk pantai selatan Jawa Timur, Bali dan Lombok (Mahrus dkk, 2012). Volume penangkapan ikan lemuru pada tahun 2007 di perairan Bali dan Banyuwangi sangatlah besar, yakni mencapai 55.959 ton. Dari jumlah produksi tersebut, sebanyak 40% digunakan untuk pengalengan, 50% untuk penepungan, dan 10% untuk lain-lain (Estiasih, 2010).

Taksonomi dari ikan lemuru (*S. longiceps*) adalah sebagai berikut (Catalog of Fishes, 2004).

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Filum	: <i>Chordata</i>
Subfilum	: <i>Vertebrata</i>
Kelas	: <i>Actinopterygii</i>
Ordo	: <i>Clupeiformes</i>
Subordo	: <i>Clupeidoi</i>
Family	: <i>Clupeidae</i>
Subfamily	: <i>Clupeinae</i>
Genus	: <i>Sardinella</i>
Spesies	: <i>Sardinella longiceps</i>

2.6.1 Minyak Ikan Lemuru

Minyak ikan lemuru merupakan lemak yang berbentuk cair yang berasal dari ikan lemuru (*Sardinella longiceps*). Minyak ikan lemuru mengandung 14,36% *eicosapentaenoic acid* (EPA) dan 4,60% *docosahexaenoic* (DHA) dari keseluruhan komponen minyak (Suseno dkk, 2014). Terdapat beberapa penelitian yang meneliti kadar EPA dan DHA dalam minyak ikan lemuru, seperti penelitian yang telah dilakukan Som dan Radhakrishnan (2013) tentang kandungan asam lemak *S. longiceps* dan *S. fimbriata*, kandungan EPA *S. longiceps* sebesar 22,98%, lebih tinggi

dibandingkan dengan *S. fimbriata* sebesar 14,43%. Sedangkan pada penelitian yang dilakukan Suseno dkk. (2014) kadar EPA minyak ikan lemuru terbukti paling tinggi dibandingkan dengan minyak Ikan Tuna, dan hati Ikan Hiu yang sering dikapsulkan.

Tabel 2.1 Perbandingan kadar EPA dan DHA antara minyak Ikan Lemuru dengan minyak ikan lainnya.

Sumber Minyak Ikan	Total Asam Lemak (%)	
	EPA	DHA
Minyak hati ikan hiu	0,05	0,28
Tuna	0,92	7,81
Lemuru	21,77	11,59
<i>Mackerel</i>	5,7	7
<i>Herring</i>	7,4	6,7
Salmon	12,7	10
Halibut	12,2	25,4
<i>Sand eel</i>	10,9	9,7
<i>Menhaden</i>	10,6	6,4
<i>Capelin</i>	9,9	7,9

Sumber : Suseno dkk, 2014

EPA dan DHA merupakan jenis omega-3 yang paling dominan pada minyak ikan. Kandungan EPA dan DHA dalam ikan disebabkan karena ikan tersebut mengkonsumsi alga yang mengandung kedua asam lemak tersebut. Oleh karena itu, tidak heran jika jenis ikan herbivora seperti ikan lemuru, ikan teri akan memiliki kandungan EPA dan DHA yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan karnivora seperti ikan hiu, ikan tuna, dan layaran (Maulana dkk, 2014).

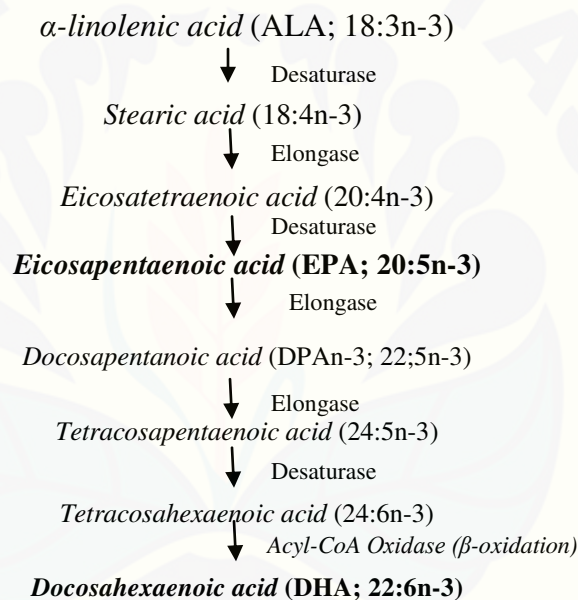
Tabel 2.2 Komposisi Asam Lemak Minyak Ikan Lemuru (*S. longiceps*)

Jenis Asam Lemak	Komposisi (%)
Σ Saturated Fatty Acid (SFA)	28,90
Σ Mono Unsaturated Fatty Acid (MUFA)	17,99
Σ Poly Unsaturated Fatty Acid (PUFA)	22,82
• <i>Linoleic acid, 18:2n6</i>	0,04
• <i>Linoleic acid, C18:3n6c</i>	0,79
• <i>Ö-linolenic acid, C18:3n6</i>	0,28
• <i>Linolenic acid, C18:3n3</i>	0,39
• <i>Cis-8, 11, 14-eicosatrienoic acid, C20:3n6</i>	0,23
• <i>Cis-11, 14, 17-eicosatrienoic acid, C20:3n3</i>	0,02
• EPA, C20:5n3	14,36
• DHA, C22:6n3	4,60
Total	67,71

Sumber : Suseno dkk, 2014

2.6.2 Metabolisme Asam Lemak

Manusia dan hewan kecuali hewan karnivora seperti singa dan kucing dapat melakukan metabolisme asam lemak. Asam lemak tidak jenuh omega-3 *polyunsaturated fatty acid* (ω -3 PUFA) melalui proses desaturasi dan elongasi diubah menjadi *eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *docosahexaenoic acid* (DHA). Konversi *Alpha-Linolenic Acid* (ALA, omega-3) pada manusia terjadi di hati lihat Gambar 2.7. Beberapa studi menunjukkan ~5% ALA dimetabolisme menjadi EPA dan <0,5% menjadi DHA pada individu yang sehat (Kim dan Ilich, 2011).

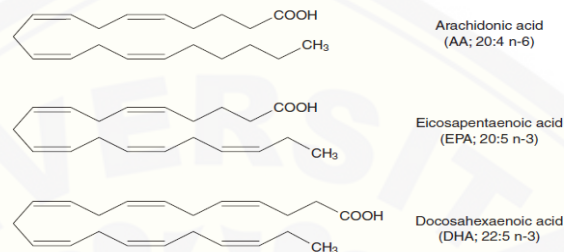


Gambar 2.6 Jalur konversi *Alpha Linolenic Acid* (ALA) (Calder, 2012)

2.6.3 Peranan ω -3 PUFA Minyak Ikan Sebagai Anti Inflamasi

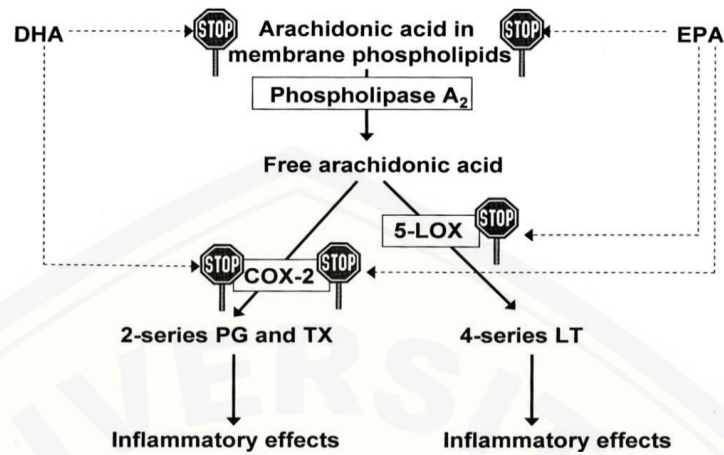
Asam lemak tidak jenuh omega-3 *polyunsaturated fatty acid* (ω -3 PUFA) memiliki efek anti-inflamasi oleh karena kemampuannya dalam memengaruhi metabolisme eikosanoid (Calder, 2012; Cleland dkk, 2003; Simopoulos, 2002). Kemampuan minyak ikan dalam memengaruhi metabolisme eikosanoid berkaitan dengan struktur rantai panjang *eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *docosahexaenoic acid* (DHA) ω -3 PUFA yang memiliki persamaan dengan struktur rantai panjang

asam arakhidonat (AA). Hal inilah yang menjadi faktor penyebab EPA dan DHA mampu menjadi substrat kompetitor AA untuk menyatu dengan membran fosfolipid dan secara langsung menghambat enzim siklooksigenase-2 (COX-2) dan lipoksigenase (5-LOX) (Borow dkk, 2015; Calder, 2012; Cleland dkk, 2003).



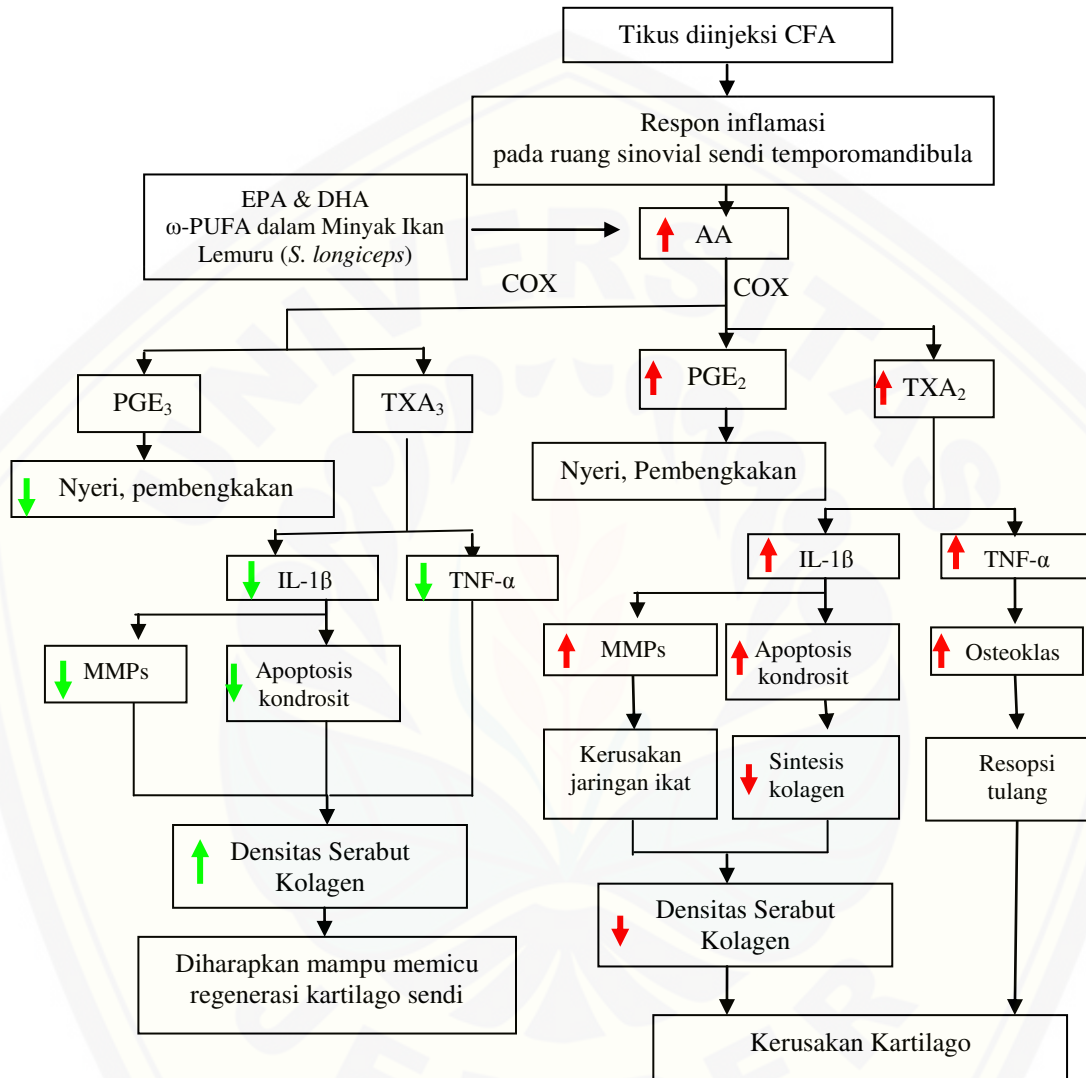
Gambar 2.7 Struktur rantai panjang AA, EPA dan DHA (Cleland dkk, 2003).

Eicosapentaenoic acid (EPA) dan *docosahexaenoic acid* (DHA) dapat bersaing secara langsung dengan sisa-sisa asam arakhidonat (AA) dalam proses oksigenase dengan enzim siklooksigenase dan lipoksigenase yang menyintesis produk eikosanoid. Produk eikosanoid dari EPA dan DHA mirip dengan produk eikosanoid dari AA, tetapi produk eikosanoid EPA dan DHA berupa Prostaglandin E₃ (PGE₃), Tromboksan A₃ (TXA₃), dan Leukotrin B₅ (LTB₅) bersifat anti inflamasi (Calder, 2012). Struktur yang berbeda memiliki pengaruh yang sangat besar pada aktivitas biologis eikosanoid dengan AA yang mempunyai sifat pro-inflamasi dan protrombosit, sedangkan derivat-derivat dari EPA dan DHA bersifat antiinflamasi dan antitrombosit (Borow dkk, 2015; Calder, 2012; Cleland dkk, 2015). Penghambatan jalur siklooksigenase mengakibatkan pembentukan PGH₂ serta TXA₂ juga terhambat. Maka dari itu tidak terjadi mekanisme aktivasi monosit untuk menghasilkan *tumor necrotizing factor α* (TNFα) dan Interleukin 1β (IL-1β) yang dapat menghambat sintesis kolagen. Terbentuknya PGE₃ juga dapat menurunkan regulasi sintesis IL-1β dan TNFα oleh monosit. Sedangkan produk eikosanoid dari EPA dan DHA berupa LTB₅ merupakan agen kemotaksis dan stimulator yang lemah dibandingkan LTB₄. Oleh karena itu, EPA dan DHA juga berpotensi menurunkan kemampuan kemotaksis (Cleland dkk, 2003; Calder, 2012).



Gambar 2.8 Mekanisme aksi antiinflamasi dari asam lemak omega tiga. EPA dan DHA menurunkan ketersediaan jumlah asam arakidonat sebagai substrat sintesis eikosanoid dan juga menghambat metabolisme asam arakidonat. COX, siklooksigenase; LOX, lipoxygenase; LT, leukotrine; PG, prostaglandin; TX, thromboxane (Calder, 2006).

2.7 Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 2.9 Kerangka konseptual

2.7 Hipotesis

Berdasarkan tinjauan pustaka di atas dapat diajukan hipotesis bahwa pemberian minyak ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) selama 7, 14 dan 21 hari berpengaruh terhadap densitas serabut kolagen kartilago sendi temporomandibula tikus yang mengalami osteoarthritis.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah *eksperimental laboratories* (Notoadmodjo, 2010).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *post test only control group design* (Notoadmodjo, 2010).

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

3.3.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Jember, Laboratorium Radiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Laboratorium Biomedik Fakultas Farmasi Universitas Jember dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan 1 November 2015 sampai Februari 2016.

3.4 Sampel Penelitian

3.4.1 Subyek penelitian

Subyek penelitian ini adalah hewan coba tikus jenis *Sprague-Dawley* yang sesuai kriteria sampel.

3.4.2 Kriteria sampel penelitian

Kriteria sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- 1) Kondisi fisik sehat dan tidak mengalami kelainan
- 2) Jenis kelamin jantan
- 3) Umur 3-4 bulan dan berat badan 300-330 gram

3.4.3 Jumlah sampel

Jumlah sampel dalam penelitian ini dihitung berdasarkan jumlah kelompok dalam penelitian. Berdasarkan rumus Federer (Maryanto dan Fatimah, 2004), jumlah sampel minimal adalah :

$$\text{Rumus Federer : } (n-1) (t-1) \geq 15$$

Keterangan :

n : jumlah sampel minimal tiap kelompok

t : jumlah kelompok

$$(n-1) (6-1) \geq 15$$

$$(n-1)5 \geq 15$$

$$n-1 \geq 3$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan rumus di atas, besar sampel minimum yang harus digunakan adalah 4 ekor per kelompok. Pada penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus yang terbagi secara acak dalam 2 kelompok. Setiap kelompok terbagi lagi menjadi 3 subkelompok yang masing-masing subkelompok terdiri dari 4 ekor tikus.

3.4.4 Pengelompokan sampel

Pada penelitian ini pengelompokan sampel penelitian menggunakan metode *simple random sampling*, yang mengartikan tiap anggota populasi memiliki peluang yang sama untuk masuk ke dalam kelompok penelitian (Nurhayati, 2008).

3.5 Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variabel bebas (Pengaruh)

Lama waktu pemberian minyak ikan Lemuru (*S. longiceps*)

2. Variabel terikat (Terpengaruh)

Densitas serabut kolagen kartilago sendi temporomandibula

3. Variabel Terkendali

a. Pakan tikus standar

b. Tempat dan cara pemeliharaan tikus

c. Berat badan tikus

d. Usia tikus

e. Ekstraksi minyak Ikan Lemuru

f. Dosis minyak Ikan Lemuru

g. Dosis *Complete Freund's Adjuvant (CFA)*

h. Prosedur pembuatan preparat histologis

i. Metode pewarnaan dengan menggunakan *Mallory Trichrome*

3.6 Definisi Operasional

3.6.1 Osteoarthritis sendi temporomandibula

Osteoarthritis sendi temporomandibula bersifat kronik serta progresif, yang ditandai dengan adanya resorpsi serta penipisan lapisan kartilago sendi temporomandibula pada pemeriksaan radiologis. Dalam penelitian ini induksi osteoarthritis sendi temporomandibula dilakukan dengan cara menginjeksikan *Complete Freund's Adjuvant (CFA)* (*Sigma chemical co*) secara intraartikular pada sendi temporomandibula tikus sebelah kanan.

3.6.2 Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*)

Minyak ikan yang digunakan dalam penelitian ini adalah minyak ikan hasil ekstraksi bagian daging dan kepala ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*). Ekstraksi

minyak ikan dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Jember.

3.6.3 Densitas serabut kolagen

Densitas serabut kolagen adalah kepadatan serabut kolagen yang mengisi luasan kartilago sendi temporomandibula. Serabut kolagen berwarna biru/ungu pada pewarnaan *Trichome Mallory* yang diamati di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 400x. Pengukuran densitas serabut kolagen menggunakan perangkat lunak Optilab^R *ImageRaster V2.1*, kemudian hasil pengukuran tersebut disesuaikan dengan indeks skor densitas serabut kolagen.

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat penelitian

- a. Alat untuk perlakuan hewan coba
 - 1) Kandang yang disekat-sekat, terbuat dari plastik (*Lion Star, Indonesia*)
 - 2) Tempat makan dan minum tikus
 - 3) Timbangan (*neraca Ohaus, Germany*)
 - 4) Sarung tangan (*Senstouch, Indonesia*) dan masker (*J-Spin, Indonesia*)
 - 5) Sonde lambung untuk pemberian minyak Ikan Lemuru
 - 6) Gelas ukur (*One lab, Indonesia*)
 - 7) *Tuberculin Sput* 1ml (*Onemed, Indonesia*)
 - 8) Vibrator (*Benchmark, Jerman*)
- b. Alat untuk dekaputasi dan pengambilan sendi temporomandibula tikus
 - 1) Gunting bedah (*Dentica*)
 - 2) Gunting (*SDI, Indonesia*)
 - 3) Skalpel (*Meiden Stainless, Japan*)
 - 9) Mata pisau skalpel (*Meiden Stainless, Japan*)
 - 10) Masker (*J-Spin, Indonesia*)

- 11) Papan parafin
 - 12) Sarung tangan (*Senstouch, Indonesia*)
 - 13) Pot obat
 - 14) Pinset anatomi
- c. Alat untuk ekstraksi minyak ikan
1. Bak plastik
 2. Sentrifus (*EBA, Germany*)
 3. Tabung sentrifus (*Pyrex, Japan*)
 4. *Mixer*
 5. Termometer 100⁰ C
 6. Mikropipet
 7. Kompor
 8. Panci kecil
- d. Alat untuk pembuatan dan pewarnaan preparat
1. Rak slide
 2. Gelas ukur
 3. Kertas saring
 4. *Water tap*
 5. *Slide Warmer*
 6. Pinset
 7. Stopwatch (*Diamond, Cina*)
 8. Mikrotom (*Leica RM 2135*)
 9. *Block holder* mikrotom
 10. *Waterbath* (*Memmert, Jepang*)
 11. *Slide warmer* (*Sakura, Jepang*)
 12. Oven (*Memmert, Jepang*)
 13. *Staining rak*
 14. *Staining jar*
 15. Kuas kecil

16. Mikroskop binokuler (*Leica, USA*)
17. Gelas Objek (*Thermo Scientific*)
18. Gelas penutup
19. Spirtus
20. Sarung tangan (*Latex*)
21. Masker

3.7.2 Bahan penelitian

- a. Buffer formalin 10%
- b. Asam fomiati 10%
- c. Kloroform
- d. Ketamin 50 mg/100ml
- e. Parafin
- f. Xylol
- g. Alkohol 70%, 80%, 95%, 97%, dan 100%
- h. Larutan mallory 1 berisi *acid fuchsin*
- i. Larutan mallory 2 berisi *phosphomolybdic acid*
- j. Larutan mallory 3 berisi *aniline blue, orange G, oxalic acid*
- k. Aquades
- l. Entelan

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 *Ethical Clearance*

Sebelum dilakukan penelitian, hewan coba dan prosedur penelitian akan dilakukan pengurusan *ethical clearance* di Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gajah Mada.

3.8.2 Persiapan dan pemeliharaan hewan coba

- 1) Memilih tikus *Sprague-Dawley* jantan secara acak.
- 2) Melakukan penimbangan berat badan tikus dengan neraca *Ohaus* (berat badan tikus 300-330 gram).
- 3) Menyiapkan kandang tikus dengan ukuran 30 cm x 30 cm sebanyak 6 buah. Kemudian mengadaptasikan tikus-tikus tersebut di dalam kandang dengan jumlah 4 ekor di setiap kandang selama 7 hari dan diletakkan di ruang perawatan hewan.
- 4) Kandang percobaan dibersihkan setiap hari untuk mencegah infeksi yang dapat terjadi akibat kotoran tikus agar tikus tetap sehat. Kandang ditempatkan dalam suhu kamar dan cahaya menggunakan sinar matahari tidak langsung. Makanan hewan percobaan diberikan berupa pakan standar. Makanan dan minuman diberikan secukupnya dalam wadah terpisah dan digantikan setiap hari.

3.8.3 Ekstraksi minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*)

- a. Ikan Lemuru dicuci dengan air mengalir sampai bersih, membuang seluruh isi perut.
- b. Ikan Lemuru yang sudah bersih dipotong menjadi dua bagian.
- c. Ikan Lemuru direbus dengan 10 L aquades sehingga ikan lemuru tenggelam dalam aquades dengan suhu 80-90°C sambil diaduk. Proses merebus dihentikan ketika telah didapatkan minyak ikan di bagian permukaan.
- d. Ikan Lemuru yang telah direbus, diangkat dan diperas dengan kain saring untuk mendapatkan minyak ikan.
- e. Kemudian mencampur hasil saringan minyak ikan dengan NaCl 5% (3:1) dalam corong pisah.
- f. Hasil saringan minyak ikan yang telah diberikan NaCl 5% dalam corong pisah dituang ke dalam tabung sentrifus untuk mendapatkan minyak ikan

murni yang telah terpisah dari molekul lemak dan air. Tabung disentrifus dengan kecepatan 8.000 rpm selama 3 menit.

- g. Setelah disentrifus, didapatkan tiga bagian pada tabung sentrifus, yakni minyak ikan pada bagian atas, molekul lemak pada bagian tengah serta molekul air pada bagian bawah. Kemudian memisahkan bagian minyak ikan dari molekul lemak dan air ke dalam tabung reaksi.
- h. Penyimpanan hasil ekstraksi minyak ikan dalam botol kaca gelap pada suhu 2-4° C (Lubis dkk, 2000; Puspitaningrum, 2012).

3.8.4 Pengelompokan hewan coba

Hewan coba tikus galur *Sprague-Dawley* berjumlah 24 ekor dibagi menjadi dua kelompok, berikut pembagian kelompok :

- A. Kelompok I, merupakan kelompok kontrol (K) yang terdiri dari 12 ekor tikus yang dibagi menjadi tiga subkelompok. Pada kelompok ini dilakukan injeksi CFA pada sendi temporomandibula sebelah kanan secara intraartikular dan dilakukan pemberian salin steril sebanyak 1 ml secara sondase lambung 1 kali per hari. Kemudian subkelompok K7 dikorbankan pada hari ke-7, subkelompok K14 dikorbankan pada hari ke-14 dan subkelompok K21 dikorbankan pada hari ke-21.
- B. Kelompok II, merupakan kelompok perlakuan (P) yang terdiri dari 12 ekor tikus yang dibagi menjadi tiga subkelompok. Pada kelompok ini dilakukan injeksi CFA pada sendi temporomandibula sebelah kanan secara intraartikular dan dilakukan pemberian minyak ikan Lemuru sebanyak 1 ml secara sondase lambung 1 kali per hari. Kemudian subkelompok P7 dikorbankan pada hari ke-7, subkelompok P14 dikorbankan pada hari ke-14 dan subkelompok P21 dikorbankan pada hari ke-21.

3.8.5 Persiapan bahan perlakuan

A. *Complete Freund's Adjuvant* (CFA)

Dosis CFA yang digunakan untuk penginjeksian secara intraartikular sendi temporomandibula sebesar 0,08 ml yang diencerkan dalam larutan salin steril dengan perbandingan 1:1 (Sigma-Aldrich co.).

B. Ketamin

Dosis anestesi ketamin untuk tikus yaitu 40 mg/KgBB dan berat badan tikus diasumsikan sebesar 300 gram. Maka dosis yang digunakan adalah 40 mg/KgBB x 0,3 Kg = 12 mg (Kusumawati, 2004).

Ketamin yang digunakan adalah ketamin 1000 *anesject* yang mempunyai konsentrasi 50 mg/ml.

$$\frac{12 \text{ mg}}{X \text{ ml}} = 50 \text{ mg}$$

$$X = \frac{12 \text{ mg}}{50}$$

$$= 0,24 \text{ ml}$$

Sehingga volume ketamin yang diberikan ke tikus dengan berat badan 300 gram sebesar 0,24 ml.

C. Dosis minyak Ikan Lemuru

1 ml/300-330 gram berat badan tikus (Indahyani, 2001).

3.8.6 Prosedur perlakuan hewan coba

1) Pembiusan hewan coba

Hewan coba sebelum diberikan perlakuan, terlebih dahulu dilakukan pembiusan dengan menggunakan ketamin. Dosis yang diberikan adalah 40

mg/Kg berat badan yang disuntikan pada daerah kaki belakang di muskulus tricep/quadricep.

2) Penginduksian osteoarthritis

Osteoarthritis pada tikus diinduksi dengan menginjeksikan *Complete Freund's Adjuvat* (CFA) secara intraartikular sebesar 0,08 ml dalam salin dengan perbandingan 1:1 pada sendi temporomandibula tikus *Sprague-Dawley* sebelah kanan. Pada penelitian ini seluruh tikus pada kelompok kontrol (K) maupun perlakuan (P) dilakukan injeksi CFA.

Kerusakan kartilago sendi temporomandibula tikus pada kelompok kontrol (K) maupun perlakuan (P) baru terjadi pada minggu ke-4 setelah penginjeksian CFA. Oleh karena itu, pemberian minyak ikan Lemuru pada kelompok perlakuan (P) dan pemberian salin pada kelompok kontrol (K) dilakukan 4 minggu setelah penginjeksian CFA secara intraartikular pada sendi temporomandibula.

3) Pengambilan jaringan

Hewan coba pada kelompok kontrol (K) maupun perlakuan (P) didekapitasi dengan cara inhalasi menggunakan kloroform dalam tabung. Kemudian dilakukan pengambilan kondilus mandibula, serta tulang temporal tikus sebelah kanan. Pada tahap selanjutnya dilakukan proses fiksasi. Jaringan yang telah diambil dimasukkan ke dalam larutan fiksasi *buffer* formalin 10% dengan durasi waktu minimal 24 jam, tujuannya adalah untuk mencegah terjadinya autolisis, mempertahankan morfologi sel seperti semula, dan mencegah terjadinya autolisis, mempertahankan morfologi sel seperti semula, mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri (Sudiana, 1993).

4) Dekalsifikasi Sampel Penelitian

Sampel yang telah difiksasi menggunakan *buffer* formalin 10% dilakukan dekalsifikasi dengan larutan asam formiat 10% pada suhu 4°C selama 10 hari yang sebelumnya telah dibilas dengan akuades. Proses dekalsifikasi dianggap selesai ketika jaringan berubah menjadi lunak yang

dapat dilihat dengan cara ditusuk menggunakan jarum sampai dapat menembus jaringan tanpa halangan dan mudah untuk dipotong. Rendaman larutan dekalsifikasi diganti setiap 4 hari sekali (Sudiana, 1993).

5) Pemrosesan jaringan

Setelah proses dekalsifikasi selesai, maka dilakukan pemrosesan jaringan yang bertujuan untuk mempersiapkan jaringan sebelum dilakukan penyayatan dengan menggunakan mikrotom. Tahapan pemrosesan jaringan adalah sebagai berikut:

1) Dehidrasi

Dehidrasi merupakan penarikan molekul air dari dalam jaringan dengan menggunakan konsentrasi rendah ke tinggi (bertingkat). Pengeluaran air atau dehidrasi dilakukan secara bertingkat agar tidak mengganggu struktur jaringan. Dengan cara ini, secara bertahap air dalam jaringan ditarik oleh larutan alkohol (Subowo, 2009). Tahapan dehidrasi antara lain:

- a) Alkohol 70% : 15 menit
- b) Alkohol 80% : 1 jam
- c) Alkohol 95% : 2 jam
- d) Alkohol 95% : 1 jam
- e) Alkohol absolut : 1 jam
- f) Alkohol absolut : 1 jam
- g) Alkohol absolut : 1 jam

2) Penjernihan (*Clearing*)

Clearing merupakan proses penjernihan jaringan menggunakan bahan *clearing*. Bahan *clearing* yang sering digunakan adalah xylol karena dapat bercampur dengan alkohol dan media pemendam. Proses *clearing* bertujuan untuk mempermudah proses *embedding* dengan membuang sisa-sisa alkohol dan mampu bercampur dengan media pemendam (Mescher, 2011; Subowo, 2009).

Tahapan *clearing* antara lain :

- a) Xylol : 1 jam
 - b) Xylol : 2 jam
 - c) Xylol : 2 jam
- 3) Impregnasi

Setelah *clearing* dilanjutkan dengan impregnasi, yaitu proses infiltrasi bahan *embedding* dalam jaringan pada suhu 56° - 60° C. Jaringan yang sudah lunak dicuci dengan larutan PBS dan dibungkus dengan *cassete* yang sudah diberi label untuk menghindari kekeliruan identitas sampel, kemudian dimasukkan ke dalam parafin dengan titik didih 56° - 60° C selama 2 jam yang diulang sebanyak 3 kali. Kemudian diteruskan dengan proses *embedding* yaitu penanaman jaringan ke dalam parafin dengan titik didih 56° - 60° C pada alat cetak blok parafin. Tahap pertama adalah alat cetak dipersiapkan dan diletakkan pada permukaan yang rata, parafin cair dituangkan ke dalam alat cetak blok dengan titik didih 56° - 60° C, kemudian masukkan jaringan yang telah diimpregnasi ke dalamnya, dan diberi label identitas sampel. Ditunggu beberapa menit sampai parafin membeku, selanjutnya parafin blok sudah siap untuk dipotong, setelah dilepas dari alat cetak blok dan diletakkan pada balok (Sudiana, 1993).

- 5) Penyayatan

Penyayatan blok parafin dilakukan menggunakan mikrotom. Sebelumnya pisau mikrotom dibersihkan dengan kasa/kertas saring yang telah dibasahi xylol dengan arah tegak lurus. Ketebalan potongan jaringan dengan mikrotom diatur $5\ \mu\text{m}$, dengan arah potongan secara sagital. Hasil sayatan diambil menggunakan kuas kecil lalu diletakkan secara hati-hati di atas permukaan air *waterbath* dengan temperatur tetap 56 - 58° C sampai sayatan tampak mekar. Kemudian sayatan diletakkan pada *slide* preparat yang telah dilapisi polilisin sehari sebelumnya agar dapat melekat erat. Preparat yang telah berisi jaringan diletakkan di atas *hot plate* dengan suhu

30-35°C minimal selama 12 jam. Setelah itu preparat siap untuk dilakukan pewarnaan (Sudiana, 1993; Subowo, 2009).

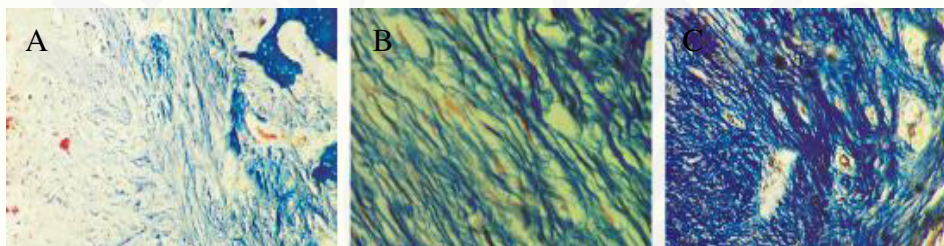
6) Prosedur pewarnaan *Mallory Trichrome* adalah sebagai berikut :

- a. Slide yang akan diwarnai terlebih dahulu dilakukan dideparafinisasi menggunakan xylol dan alkohol secara bertingkat (97%, 80% dan 70%).
- b. Slide dimasukkan ke dalam *staining jar* yang berisi larutan Mallory I dan tunggu selama 3 menit (waktu inkubasi tergantung besar kecilnya jaringan).
- c. Kemudian slide dicuci dengan aquades sebanyak 3 kali selama 30 detik dan buang aquades.
- d. Slide hasil pewarnaan larutan Mallory I diamati di bawah mikroskop.
- e. Slide dimasukkan ke dalam *staining jar* yang berisi larutan Mallory II dan tunggu selama minimal 5 menit (waktu inkubasi tergantung besar kecilnya jaringan).
- f. Slide hasil pewarnaan larutan Mallory II diamati di bawah mikroskop.
- g. Setelah itu, tanpa melakukan pencucian, slide segera dimasukkan ke dalam *staining jar* berisi larutan Mallory III dan tunggu minimal selama 2 menit (waktu inkubasi tergantung besar kecilnya jaringan).
- h. Kemudian slide dicuci dengan aquades sebanyak 4 kali selama 30 detik dan buang aquades.
- i. Slide hasil pawarnaan Mallory III diamati di bawah mikroskop.
- j. Slide didehidrasi dengan alkohol bertingkat 70%, 80%, 97% masing-masing selama 3 menit.
- k. Proses *clearing* jaringan dengan cara direndam ke dalam xylol sebanyak tiga kali dalam wadah yang berbeda-beda masing-masing selama 3 menit. Proses *mounting* menggunakan Entelen dan ditutupi dengan gelas penutup (Setyowati, 2011).

3.8.7 Pengukuran densitas serabut kolagen

Pengukuran densitas serabut kolagen dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember berdasarkan kriteria skor densitas serabut kolagen. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop binokuler perbesaran 400 kali. Pengukuran lebar serabut kolagen dan lebar jarak antar serabut kolagen dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Optilab^R *ImageRaster* V2.1 yang dapat dilihat pada Lampiran F. Pengukuran densitas serabut kolagen dilakukan pada tiga lapang pandang. Hasil pengukuran tersebut kemudian diambil skor densitas serabut kolagen yang paling sering muncul.

Berikut skor penilaian densitas kolagen menurut Tandelilin dkk. (2006):



Gambar 3.1 Skor densitas serabut kolagen. (A) Skor densitas serabut kolagen menunjukkan derajat densitas kolagen yang rendah, (B) Densitas kolagen sedang, (C) Densitas kolagen tinggi

1. Kriteria penilaian

a) Nilai jenjang 1 apabila serabut kolagen tipis

Kriteria tipis apabila lebar serabut kolagen kurang dari lebar jarak antar serabut kolagen.

b) Nilai jenjang 2 apabila serabut kolagen sedang

Kriteria sedang apabila lebar serabut kolagen sama atau hampir sama dengan lebar jarak antar serabut kolagen. Lebar serabut kolagen dinyatakan hampir sama dengan lebar jarak antar serabut kolagen diasumsikan oleh peneliti yakni apabila perbedaaan lebar serabut kolagen dengan lebar jarak antar serabut kolagen sebesar $\leq 1 \mu\text{m}$.

c) Nilai jenjang 3 apabila serabut kolagen tebal.

Kriteria tebal apabila lebar serabut kolagen lebih lebar daripada lebar jarak antar serabut kolagen.

3.9 Analisis Statistik

Hasil pengamatan densitas serabut kolagen adalah data yang berskala ordinal sehingga dilakukan uji analisis statistik nonparametrik. Analisis perbedaan densitas serabut kolagen pada masing-masing kelompok menggunakan uji analisis statistik *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan uji beda *Mann-Whitney U test* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha < 0,05$).

4.0 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Bagan alur penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian minyak ikan Lemuru (*S. longiceps*) selama 7, 14, dan 21 hari berpengaruh terhadap densitas serabut kolagen kartilago sendi temporomandibula tikus yang mengalami osteoarthritis.

5.2 Saran

Dalam penelitian ini saran yang dapat diambil adalah

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian minyak ikan Lemuru (*S. longiceps*) terhadap komponen seluler yang lain pada sendi temporomandibula tikus yang mengalami osteoarthritis.
2. Perlu adanya persamaan lebar pembukaan rahang hewan coba saat dilakukan pengambilan jaringan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alcaraz, J. M., Gualillo, O., Pernaut, S. O. 2013. *Studies on Arthritis an Joint Disorders*. Spain: Humana Press.
- Buckwalter, M., Grodzinsky, A. 2005. Articular Cartilage and Osteoarthritis. *AAOS Instr Course Lect*. Vol. 5: 465-480.
- Borow, K. M., Nelson, J. R., Masson R. P. 2015. Biologic plausibility, cellular effects, and molecular mechanisms of eicosapentaenoic acid (EPA) in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. Vol. 242: 357-366.
- Bhosale, A. M., Richardson, J. B. 2008. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin*. Vol. 87: 77-95.
- Catalog of Fishes. 2004. Omega-3 Fatty Acids. *Am Fam Physician*. Vol. 70 (1): 133-140
- Calder, P. C. 2006. n₃ Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*. Vol. 83: 1505S-19S.
- Calder, P. C. 2012. Omega-3 Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology. *Br J Clin Pharmacol*. Vol. 75 No. 3: 645-662.
- Carleson, Kogner, Bileviciute, Theodorsson, Appelgren, Kopp, Yousef, Lundeberg. 1997. Effects Of Capsaicin In Temporomandibular Joint Arthritis In Rats. *Archs oral Biol*. Vol. 42(12): 869-876.
- Cleland, James, Proudman, dan Susanna. 2003. The Role of Fish Oils in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *J. Drugs*. Vol. 63 No. 9: 845-853.
- Embree, Iwaoke, Kong, Martin, Patel, Lee, Nathan, Eisig, Safarov, Kslovsky, Koch, Romanov, Mao. 2014. Soft Tissue Ossification and Condylar Cartilage Degeneration Following TMJ Disc Perforation In A Rabbit Pilot Study. *Osteoarthr cartilage*. Vol. 23: 629-639.
- Estiasih, teti. 2010. Optimasi kristalisasi urea pada pembuatan konsentrat asam lemak ω -3 dari minyak hasil samping penepungan ikan lemuru (*Sardinella longiceps*). *J. Teknologi Pertanian*. Vol. 11(1): 37-46.


- Glick, M., Greenberg, M. S., Ship, J. A. 2008. *Burket's Oral Medicine 11th Ed.* India: BC Decker Inc.
- Harper, Kerins, McIntosh, Spears, Bellinger. 2001. Modulation Of The Inflammatory Response in the Rat TMJ With Increasing Doses Of Complete Freund's Adjuvant. *Osteoarthr cartilage*. Vol. 9: 619.
- Herb, K., Cho, S., Stiles, M. A. 2006. Temporomandibular Joint Pain and Dysfunction. *Curr Sci Inc*. Vol. 10: 408-414.
- Iliopoulos, D., Malizos, K. N., dan Tsezou, A. 2007. Epigenetic regulation of leptin affects MMP- 13 expression in osteoarthritic chondrocytes: possible molecular target for osteoarthritis 681 therapeutic intervention. *Ann Rheum Dis*. Vol. 66: 1616–1621.
- Indahyani, D. E. 2003. Manfaat asam lemak omega 3 polyunsaturated pasca perawatan ortodonti. *Kedokteran Gigi*: 357-61.
- Indahyani, Pudyani, Al-Supartinah, Jonarta. 2003. Pengaruh Diet Minyak Ikan Jagung dan Minyak Ikan Terhadap Ekspresi Osteoklas Periapikal Gigi Pada Tikus. *J. Kedokteran Gigi Indonesia*. Vol. 10(3):31-36.
- Indahyani, D. E. 2001. Pengaruh Minyak Ikan Terhadap Jumlah dan Aktivitas Osteoklas Tulang Periapikal Tikus yang Terinduksi Infeksi Pada Pulpa. Dipublikasikan. *Tesis*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Indahyani, D. E., Barid, I., Handayani, Ari. W. 2010. minyak ikan lemuru (*sardinella longiceps*) meregulasi survival osteoblas dan osteoklas, ekspresi integrin $\alpha\beta3$ tulang alveolaris serta struktur gigi pada tikus yang mengalami infeksi periodontal selama masa odontogenesis. *Laporan Penelitian Fundamental*: Universitas Jember.
- Jayasurya, Chaturaka dan Chen, Qian. 2013. Role of Inflammation in Osteoarthritis. *Rheumatol Curr Res*. Vol. 3 (2): 1-2.
- Jerolimov, V. 2009. Temporomandibular disorders and orofacial pain. *Med Sci*. Vol. 33: 54-71.
- Jerosch, jorg. 2011. Effects of Glucosamine and Chondroitin Sulfate on Cartilage Metabolism in OA: Outlook on Other Nutrient Partners Especially Omega-3 Fatty Acids. *Int J Rheumatol*. Vol. 2011: 2-3.

- Joe, B., Lokesh, B. R., 1997. Prophylactic and Therapeutic Effects of n-3 PUFA Capsaicin, and Curcumin on Adjuvant Induced Arthritis in Rats. *J Nutr Biochem*. Vol. 8: 397-407.
- Johansson, Unell, Carlsson, Derfeldt, Halling. 2003. Gender Difference in Symptoms Related to Temporomandibular Disorders in a Population of 50 Year Old Subjects. *J Orofac Pain*. Vol. 17: 29-35.
- Johansson, Unell, Carlsson, Derfeldt, Halling. 2006. Risk factors associated with symptoms of temporomandibular disorders in a population of 50- and 60-year-old subjects. *J Oral Rehabil*. Vol. 33: 473-481.
- Johnson, Craig I., Argyle, D. J., dan Clements, D. N. 2015. In vitro models for the study of osteoarthritis. *Vet J*. Vol. 15: 4.
- Kim, Y. dan Ilich, J. Z. 2011. Implications of Dietary α -Linolenic Acid in Bone Health. *Nutr J*. Vol. 27(11): 1101 - 7.
- Kobayashi, Takahashi, Jimi, Udagawa, Takami, Kotake. 2000. Tumor Necrotizing Factor Alpha Stimulates Osteoclast Differentiation by a Mechanism Independent of The ODF/RANKL-RANK Interaction. *J Exp Med*. Vol. 191: 86-275.
- Kumar, V., Cotran, R. S., dan Robbins, S. L. 2007. *Buku Ajar Patologi*. Edisi ke-7. Vol. 1. Jakarta: EGC.
- Kuroda, Tanimoto, Izawa, Fujihara, Koolstra, Tanaka. 2009. Biomechanical and Biochemical Characteristics of the Mandibular Condylar Cartilage. *Osteoarthritis cartilage*. Vol. 17: 1408-1415.
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*: Yogyakarta. Gajah Mada Universiti Press.
- Leeson, C. R., Leeson, T. S., dan Paparo, A.A. 1996. *Buku Ajar Histologi Edisi Kelima*. Jakarta : EGC.
- Lubis, Yusuf, Riady, Maimun. 2000. Pengujian Asam Lemak Tak Jenuh dari Ekstraksi Beberapa Jenis Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) di Perairan Aceh. *J Med Vet*. Vol. 7(3): 20-24.
- Mahrus, Sumitro, Widodo, Sartimbul. 2012. The Association Between Genetic Variations and Omega-3 Production on *Sardinella lemuru* in Lombok Strait. *IOSR-JAVS*. Vol. 1 (16): 12-16.

- Manfredini, D., Nardini, L. G., Winocur, Ephraim, Piccotti, Ahlber, Jari, Lobbezoo, Frank. 2011. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: a systematic review of axis I epidemiologic findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* Vol. 112(4): 453–462.
- Maulana, Indra T., Sukraso, Dhamayanti, Shofi. 2014. Kandungan Asam Lemak Dalam Minyak Ikan Indonesia. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis.* Vol. 6(1): 121-130.
- Mescher, Anthony L. *Histologi Dasar: Teks & Atlas.* Edisi 11. Alih Bahasa oleh Frans Dhany. 2011. Jakarta: EGC
- Nejad, Kobezda, Rauch, Matez, Glent, Mikecz. 2011. Osteoarthritis-like damage of cartilage in the temporomandibular joints in mice with autoimmune inflammatory arthritis. *Osteoarthr cartilage.* 19: 458-465.
- Norton, N. S. 2012. *Netter's Head and Neck Anatomy for Dentistry. Second Edition.* Philadelphia: Saunders, Elsevier Inc.
- Notoatmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan Cetakan Ketiga.* Jakarta: Rineka Pustaka.
- Nurhayati. 2008. Studi Perbandingan Metode Sampling Antara *Simple Random* Dengan *Stratified Random.* *Jurnal Basis Data, ICT Research Center UNAS.* Vol.3(1): 19.
- Ogura, N., Kondoh, T. 2015. Molecular Aspects In Inflammatory Events of Temporomandibular Joint: Microarray-Based Identification of Mediators. *Jpn Dent Sci Rev.* Vol. 51: 10-24.
- Pantsulaia, I., Kalichman, L., dan Kobylansky, E. 2010. Association Between Radiographic Hand Osteoarthritis and RANKL, OPG, and Inflammatory Markers. *Osteoarthr cartilage.* Vol. 18: 1448-1463.
- Puspitaningrum, D. K. 2012. Pengaruh Pemberian Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) dan Vitamin C terhadap Jumlah Osteoklas Pada Tikus Wistar yang Mengalami Periodontitis. Tidak dipublikasikan. *Skripsi.* Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Robin, D. M. C. 2006. The Effect of Curcuminoid to The Collagen Fibers Density of Osteoarthritis of Temporomandibular Joint. *The Indonesian Journal of Dental Research.* 197-201.

- Simopoulos, A. P. 2002. Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Disease. *J Am Coll Nutr.* Vol. 21: 495-2002.
- Solomon, L., Warwick, D., dan Nayagam S. 2014. *Apley and Solomon's Concise System of Orthopaedics and Trauma.* Fourth Edition. Liverpool: CRC Press.
- Som, Chitra. R. S., & Radakrishnan, C. K. 2013. Seasonal Variaton in The Fatty Acid Composition of *Sardinella longiceps* and *Sardinella fimbriata*: Implications for Nutrition and Pharmaceutical Industry. *Indian J Geo-Mar Sci.* Vol. 42 (2): 602-610.
- Subowo. 2009. *Histologi Umum.* Edisi Ke-2. Jakarta: CV. Agung Seto.
- Sudiana, I. K. 1993. *Tekhnik Praktis Untuk Sel Jaringan.* Bali: CV. Dharma Sandi. Hal: 64-71.
- Suseno, Saraswati, Hayati, dan Izaki. 2014. Fatty Acid Composition of Some Potential Fish Oil From Production Centers in Indonesia. *Oriental Journal of Chemistry.* Vol. 30 (3): 975-980.
- Takano, Ariyoshi, Kanno, Fukuhara, Ichimaya, Matayoshi, Goto, Takahashi. 2007. Induction of Osteoclast-like cells derived from The Synovial Lavage Fluids of Patiens With Temporomandibular Joint Dissorders. *Osteoarthr cartilage.* Vol. 15: 291-299.
- Tandelilin, Regina T. C., Sofro, Abdul S. M., Santoso, A. S., Soesatyo, M., Asmara, Widyan. 2006. The density of collagen fiber in alveolus mandibular bone of rabbit after augmentation with powder demineralized bone matrix post incisivus extraction. *Dent J.* Vol. 39:44.
- Willard, V. P., Zhang, L.Athanasiou, K. A. 2011. *Tissue Engineering of the Temporomandibular Joint.* Philadelphia: Saunders, Elsevier Inc.

LAMPIRAN A. Surat Keterangan *Ethical Clearance*

	UNIT ETIKA DAN ADVOKASI FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS GADJAH MADA <small>Sekretariat: Fakultas Kedokteran Gigi UGM Jl. Denta Sekip Utara Yogyakarta Telp. (0274) 547667</small>
---	--

KETERANGAN KELAIKAN ETIK PENELITIAN
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 00391KKEP/FKG-UGM/EC/2015

Setelah Tim Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan:

Judul : **POTENSI MINYAK IKAN LEMURU (*Sardinella longiceps*) TERHADAP DENSITAS SERABUT KOLAGEN KARTILAGO SENDI TEMPOROMANDIBULA MODEL TIKUS OSTEOARTRITIS**

Peneliti Utama : Dwi Riski Saputra

Penanggung Jawab Medis : drg. Dwi Merry Ch. Robin, M.Kes

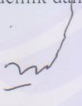
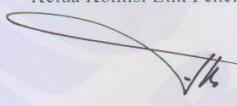
Unit/Lembaga : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Lokasi Penelitian : Laboratorium Biomedik Fakultas Farmasi Universitas Jember




Waktu Penelitian : Oktober – Desember 2015

Maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian tersebut telah memenuhi syarat atau laik etik.


Yogyakarta, 7 Oktober 2015

Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kemahasiswaan	Ketua Komisi Etik Penelitian FKG UGM
 drg. Diatri Nani Rahm, M.Kes., Sp. KG, Ph.D.	 drg. Suryono, S.H, Ph.D.

LAMPIRAN B. Surat Keterangan Ekstraksi Minyak Ikan

	KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI UNIVERSITAS JEMBER FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎ (0331) 333536. Fak. 331991
<hr/>	
Nomor	: 4539 /UN25.1.8/TL/2014
Perihal	: Ijin Penelitian
<p>Kepada Yth. Kepala Laboratorium Kimia Dasar Fakultas MIPA Universitas Jember di <u>Jember</u></p>	
<p>Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan Skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa kami di bawah ini :</p>	
1. Nama	: Dwi Riski Saputra
2. NIM	: 121610101037
3. Tahun Akademik	: 2015/2016
4. Fakultas	: Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat	: Jl. Batu Raden II No. 7 Jember
6. Judul Penelitian	: Potensi Minyak Ikan Lemuru Terhadap Densitas Serabut Kolagen Kartilago Sendi Temporomandibula Model Tikus Osteoarthritis
7. Lokasi Penelitian	: Lab. Kimia Dasar Fakultas MIPA Universitas Jember
8. Data/alat yang dipinjam	: -
9. Waktu	: Desember 2015 s/d Selesai
10. Tujuan Penelitian	: Untuk Mengetahui Potensi Minyak Ikan Lemuru Terhadap Densitas Serabut Kolagen Kartilago Sendi Temporomandibula Model Tikus Osteoarthritis
11. Dosen Pembimbing	: 1. drg. Dwi Merry C R. M.Kes 2. drg. Suhartini, M.Biotech
<p>Demikian atas perkenan dan kerjasama yang baik disampaikan terima kasih.</p>	
<p>Jember, 02 DEC 2015 an. Dekan Pembantu Dekan I</p>	
  Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes NIP. 196109031986022001	

LAMPIRAN C. Surat Ijin Laboratorium Biomedik

 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536. Fak. 331991

Nomor : 452/UN25.8/TL/2015
Perihal : Ijin Penelitian



Kepada Yth.
Ka. Bag. BIOMEDIK FKG Universitas Jember
di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan Skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa di bawah ini :


1. Nama : Dwi Riski Saputra
2. NIM : 121610101037
3. Tahun Akademik : 2015/2016
4. Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat : Jl. Batu Raden II No. 7 Jember
6. Judul Penelitian : Potensi Minyak Ikan Lemuru Terhadap Densitas Serabut Kolagen Kartilago Sendi Temporomandibula Model Tikus Osteoarthritis
7. Lokasi Penelitian : Lab. Patologi Anatomi FKG Universitas Jember
8. Data/alat yang dipinjam : -
9. Waktu : Desember 2015 s/d Selesai
10. Tujuan Penelitian : Untuk Mengetahui Potensi Minyak Ikan Lemuru Terhadap Densitas Serabut Kolagen Kartilago Sendi Temporomandibula Model Tikus Osteoarthritis
11. Dosen Pembimbing : 1. drg. Dwi Merry C R. M.Kes
2. drg. Suhartini, M.Biotech

Demikian atas perkenan dan kerjasama yang baik disampaikan terima kasih.

Jember, 02 DEC 2015
an. Dekan
Pembantu Dekan I



Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
NIP. 196109031986022001

LAMPIRAN D. Surat Ijin Laboratorium Radiologi

 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : 26216/UN25.8/TL/2015
Perihal : Ijin Penelitian


Kepada Yth.
Ka.Bag. Radiologi
RSGM Universitas Jember
di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan proposal skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa di bawah ini :


1. Nama	: Dwi Riski Saputra
2. NIM	: 121610101037
3. Tahun Akademik	: 2015/2016
4. Fakultas	: Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat	: Jl. Batu Raden II No. 7 Jember
6. Judul Penelitian	: Potensi Minyak Ikan Lemuru Terhadap Densitas Serabut Kolagen Kartilago Sendi Temporamandibula Model Tikus Osteoartritis
7. Lokasi Penelitian	: Lab. Radiologi RSGM Universitas Jember
8. Data/alat yang dipinjam	: Dental Radiografi Unit
9. Waktu	: Desember 2015 s/d Selesai
10. Tujuan Penelitian	: Untuk Mengetahui Potensi Minyak Ikan Lemuru Terhadap Densitas Serabut Kolagen Kartilago Sendi Temporamandibula Model Tikus Osteoartritis
11. Dosen Pembimbing	: 1. drg. Dwi Merry C R. M.Kes 2. drg. Suhartini, M.Biotech

Demikian atas perkenan dan kerjasama yang baik disampaikan terima kasih.

Jember, 02 DEC 2015
an. Dekan
Pembantu Dekan I


Dr. drg. ADA Susilawati, M.Kes
NIP. 196109031986022001

LAMPIRAN E. Surat Ijin Laboratorium Biomedik


 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
 UNIVERSITAS JEMBER
 FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
 Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991



Nomor : 21731/UN25.8/TL/2015
 Perihal : Ijin Pembelian Bahan

Kepada Yth.
 Kepala Laboratorium Biomedik
 Fakultas Farmasi Universitas Jember
 di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin pembelian bahan bagi mahasiswa di bawah ini :

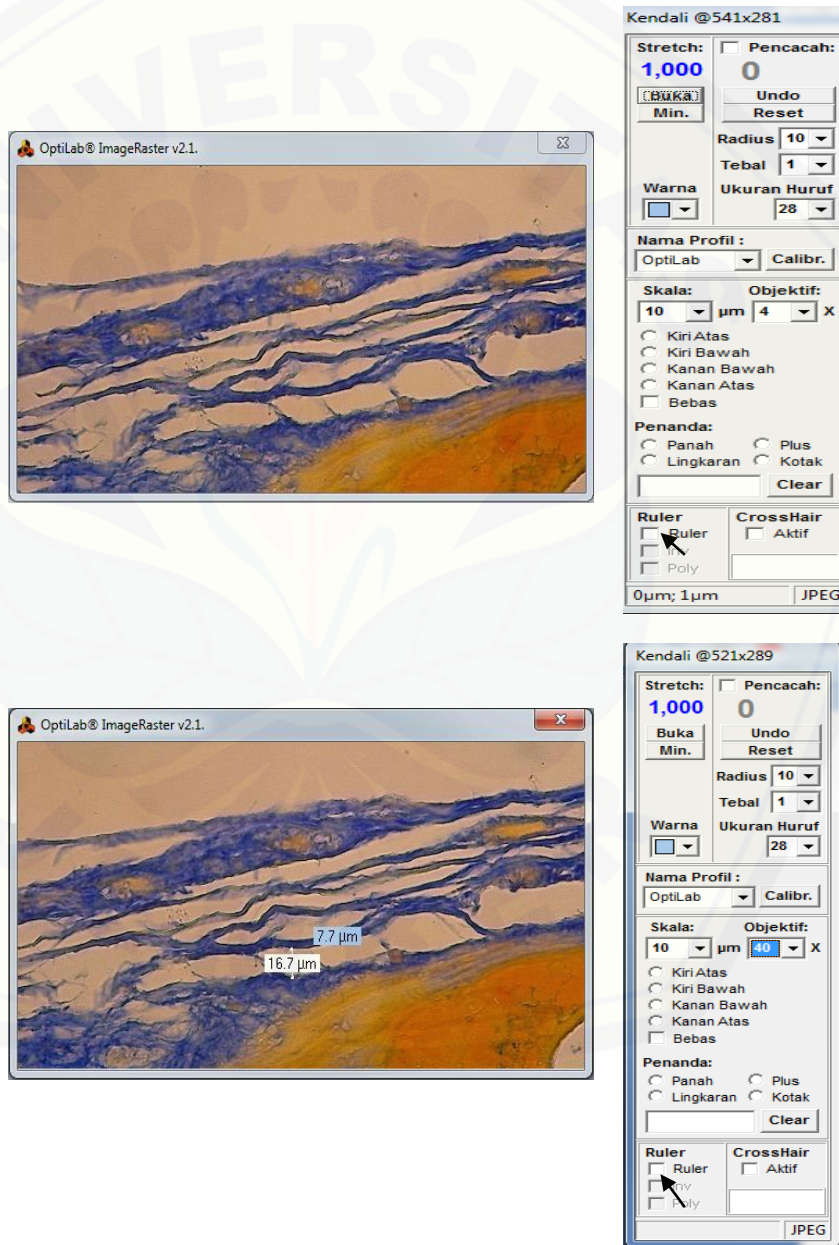
1. Nama	: Dwi Riski Saputra
2. NIM	: 121610101037
3. Tahun Akademik	: 2015/2016
4. Fakultas	: Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat	: Jl. Batu Raden II No. 7 Jember
6. Judul Penelitian	: Potensi Minyak Ikan Lemuru Terhadap Densitas Serabut Kolagen Kartilago Sendi Temporomandibula Model Tikus Osteoarthritis
7. Lokasi Penelitian	: Lab. Biomedik Fakultas Farmasi Universitas Jember
8. Data/alat yang dipinjam	: -
9. Waktu	: Desember 2015 s/d Selesai
10. Tujuan Penelitian	: Untuk Mengetahui Potensi Minyak Ikan Lemuru Terhadap Densitas Serabut Kolagen Kartilago Sendi Temporomandibula Model Tikus Osteoarthritis
11. Dosen Pembimbing	: 1. drg. Dwi Merry C R. M.Kes 2. drg. Suhartini, M.Biotech

Demikian atas perkenan dan kerjasama yang baik disampaikan terima kasih.

Jember, 02 DEC 2015
 an. Dekan
 Pembantu Dekan I


Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
 NIP. 196109031986022001

LAMPIRAN F. Pengukuran Densitas Serabut Kolagen

Tahap pertama adalah membuka gambar histopatologi hasil pencitraan dari optilab pada perangkat lunak Optilab^R ImageRaster V2.1. Kemudian memilih kotak ruler (anak panah) untuk mengukur perbedaan lebar serabut kolagen dengan lebar jarak antar serabut kolagen.



LAMPIRAN G. Data kasar hasil pengamatan densitas serabut kolagen**Kelompok K7**

Sampel	Lokasi Pengamatan	Jarak antar serabut kolagen (μm)	Lebar serabut kolagen (μm)	Skor densitas serabut kolagen (1-3)	Skor dengan frekuensi tertinggi
K7.1	LP1	22,2	19,6	1	1
	LP2	34,0	30,1	1	
	LP3	27,4	19,6	1	
K7.2	LP1	19,1	11,7	1	1
	LP2	22,9	12,3	1	
	LP3	27,0	27,5	2	
K7.3	LP1	19,4	8,5	1	1
	LP2	35,1	20,9	1	
	LP3	28,4	28,2	2	
K7.4	LP1	25,1	21,3	1	1
	LP2	25,1	21,3	1	
	LP3	36,6	22,8	1	

Kelompok K14

Sampel	Lokasi Pengamatan	Jarak antar serabut kolagen (μm)	Lebar serabut kolagen (μm)	Skor densitas serabut kolagen (1-3)	Skor dengan frekuensi tertinggi
K14.1	LP1	22,2	12,4	1	1
	LP2	26,9	21,7	1	
	LP3	21,9	15,7	1	
K14.2	LP1	13,2	13,1	2	1
	LP2	18,8	10,1	1	
	LP3	18,2	14,5	1	
K14.3	LP1	21,2	10,0	1	1
	LP2	57,0	21,1	1	
	LP3	38,9	15,6	1	
K14.4	LP1	24,1	20,7	1	1
	LP2	26,9	17,4	1	
	LP3	33,1	29,2	1	

Kelompok K21

Sampel	Lokasi Pengamatan	Jarak antar serabut kolagen (μm)	Lebar serabut kolagen (μm)	Skor densitas serabut kolagen (1-3)	Skor dengan frekuensi tertinggi
K21.1	LP1	23,1	10,3	1	1
	LP2	14,2	14,7	2	
	LP3	28,3	17,8	1	
K21.2	LP1	41,3	27,9	1	1
	LP2	22,7	21,3	1	
	LP3	13,3	13,3	2	
K21.3	LP1	11,5	16,1	2	1
	LP2	22,8	12,2	1	
	LP3	44,1	23,5	1	
K21.4	LP1	22,1	15,0	1	1
	LP2	27,1	17,0	1	
	LP3	26,1	7,8	1	

Kelompok P7

Sampel	Lokasi Pengamatan	Jarak antar serabut kolagen (μm)	Lebar serabut kolagen (μm)	Skor densitas serabut kolagen (1-3)	Skor dengan frekuensi tertinggi
P7.1	LP1	19,5	19,8	2	2
	LP2	17,2	17,4	2	
	LP3	20,6	10,3	1	
P7.2	LP1	43,5	24,5	1	2
	LP2	24,5	24,6	2	
	LP3	23,2	23,1	2	
P7.3	LP1	25,3	25,3	2	1
	LP2	35,8	26,8	1	
	LP3	58,1	49,2	1	
P7.4	LP1	29,7	29,6	2	2
	LP2	30,5	30,3	2	
	LP3	37,8	37,8	2	

Kelompok P14

Sampel	Lokasi Pengamatan	Jarak antar serabut kolagen (μm)	Lebar serabut kolagen (μm)	Skor densitas serabut kolagen (1-3)	Skor dengan frekuensi tertinggi
P14.1	LP1	34,1	34,2	2	2
	LP2	45,1	45,8	2	
	LP3	39,6	53,2	3	
P14.2	LP1	30,8	36,3	3	3
	LP2	22,2	28,6	3	
	LP3	20,2	20,5	2	
P14.3	LP1	17,0	17,8	2	2
	LP2	7,0	10,7	3	
	LP3	28,2	28,0	2	
P14.4	LP1	23,8	26,5	3	3
	LP2	28,3	30,1	3	
	LP3	14,6	19,9	3	

Kelompok P21

Sampel	Lokasi Pengamatan	Jarak antar serabut kolagen (μm)	Lebar serabut kolagen (μm)	Skor densitas serabut kolagen (1-3)	Skor dengan frekuensi tertinggi
P21.1	LP1	5,1	30,1	3	3
	LP2	11,0	19,1	3	
	LP3	11,7	29,3	3	
P21.2	LP1	13,5	24,8	3	3
	LP2	30,2	30,5	2	
	LP3	23,2	29,7	3	
P21.3	LP1	12,4	33,2	3	3
	LP2	13,2	45,6	3	
	LP3	10,8	25,5	3	
P21.4	LP1	18,6	34,4	3	3
	LP2	21,9	21,5	2	
	LP3	5,5	28,2	3	

Keterangan : Pengukuran densitas kolagen dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x

Lampiran H. Analisis Statistik

H.1 Hasil Uji Statistik Kruskal Wallis

Kruskal Wallis Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank
Skor	K7	4	7.00
	K14	4	7.00
	K21	4	7.00
	P7	4	13.75
	P14	4	18.75
	P21	4	21.50
	Total		24

Test Statistics(a,b)

	Skor
Chi-Square	20.775
df	5
Asymp. Sig.	.001

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Kelompok

Mann-Whitney Test

1. Kelompok K7 dengan K14

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor	K7	4	4.50	18.00
	K14	4	4.50	18.00
	Total	8		

Test Statistics(b)

	Skor
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	18.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Kelompok

2. Kelompok K7 dengan K21

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor	K7	4	4.50	18.00
	K21	4	4.50	18.00
	Total	8		

Test Statistics(b)

	Skor
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	18.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Kelompok

3. Kelompok K14 dengan K21

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor	K14	4	4.50	18.00
	K21	4	4.50	18.00
	Total	8		

Test Statistics(b)

	Skor
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	18.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Kelompok

4. Kelompok K7 dengan P7

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor	K7	4	3.00	12.00
	P7	4	6.00	24.00
	Total	8		

Test Statistics(b)

	Skor
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-2.049
Asymp. Sig. (2-tailed)	.040
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Kelompok

5. Kelompok K7 dengan P14

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor	K7	4	2.50	10.00
	P14	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics(b)

	Skor
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.494
Asymp. Sig. (2-tailed)	.013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Kelompok

6. Kelompok K7 dengan P21

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor	K7	4	2.50	10.00
	P21	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics(b)

	Skor
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.646
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Kelompok

7. Kelompok K14 dengan K21

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor	K14	4	4.50	18.00
	K21	4	4.50	18.00
	Total	8		

Test Statistics(b)

	Skor
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	18.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Kelompok

8. Kelompok K14 dengan P7

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor	K14	4	3.00	12.00
	P7	4	6.00	24.00
	Total	8		

Test Statistics(b)

	Skor
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-2.049
Asymp. Sig. (2-tailed)	.040
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Kelompok

9. Kelompok K14 dengan P14

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor	K14	4	2.50	10.00
	P14	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics(b)

	Skor
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.494
Asymp. Sig. (2-tailed)	.013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Kelompok

10. Kelompok K14 dengan P21

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor	K14	4	2.50	10.00
	P21	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics(b)

	Skor
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.646
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Kelompok

11. Kelompok K21 dengan P7

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor	K21	4	3.00	12.00
	P7	4	6.00	24.00
	Total	8		

Test Statistics(b)

	Skor
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-2.049
Asymp. Sig. (2-tailed)	.040
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Kelompok

12. Kelompok K21 dengan P14

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor	K21	4	2.50	10.00
	P14	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics(b)

	Skor
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.494
Asymp. Sig. (2-tailed)	.013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Kelompok

13. Kelompok K21 dengan P21

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor	K21	4	2.50	10.00
	P21	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics(b)

	Skor
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.646
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Kelompok

14. Kelompok P7 dengan P14

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor	P7	4	3.25	13.00
	P14	4	5.75	23.00
	Total	8		

Test Statistics(b)

	Skor
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	13.000
Z	-1.667
Asymp. Sig. (2-tailed)	.096
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Kelompok

15. Kelompok P7 dengan P21

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor	P7	4	2.50	10.00
	P21	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics(b)

	Skor
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.530
Asymp. Sig. (2-tailed)	.011
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Kelompok

16. Kelompok P14 dengan P21

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor	P14	4	3.50	14.00
	P21	4	5.50	22.00
	Total	8		

Test Statistics(b)

	Skor
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	14.000
Z	-1.528
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.343(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Kelompok

Lampiran I. Prosedur Penelitian



Kandang pemeliharaan hewan coba



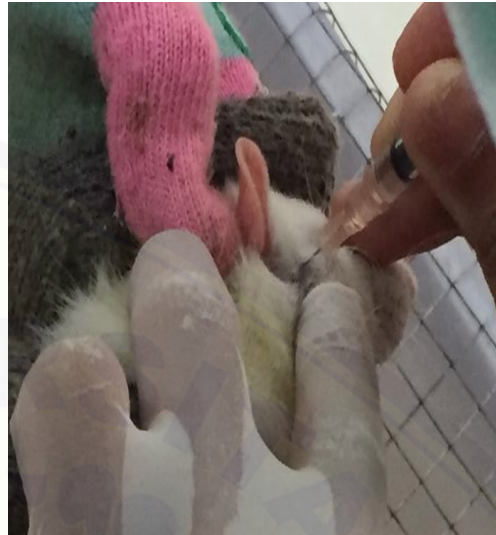
Pengambilan CFA dari tabung vial



Vibrasi salin steril + CFA



Anestesi Ketamin Hewan Coba



Injeksi CFA secara intraartikular Sendi temporomandibula sebelah kanan



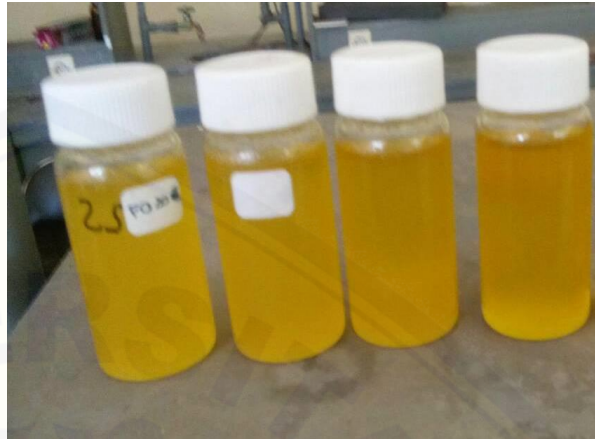
Proses Mixing Ikan Lemuru



Proses sentrifugasi



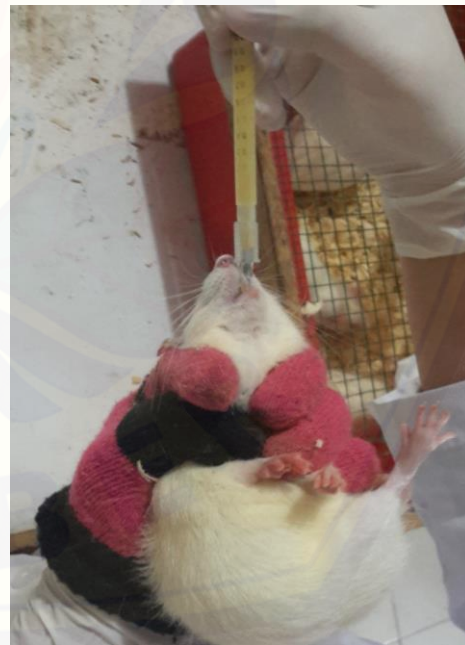
Hasil sentrifugasi menghasilkan 3 lapisan (minyak ikan, lemak dan air)



Minyak ikan murni dipisah dan dipindahkan ke dalam botol kaca



Sondase lambung salin steril



Sondase lambung minyak ikan Lemuru (*S. longiceps*)



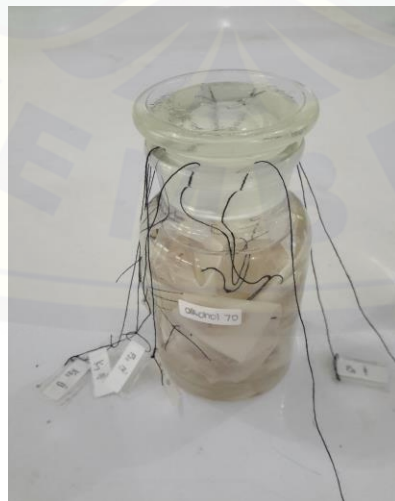
Dekapitasi Hewan Coba



Fiksasi Jaringan dalam *Buffer* formalin



Dekalsifikasi dalam larutan Asam formiat 10 %



Dehidrasi jaringan dengan alkohol secara bertingkat

LAMPIRAN J. ALAT DAN BAHAN PENELITIAN



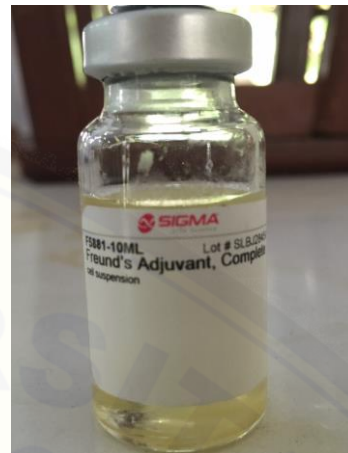
Gambar 1. Kapas steril; 2. Kloroform; 3. Asam formiat 10%; 4. Buffer formalin; 5. Minyak ikan lemuru (*S. longiceps*); Tisu



Botol Dehidrasi dan *Clearing*



Ketamin 50 mg/ml *anesject*



Complete Freund's Adjuvat (Sigma-Aldrich co.)



1. Glass beaker, 2. Tuberkulin spuit 0,1 cc, 3. Spuit terumo 3cc, 4. Gunting Bedah, 5. Pinset surgis, 6. Pinset anatomis, 7. *Handle Scalpel*



Keterangan :

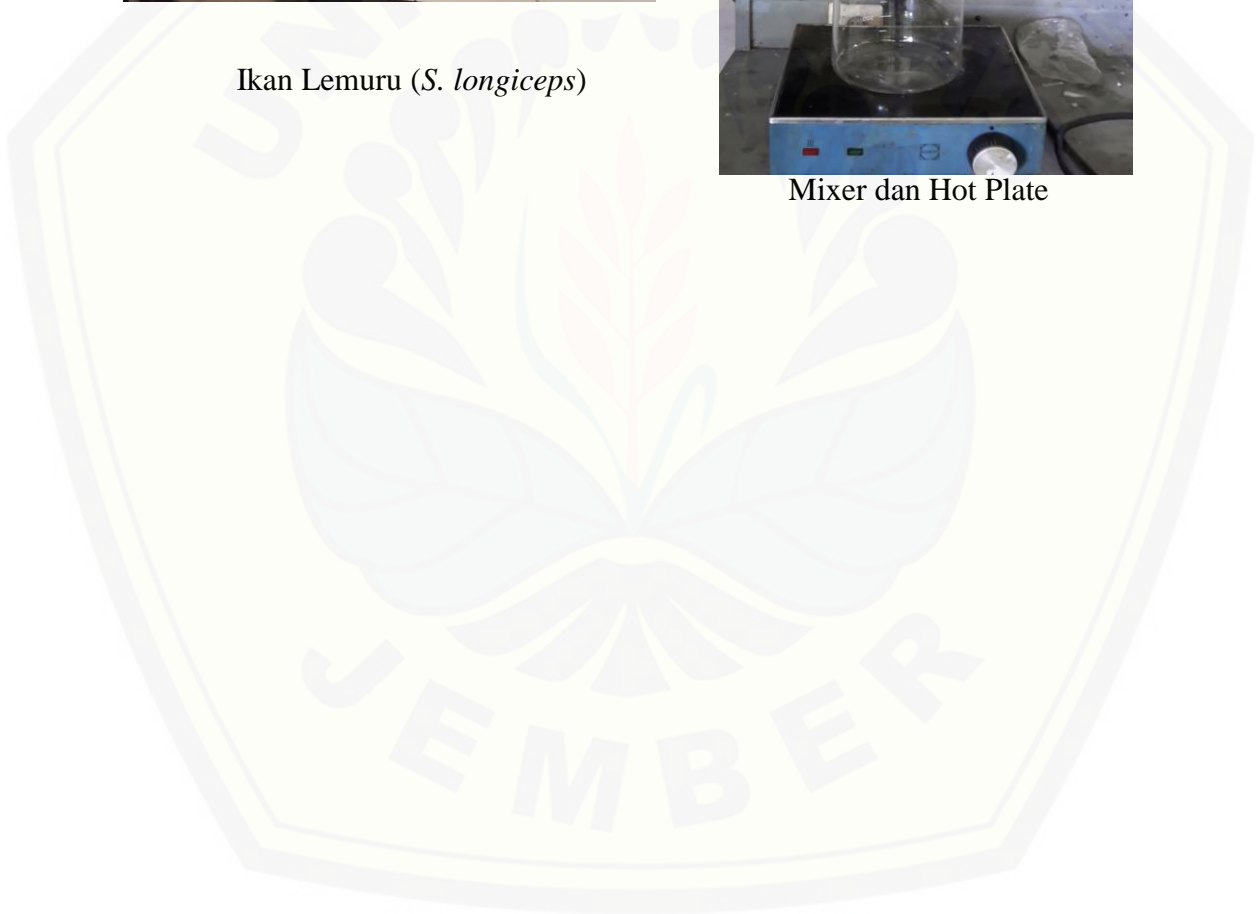
1. Mikrotom Putar
2. *Waterbath*
3. Mikroskop Binokuler
4. Oven
5. Slide Warmer



Ikan Lemuru (*S. longiceps*)

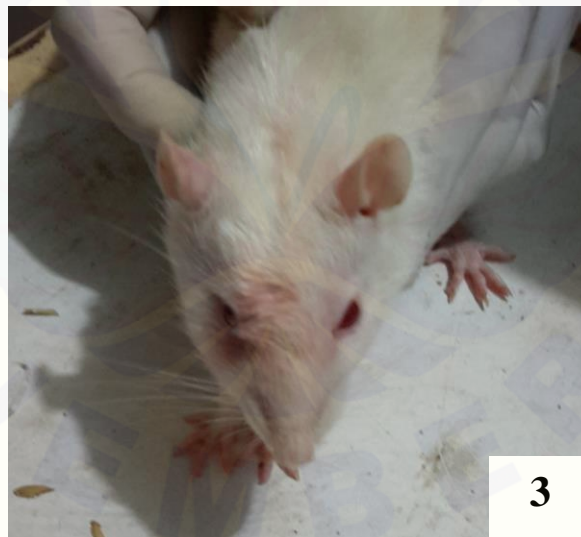
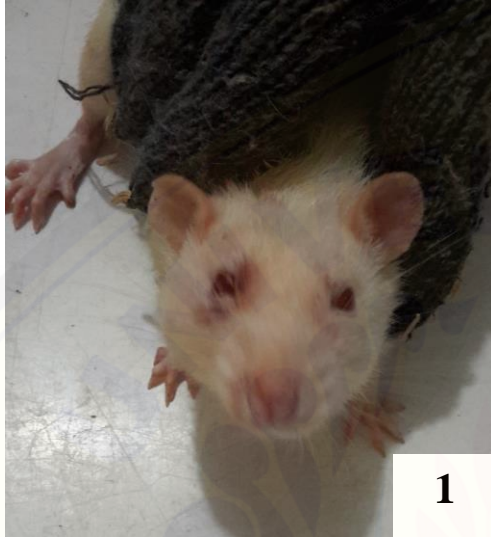


Mixer dan Hot Plate



Lampiran K. Dokumentasi Hasil Penelitian

- a. Gambaran klinis jaringan lunak sekitar sendi temporomandibula tikus setelah injeksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA)



Keterangan gambar :

1. 24 jam pasca injeksi CFA
2. 48 jam pasca injeksi CFA
3. 72 jam pasca injeksi CFA