



**POTENSI MINYAK IKAN LEMURU (*Sardinella longiceps*)
TERHADAP JUMLAH KONDROSIT 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

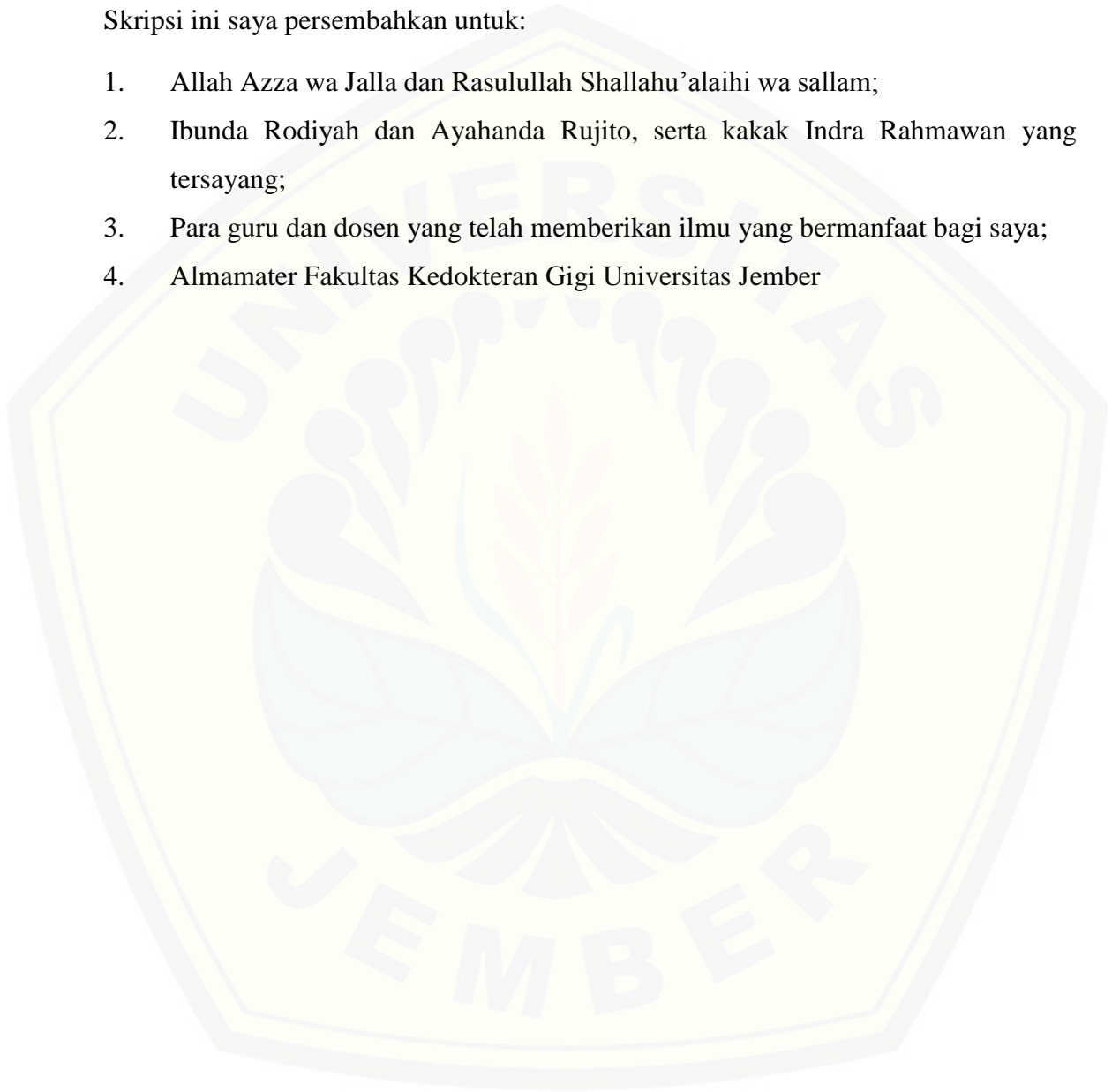
Anindya Roshida
NIM 121610101082

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2017**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

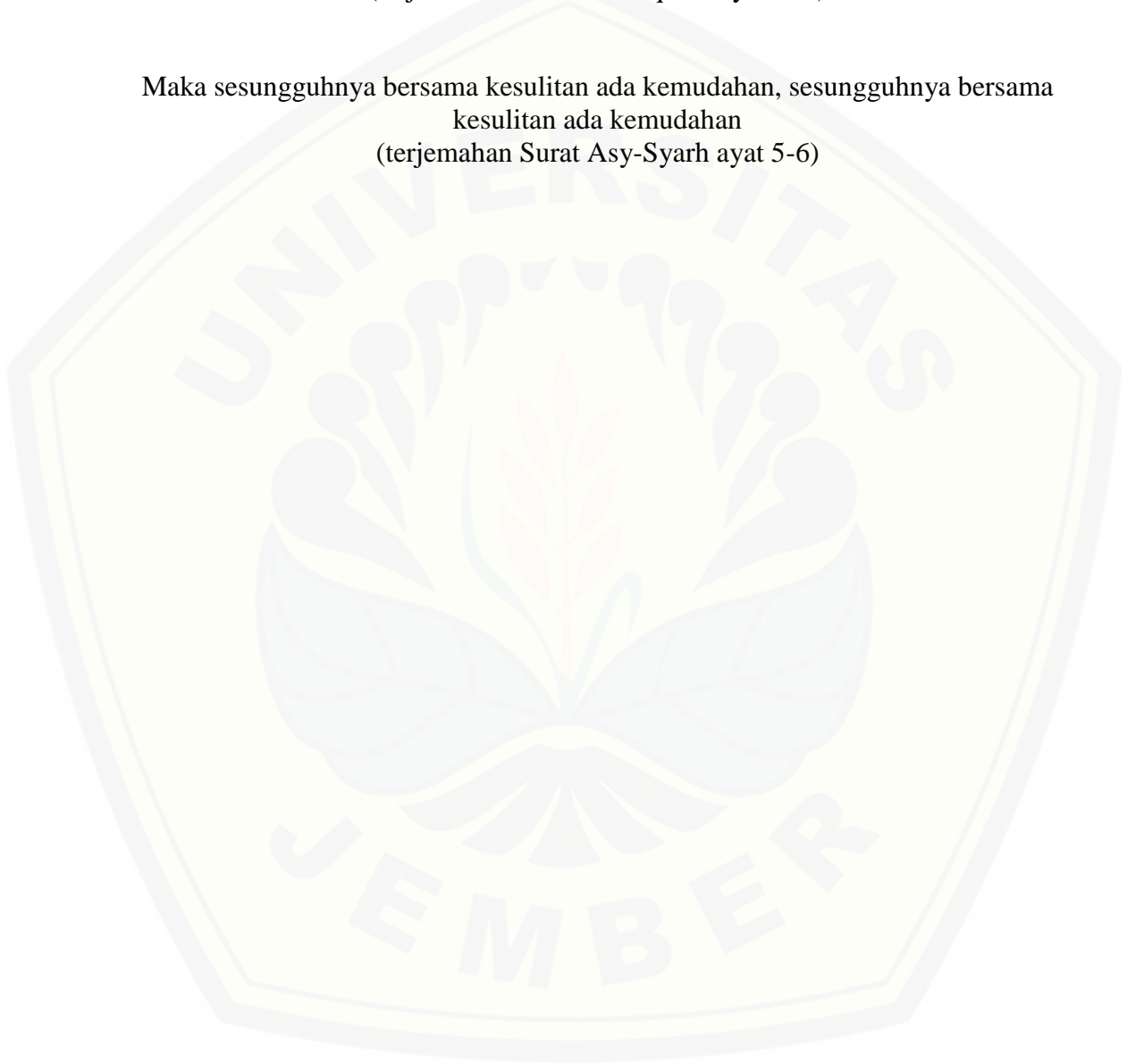
1. Allah Azza wa Jalla dan Rasulullah Shallahu'alaihi wa sallam;
2. Ibunda Rodiyah dan Ayahanda Rujito, serta kakak Indra Rahmawan yang tersayang;
3. Para guru dan dosen yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat bagi saya;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember



MOTTO

Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya.
(terjemahan Surat Al-Baqarah ayat 286)

Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan, sesungguhnya bersama
kesulitan ada kemudahan
(terjemahan Surat Asy-Syarah ayat 5-6)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Anindya Roshida

NIM : 121610101082

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Potensi Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) terhadap Jumlah Kondrosit Kartilago Sendi Temporomandibula Tikus yang Mengalami Osteoarthritis” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi 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 mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 5 Januari 2017

Yang menyatakan,

Anindya Roshida

121610101082

SKRIPSI

**POTENSI MINYAK IKAN LEMURU (*Sardinella longiceps*) TERHADAP
JUMLAH KONDROSIT KARTILAGO SENDI TEMPOROMANDIBULA
TIKUS YANG MENGALAMI OSTEOARTRITIS**

Oleh
Anindya Roshida
NIM 121610101082

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Dwi Merry Christmarini R, M.Kes
Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Yani Corvianindya R, M.KG

PENGESAHAN

Karya ilmiah Skripsi berjudul “Potensi Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) terhadap Jumlah Kondrosit Kartilago Sendi Temporomandibula Tikus yang Mengalami Osteoarthritis” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Rabu, 2 November 2016

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua,

Penguji Anggota,

Prof. drg. Mei Syafriadi, M.DSc., Ph.D.
NIP 196805291994031003

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

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping

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

drg. Yani Corvianindya R, M.KG.
NIP 197308251998022001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp. Prost
NIP 196901121996011001

RINGKASAN

POTENSI MINYAK IKAN LEMURU (*Sardinella longiceps*) TERHADAP JUMLAH KONDROSIT KARTILAGO SENDI TEMPOROMANDIBULA TIKUS YANG MENGALAMI OSTEOARTRITIS; Anindya Roshida, 121610101082; 2017: 80 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Osteoarthritis terjadi dengan adanya pembentukan prostaglandin E₂ (PGE₂) dan tromboksan A₂ (TxA₂) melalui metabolisme asam arakidonat (AA) pada jalur siklooksigenase (COX). Pembentukan prostaglandin dan tromboksan ini dapat memicu produksi sitokin proinflamasi seperti IL-1, TNF- α , IL-6 dan NO yang dapat mendegradasi matriks ekstraseluler kartilago dan memicu apoptosis kondrosit. Kondrosit merupakan komponen seluler utama pada kartilago dan berperan dalam mensintesis kolagen dan matriks lainnya seperti glikoprotein dan proteoglikan dalam jumlah yang bervariasi. Terapi dengan obat-obatan NSAID, seperti piroksikam dalam waktu lama terbukti dapat menimbulkan efek samping pada gastrointestinal, sehingga banyak digunakan bahan alami seperti minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) untuk meminimalisir efek samping tersebut.

Penelitian eksperimental laboratoris pada tikus *Sprague dawley* jantan ini menggunakan rancangan *the post-test only control group*. Sampel berjumlah 36 ekor, berat 200-339 gram, dan sehat. Sampel dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, dan kelompok perlakuan. Induksi osteoarthritis dilakukan dengan menginjeksikan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) secara intraartikular sendi temporomandibula tikus sebelah kanan. Empat minggu setelah injeksi CFA, tikus pada kelompok kontrol negatif dilakukan pemberian salin, pada kelompok kontrol positif dilakukan pemberian piroksikam dan pada kelompok perlakuan dilakukan pemberian minyak ikan lemuru. Tikus dari masing-masing kelompok dieuthanasi pada hari ke 7, 14, dan 21 secara inhalasi

dengan klorofom dan dilanjutkan dengan pemrosesan jaringan menggunakan alkohol dan *xylol*. Pembuatan preparat histologis dilakukan dengan metode blok paraffin dan kemudian dilakukan penyayatan jaringan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 μ m. Pengecatan jaringan dilakukan dengan menggunakan *Hematoxylin Eosin* (HE). Perhitungan jumlah kondrosit dilakukan pada zona matur dengan menggunakan mikroskop cahaya dan *graticulae* dengan perbesaran 400X pada tiga lapang pandang yaitu bagian kiri, tengah, dan kanan katilago kondilus. Data yang diperoleh kemudian ditabulasi dan dianalisis dengan stastistik parametrik *One-Way* ANOVA.

Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan jumlah kondrosit yang bermakna ($p < 0,05$) pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif maupun positif pada hari ke 14 dan 21, namun terdapat perbedaan yang tidak bermakna ($p > 0,05$) antara kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan pada hari ke-7. Jumlah kondrosit pada kelompok kontrol negatif meningkat pada hari ke-14 dan kemudian menurun pada hari ke-21 dibandingkan dengan hari ke-7. Pada kelompok kontrol positif, jumlah kondrosit mengalami penurunan pada hari ke-14 dan hari ke-21 dibandingkan dengan hari ke-7. Sedangkan jumlah kondrosit pada kelompok perlakuan meningkat pada hari ke-14 dan 21 dibandingkan dengan hari ke-7.

Peningkatan jumlah kondrosit diduga karena kandungan EPA dan DHA pada minyak ikan lemuru bersifat anti inflamasi sehingga produksi sitokin proinflamasi dalam mendegradasi matriks ekstraseluler menurun. EPA minyak ikan juga dapat menghambat stres oksidatif oleh karena produksi NO yang berlebih sehingga apoptosis kondrosit terhambat. Kesimpulan dari penelitian ini yaitu minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) dapat menghambat inflamasi sama seperti piroksikam dan kemungkinan dipertimbangkan dapat meningkatkan proliferasi sel kondrosit kartilago sendi temporomandibula tikus yang mengalami osteoarthritis.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah Subhanahuwata'ala atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Potensi Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) terhadap Jumlah Kondrosit Kartilago Sendi Temporomandibula 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. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prost., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
2. drg. Dwi Merry Christmarini Robin, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. Yani Corvianindya Rahayu, M.KG., selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah memberikan bimbingan, saran, serta motivasi dengan penuh kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
3. Prof. drg. Mei Syafriadi, MDSc., Ph.D., 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.
4. drg. Ekiyantini Widyowati, selaku Dosen Pembimbing Akademik yang selalu memotivasi dan memberikan saran dalam menempuh masa studi di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
5. Kedua orang tua, Ibunda Rodiyah, S.Pd. dan Ayahanda Rujito, S.E., yang selalu mendoakan dan memberikan semangat serta mendidik saya hingga dewasa ini dengan penuh kesabaran.
6. Kakak saya, Indra Rahmawan, yang juga selalu memberikan semangat dalam menyelesaikan skripsi ini.

7. Partner penelitian, Aisyah Gedyani P. dan Dwi Riski, terima kasih atas kerja samanya dan semangatnya sampai akhir penelitian dan penyelesaian skripsi ini.
8. Teman cerita, Galuh Panji Rakasiwi, terima kasih atas semangatnya.
9. Keluarga Al-Hidayah, Leli, Citra, Nana, Dela, dan Ayuk, yang selalu memberikan semangat dan motivasi selama kuliah di FKG Universitas Jember.
10. Keluarga Rantauers, Defath, Teteh, Eno, Annis, dan Luna yang selalu memberikan kebahagiaan dan semangat sampai akhir.
11. Partner pencari kebahagiaan lainnya, Aceng, Ayin, Pume, Galis, Putri, Penting Camping, terima kasih atas dukungannya.
12. Teman-teman FKG 2012 yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu, terima kasih atas kerja samanya dan sukses untuk kita semua.
13. Pihak-pihak lain yang turut membantu dalam penyelesaian skripsi ini, Ibu Wahyu staf Laboratorium Histologi dan Patologi Anatomi FKG Universitas Jember serta Mbak Dini dan Mbak Indri staf Laboratorium Biomedik Fakultas Farmasi Universitas Jember.
14. Semua pihak yang turut terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

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

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

Jember, 5 Januari 2017

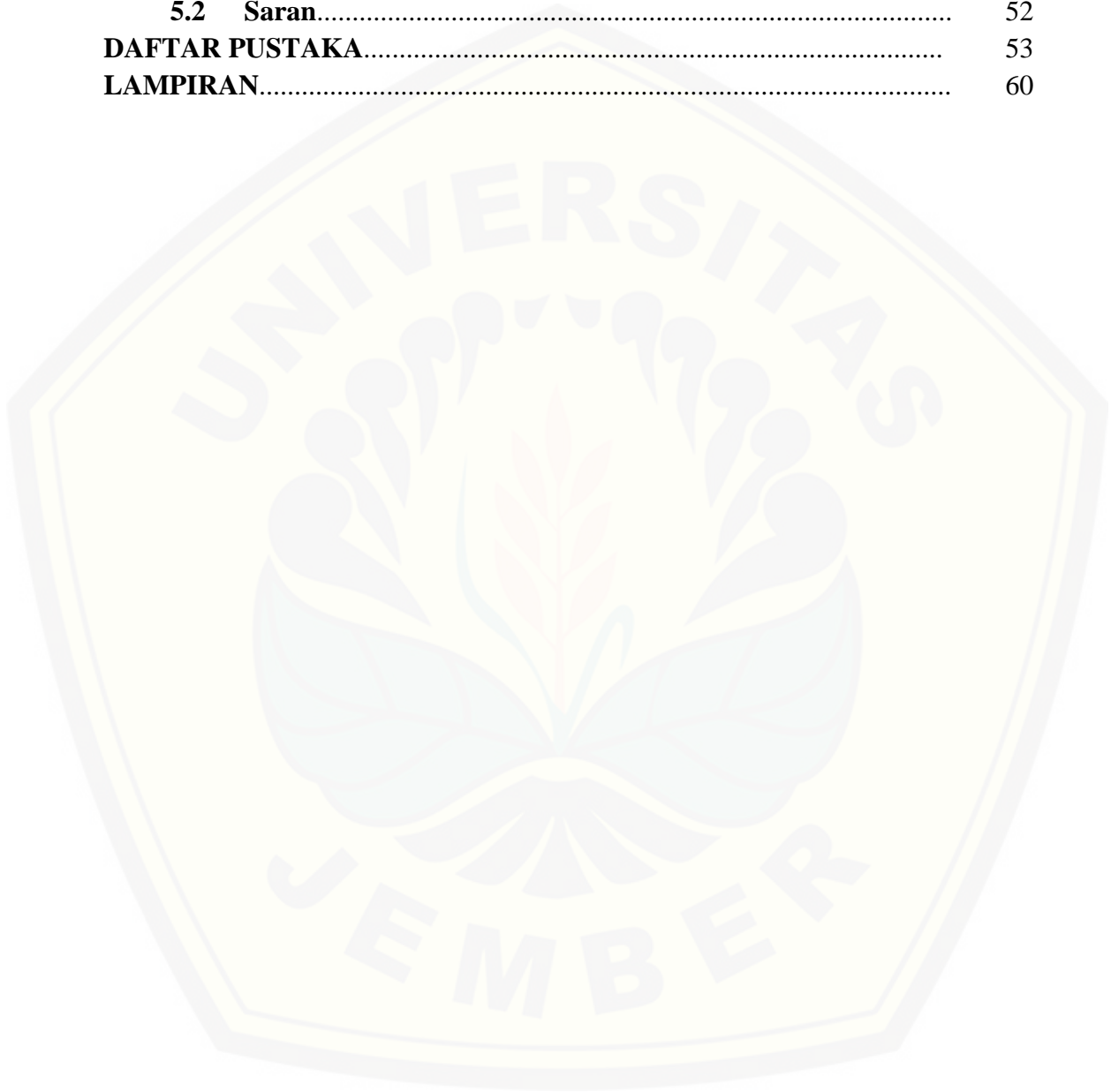
Penulis

DAFTAR ISI

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
DAFTAR SINGKATAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Sendi Temporomandibula	5
2.2 Kartilago Sendi Temporomandibula	6
2.3 Sel Kondrosit	8
2.4 Osteoartritis Temporomandibula	9
2.4.1 Definisi dan Etiologi.....	9
2.4.2 Patogenesis dan Respon Inflamasi Osteoartritis.....	11
2.4.3 Induksi Osteoartritis pada Hewan Coba.....	14
2.4.4 Terapi Osteoartritis	15
2.5 Ikan Lemuru	16
2.6 Minyak Ikan Lemuru	17
2.6.1 Kandungan Minyak Ikan Lemuru.....	17
2.6.2 Peran Minyak Ikan sebagai Anti Inflamasi.....	18
2.7 Kerangka Konsep Penelitian	20
2.8 Hipotesa Penelitian	21
BAB 3. METODE PENELITIAN	
3.1 Jenis Penelitian	22

3.2	Rancangan Penelitian	22
3.3	Waktu dan Tempat Penelitian.....	22
	3.3.1 Waktu Penelitian.....	22
	3.3.2 Tempat Penelitian.....	22
3.4	Identifikasi Variabel Penelitian.....	22
	3.4.1 Variabel Bebas.....	22
	3.4.2 Variabel Terikat.....	23
	3.4.3 Variabel Terkendali.....	23
3.5	Sampel Penelitian.....	23
	3.5.1 Subyek Penelitian.....	23
	3.5.2 Kriteria Sampel Penelitian.....	23
	3.5.3 Besar dan Pengelompokkan Sampel Peneliti.....	24
3.6	Definisi Operasional	25
	3.6.1 Osteoarthritis Sendi Temporomandibula.....	25
	3.6.2 Piroksikam.....	25
	3.6.3 Ikan Lemuru dan Minyak Ikan Lemuru.....	25
	3.6.4 Kartilago Sendi Temporomandibula.....	25
3.7	Konversi Penghitungan Dosis.....	26
	3.7.1 Dosis Ketamin.....	26
	3.7.2 Dosis Piroksikam.....	26
	3.7.3 Dosis Minyak Ikan Lemuru.....	27
3.8	Alat dan Bahan Penelitian.....	27
	3.8.1 Alat Penelitian.....	27
	3.8.2 Bahan Penelitian.....	29
3.9	Prosedur Penelitian.....	30
	3.9.1 <i>Ethical Clearance</i>	30
	3.9.2 Persiapan dan Pemeliharaan Hewan Coba.....	30
	3.9.3 Pengelompokkan dan Perlakuan Hewan Coba.....	30
	3.9.4 Persiapan Bahan Perlakuan.....	31
	3.9.5 Prosedur Penelitian.....	33
3.10	Alur Penelitian.....	39
3.11	Analisis Data.....	40
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Hasil Penelitian	41
	4.1.1 Gambaran HPA Kartilago Sendi Temporomandibula.....	41
	4.1.2 Jumlah Sel Kondrosit Kartilago Sendi Temporomandibula.....	44
4.2	Uji Statistik.....	45

4.3 Pembahasan.....	46
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	52
5.2 Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA.....	53
LAMPIRAN.....	60



DAFTAR TABEL

2.1	Faktor Pertumbuhan pada Regenerasi Kartilago.....	13
2.2	Perbandingan Kadar EPA dan DHA Beberapa Minyak Ikan.....	18
3.1	Tahapan Pewarnaan Jaringan.....	37
4.1	Jumlah Sel Kondrosit pada Kelompok K(-), K(+) dan P.....	44
4.2	Hasil Uji Statistik <i>One-Way ANOVA</i>	45
4.3	Hasil Uji LSD Jumlah Kondrosit Kartiago Sendi Temporomandibula	46

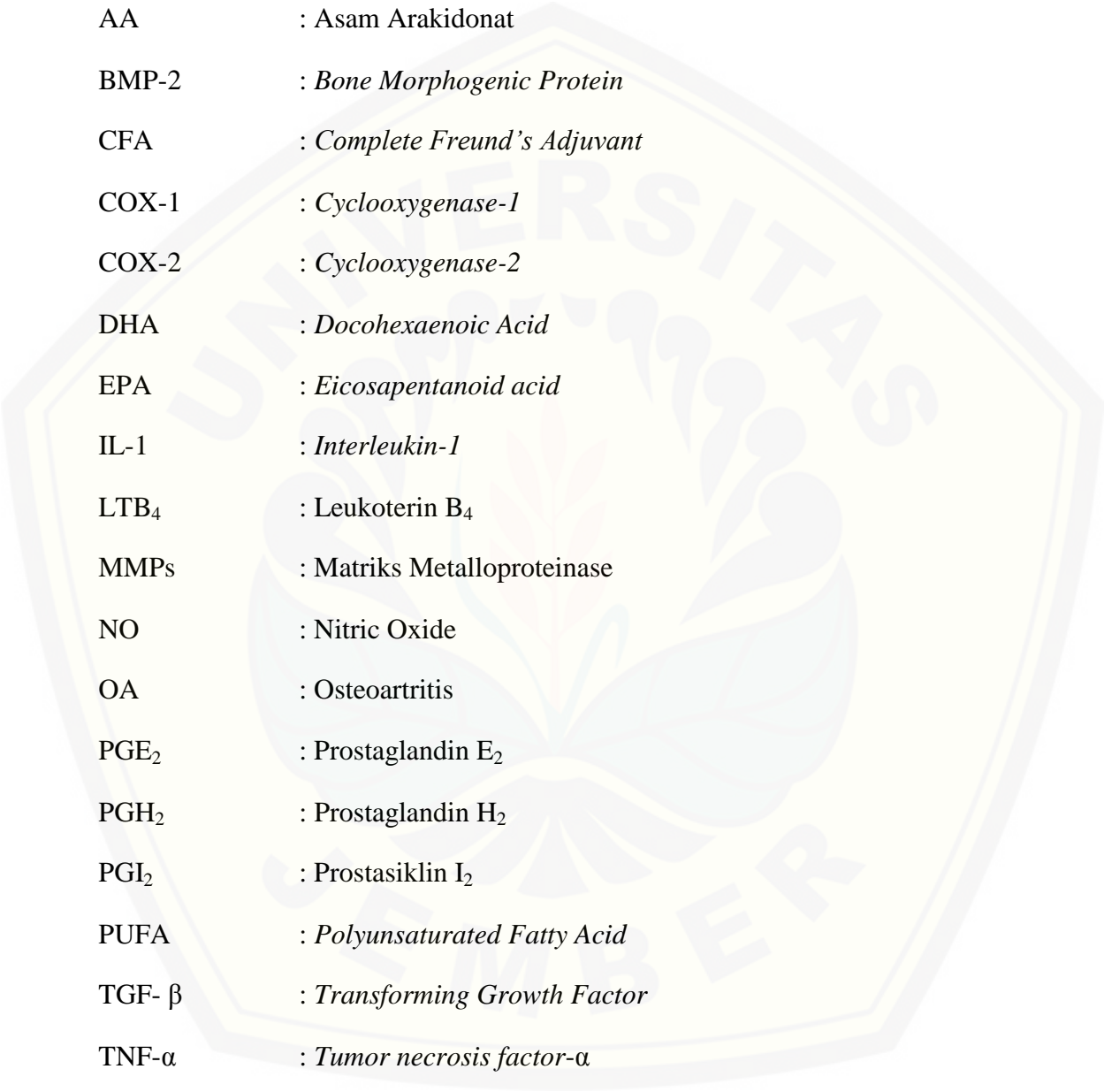
DAFTAR GAMBAR

2.1	Sendi Temporomandibula.....	6
2.2	Zona Arsitektural pada Kartilago Kondilus.....	8
2.3	Sel Kondrosit dan Matriks pada Fibrokartilago.....	9
2.4	Osteoarthritis Sendi Temporomandibula.....	10
2.5	Proses Inflamasi Osteoarthritis Melalui Jalur Siklooksigenase.....	12
2.6	Gambaran Iregular pada Permukaan Kartilago Sendi Temporomandibula setelah 4 Minggu Injeksi CFA.....	15
2.7	Sintesis ω -3 dan ω -6 pada Proses Desaturasi dan Elongasi.....	17
2.8	Metabolisme Oksidatif Asam Arakidonat dan Asam Eikosapentanoid melalui Jalur Siklooksigenase dan 5-Lipoksigenase.....	19
2.9	Kerangka konsep penelitian.....	20
3.1	Zona Penghitungan Jumlah Sel Kondrosit.....	38
3.2	Alur penelitian.....	39
4.1	Pembengkakan dan Kemerahan pada Pipi Tikus Setelah Induksi CFA	41
4.2	Gambaran HPA Kartilago Sendi Temporomandibula Hari Ke-7.....	42
4.3	Gambaran HPA Kartilago Sendi Temporomandibula Hari Ke-14.....	43
4.4	Gambaran HPA Kartilago Sendi Temporomandibula Hari Ke-21.....	43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A. Surat Keterangan Layak Etik Penelitian.....	60
Lampiran B. Surat Ijin Laboratorium Biomedik Farmasi.....	61
Lampiran C. Surat Ijin Laboratorium Kimia Farmasi.....	62
Lampiran D. Surat Ijin Laboratorium Biomedik FKG.....	63
Lampiran E. Data Kasar Hasil Penghitungan Kondrosit.....	64
Lampiran F. Uji Statistik.....	67
Lampiran G. Prosedur Penelitian.....	73
Lampiran H. Alat dan Bahan Penelitian.....	77

DAFTAR SINGKATAN



AA	: Asam Arakidonat
BMP-2	: <i>Bone Morphogenic Protein</i>
CFA	: <i>Complete Freund's Adjuvant</i>
COX-1	: <i>Cyclooxygenase-1</i>
COX-2	: <i>Cyclooxygenase-2</i>
DHA	: <i>Docohexaenoic Acid</i>
EPA	: <i>Eicosapentanoic acid</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
LTB ₄	: Leukoterin B ₄
MMPs	: Matriks Metalloproteinase
NO	: Nitric Oxide
OA	: Osteoarthritis
PGE ₂	: Prostaglandin E ₂
PGH ₂	: Prostaglandin H ₂
PGI ₂	: Prostaglandin I ₂
PUFA	: <i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor</i>
TNF-α	: <i>Tumor necrosis factor-α</i>
TxA ₂	: Tromboksan A ₂

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Osteoarthritis (OA) merupakan gangguan sendi yang paling umum terjadi dimana terdapat kehilangan kartilago artikular secara progresif dan lokasi yang paling sering terkena yaitu tangan, lutut, dan pinggul (Goldring *et al*, 2006). Osteoarthritis disebut juga sebagai penyakit degeneratif sendi dimana prevalensi terjadinya osteoarthritis banyak mengenai orang dewasa dan dapat terjadi pada sendi temporomandibula yaitu mengenai permukaan tulang artikular kondilus, fossa glenoid, atau keduanya. Tanda dan gejala yang timbul berupa rasa sakit, kekakuan, kliking, krepitasi dan terbatasnya pergerakan (Bjornland *et al*, 2007; Yakan *et al*, 2014). Etiologi osteoarthritis sendi temporomandibula masih belum diketahui secara pasti, namun terjadinya osteoarthritis ini berhubungan dengan trauma pada sendi, adanya beban yang berlebihan, penuaan dan infeksi sendi (Ducheyne, 2011; Alcaraz *et al*, 2013). Faktor tersebut memicu terjadinya aktivitas metabolik dan aktivasi proses patologis yang dapat menyebabkan degradasi kartilago (Kuroda *et al*, 2009).

Osteoarthritis terjadi dengan adanya pembentukan prostaglandin E₂ (PGE₂) dan tromboksan A₂ (TxA₂) melalui metabolisme asam arakidonat (AA) pada jalur siklooksigenase (COX). Pembentukan TxA₂ dapat memicu monosit untuk mengeluarkan sitokin proinflamasi untuk merusak kartilago yang ditandai dengan adanya aktivasi matriks metaloproteinase, terhambatnya produksi kolagen dan proteoglikan dan apoptosis sel kondrosit sehingga jumlah sel kondrosit menurun (Cleland *et al*, 2003; Soeroso, 2014). Sel kondrosit inilah yang merupakan komponen utama dalam pembentukan kartilago. Sel kondrosit ini terdapat pada zona matur yang berperan dalam mensintesis kolagen, proteoglikan dan protein non-kolagen dalam membentuk matriks ekstraseluler (Buckwalter *et al*, 2005).

Osteoarthritis dapat diberikan terapi dengan obat-obatan, yaitu salah satunya obat-obatan *Non Steroid Anti Inflamasi Drugs* (NSAID). Piroksikam merupakan obat

anti inflamasi nonsteroid yang memiliki aktivitas anti inflamasi, analgesik dan antipiretik. Piroksikam bekerja dengan menghambat pembentukan prostaglandin (PGE_2), prostasiklin (PGI_2) dan tromboksan (TxA_2) dengan memblok enzim siklooksigenase (COX), baik COX-1 dan COX-2, sehingga mengurangi inflamasi dan rasa sakit (Meek *et al*, 2010). Akan tetapi, penggunaan piroksikam dalam waktu yang lama dapat menimbulkan efek samping, salah satunya pada gastrointestinal.

Untuk meminimalkan efek samping yang timbul, saat ini banyak dikembangkan terapi dengan menggunakan bahan alami seperti minyak ikan lemuru. Ikan lemuru ini banyak terdapat di daerah Muncar, Banyuwangi, Jawa Timur. Minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) mengandung omega-3 PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acid*) yang terdiri atas EPA (*Eicosapentaenoid Acid*) dan DHA (*Docohexaenoic Acid*) (Maulana *et al*, 2014). Ikan lemuru mengandung EPA dan DHA sebesar 13,70% dan 8,91% (Indahyani *et al*, 2008). Kandungan EPA pada minyak ikan dapat menurunkan produksi sitokin proinflamasi (Indahyani, 2003). EPA dan DHA dapat menggantikan AA pada metabolisme siklooksigenase dan membentuk eikosanoid berupa prostaglandin E_3 (PGE_3) dan tromboksan A_3 (TXA_3) yang memiliki efek biologi yang berbeda terhadap eikosanoid AA yaitu bersifat anti inflamasi (Cleland *et al*, 2003). Pada penelitian ini minyak ikan lemuru diberikan selama 7 hari, 14 hari dan 21 hari. Berdasarkan penelitian Indahyani, *et al* (2003) tentang pengaruh diet minyak jagung dan minyak ikan terhadap ekspresi osteoklas periapikal gigi pada tikus, menunjukkan bahwa pemberian minyak ikan selama 7 hari dan 14 hari dapat menurunkan jumlah osteoklas secara signifikan. Penurunan jumlah osteoklas ini menunjukkan bahwa lamanya pemberian minyak ikan dapat menurunkan produksi sitokin proinflamasi sehingga minyak ikan bersifat anti inflamasi.

Osteoarthritis sendi temporomandibula pada hewan coba dapat dilakukan secara *in vivo* dengan cara injeksi *Complete Freund's Adjuvant (CFA)* karena bahan tersebut telah terbukti menunjukkan kemiripan tanda dan gejala arthritis pada manusia seperti perubahan histologis, infiltrasi sel, hipersensitivitas, dan edema pada sendi

yang terkena (Gomes, 2014). Berdasarkan penelitian Robin (2006), terbukti bahwa terdapat tanda-tanda inflamasi berupa kemerahan dan pembengkakan pada sendi temporomandibula pada interval waktu 24-48 jam setelah injeksi CFA. Kondisi artritis pada sendi timbul mulai minggu ke-2 sampai dengan minggu ke-6 setelah injeksi CFA (Zhang *et al*, 2011). Pada hasil trial penelitian menunjukkan bahwa injeksi CFA pada sendi temporomandibula menimbulkan osteoarthritis yang ditandai dengan adanya gambaran iregular pada permukaan sendi pada minggu ke-4.

Berdasarkan uraian di atas, penulis ingin mengetahui bagaimana potensi minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) terhadap jumlah kondrosit kartilago sendi temporomandibula tikus yang mengalami osteoarthritis.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dapat dirumuskan suatu permasalahan yaitu bagaimana potensi minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) terhadap jumlah kondrosit kartilago sendi temporomandibula tikus yang mengalami osteoarthritis.

1.3 Tujuan Penelitian

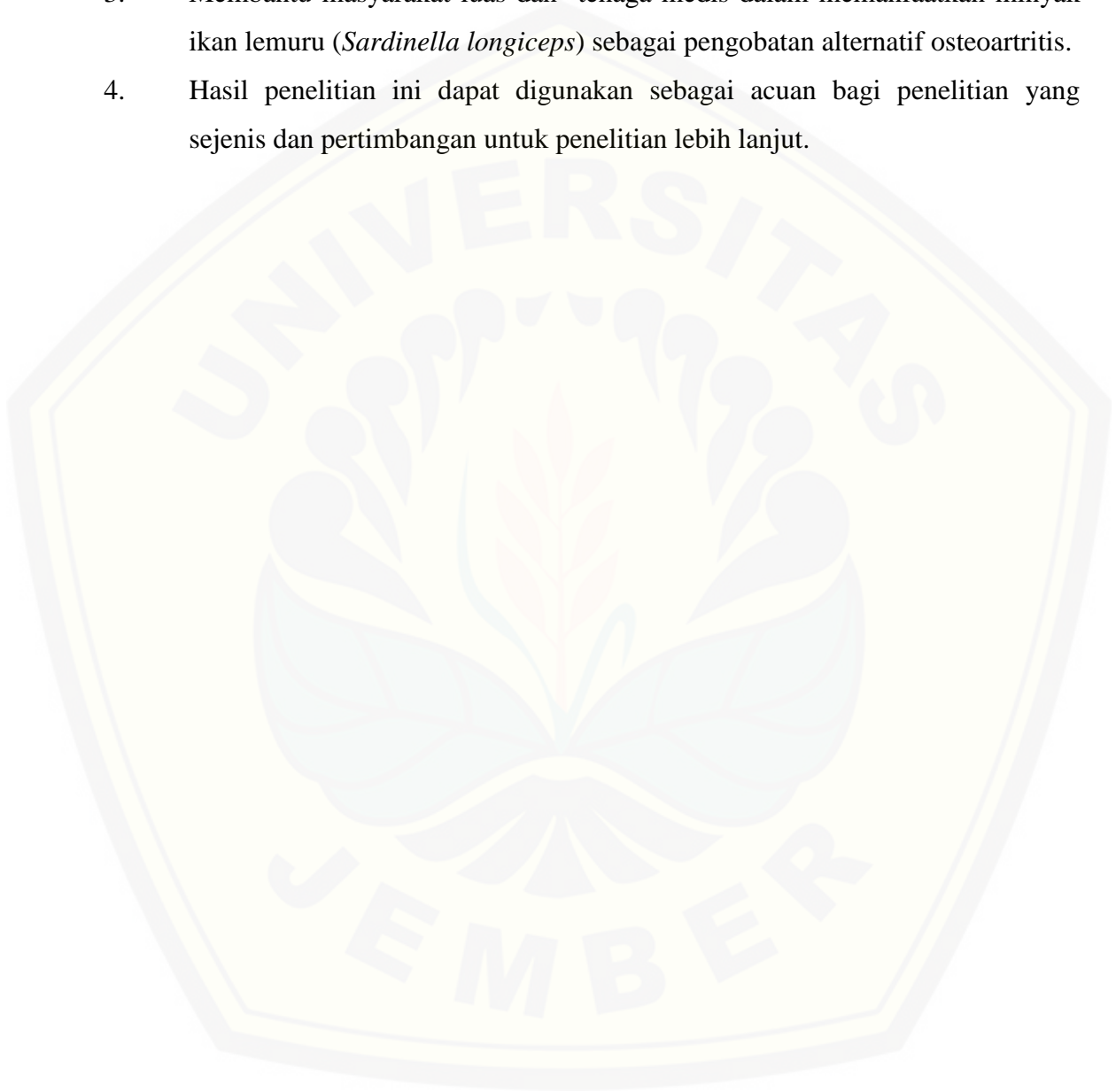
Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) terhadap jumlah kondrosit kartilago sendi temporomandibula tikus yang mengalami osteoarthritis.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memberikan informasi tentang potensi minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) terhadap jumlah kondrosit kartilago sendi temporomandibula tikus yang mengalami osteoarthritis.

2. Memberikan informasi tentang khasiat minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) sebagai anti inflamasi.
3. Membantu masyarakat luas dan tenaga medis dalam memanfaatkan minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) sebagai pengobatan alternatif osteoarthritis.
4. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan bagi penelitian yang sejenis dan pertimbangan untuk penelitian lebih lanjut.

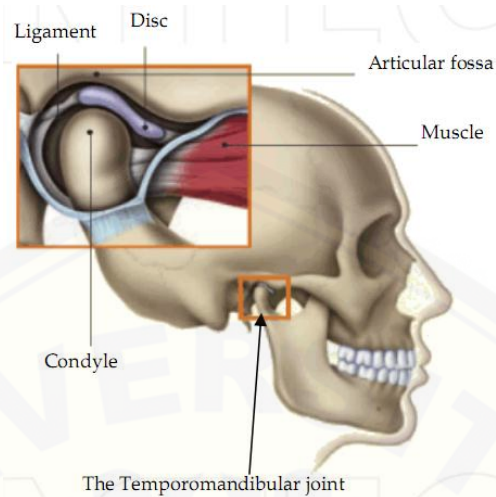


BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sendi Temporomandibula

Sendi temporomandibula merupakan hubungan artikulasi antara kondilus mandibula dan tulang temporal. Sendi temporomandibula membentuk artikulasi bikondilar dan variasi bentuk lonjong mirip dengan artikulasi pada sendi lutut. Keunikan sendi temporomandibula ini terdapat pada permukaan artikular sendi yang dilapisi oleh fibrokartilago daripada kartilago hialin. Sendi ini berperan dalam proses mastikasi dan bicara. Bagian-bagian dari sendi temporomandibula meliputi diskus, tulang, kapsul fibrus, membran sinovial, dan ligamen (Alomar *et al*, 2007; Chen *et al*, 2009).

Kondilus mandibula merupakan komponen artikulasi yang bergerak yang dilapisi oleh fibrokartilago dan merupakan struktur penting pada sendi temporomandibula. Secara struktural, kondilus mandibula tersusun atas tulang kortikal padat dan tulang trabekula (*cancellous bone*). Diantara kondilus mandibula dan tulang temporal dipisahkan oleh diskus artikularis (Chen *et al*, 2009; Williard *et al*, 2011). Diskus artikularis terletak diantara kondilus mandibula dan tulang temporal. Diskus ini berbentuk oval seperti topi yang membagi sendi dalam dua bagian. Permukaan superior diskus berbentuk seperti pelana untuk masuk ke dalam kontur kranium, sedangkan inferior diskus berbentuk bikonkaf yang sesuai dengan kondilus mandibula. Selain itu, sendi ini dikelilingi oleh suatu jaringan tipis yang disebut dengan kapsul fibrus. Kapsul ini memanjang dari permukaan artikular kranial sampai leher mandibula. Sendi temporomandibula juga didukung oleh dua ligamen, yaitu ligamen stylomandibula dan sphenomandibula, yang berperan dalam melindungi sendi selama pembukaan lebar (Isberg, 2003; Alomar *et al*, 2007).



Gambar 2.1. Sendi Temporomandibula.
(Sumber: Ingawale *et al*, 2012).

2.2 Kartilago Sendi Temporomandibula

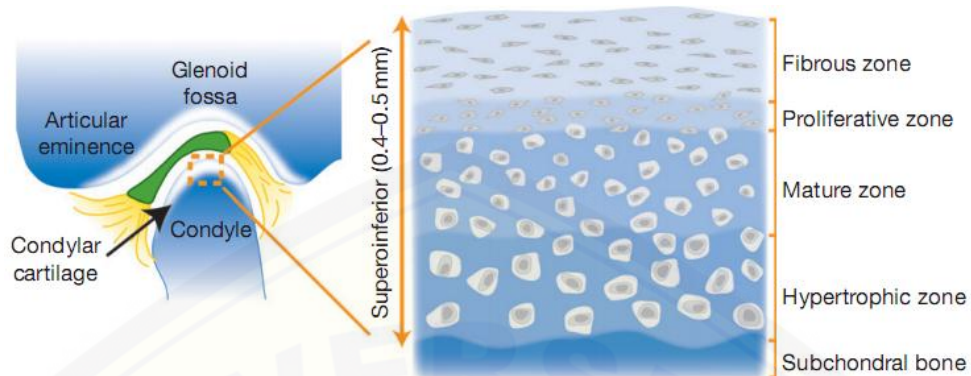
Kartilago merupakan bentuk khusus jaringan ikat yang ditandai dengan suatu matriks ekstrasel (ECM) yang banyak mengandung glikosaminoglikan dan proteoglikan. Kartilago memiliki permukaan yang licin dan lentur sehingga dapat menjadi peredam benturan dan pergeseran bagi sendi. Selain itu, konsistensi matriks ekstrasel (ECM) yang keras dapat menahan stres mekanis. Kartilago pada kondilus mandibula berperan dalam mereduksi beban pada tulang dibawahnya (Kuroda *et al*, 2009; Mescher, 2011).

Kartilago terdiri atas sel kondrosit dan matriks ekstraseluler yang terdiri atas serat dan substansi dasar (Mescher, 2011) serta bersifat avaskuler yaitu tidak memiliki pembuluh darah, pembuluh limfa dan saraf. Kartilago memiliki aktivitas metabolis yang rendah dibandingkan dengan tulang maupun otot (Buckwalter, 2005; Remelia, 2014). Berdasarkan komposisi matriksnya, terdapat tiga bentuk kartilago, yaitu kartilago hialin, kartilago elastis, dan fibrokartilago. Ketiga tulang rawan ini mendapat nutrisi melalui difusi dari kapiler jaringan ikat di dekatnya atau melalui cairan sinovial sendi. Kartilago sendi temporomandibula memiliki perbedaan dengan

kartilago sendi lainnya yaitu permukaan artikular sendi temporomandibula dilapisi oleh fibrokartilago (Alomar, 2007; Mescher, 2011).

Kartilago hialin mengandung serabut kolagen tipe II dan merupakan kartilago yang banyak ditemui di tubuh manusia sedangkan kartilago elastis banyak mengandung serabut elastis dibandingkan dengan serabut kolagen dan biasanya ditemukan pada bagian luar telinga, epiglottis dan laring (Bath-Balogh *et al*, 2011). Fibrokartilago adalah jaringan intermedia antara jaringan ikat padat dan tulang rawan hialin. Berbeda dengan kartilago hialin, fibrokartilago lebih banyak mengandung serabut kolagen tipe I padat sehingga meningkatkan kekuatan dan ketahanan terhadap adanya suatu pergerakan (Herb *et al*, 2006). Jaringan tersebut ditemukan pada diskus intervertebralis, di tempat perlekatan ligamen tertentu dan simfisis pubis.

Secara histologis, kartilago pada kondilus mandibula dibagi menjadi empat zona, yaitu zona fibrus, zona proliferasi, zona matur, dan zona hipertropik (gambar 2.2). Pada zona fibrus, disusun oleh sel-sel fibroblas dengan bentuk pipih dan kolagen tipe I sedangkan pada zona proliferasi terdapat sel-sel mesenkim yang terdistribusi secara heterogen sebagai prekursor kondrosit untuk zona dibawahnya. Zona proliferasi ini berperan sebagai pembatas antara zona fibrus yang merupakan bagian dari fibrokartilago dan kartilago hialin (Kuroda *et al*, 2009; Wang *et al*, 2009). Menurut Williard *et al*. (2011) zona fibrus pada regio fibrokartilago menempati di atas zona proliferasi, dan zona matur serta hipertropik yang berbatasan dengan tulang subkondral, dianggap sebagai kartilago hialin.



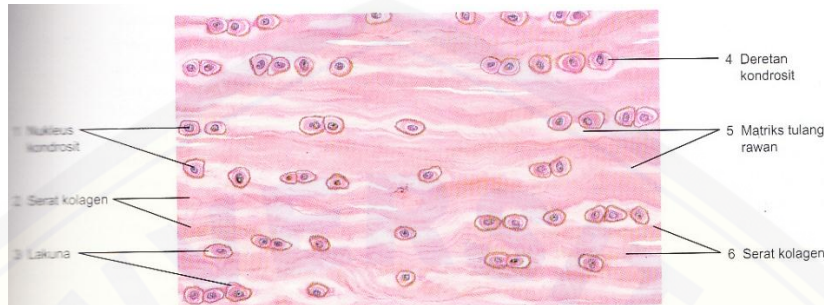
Gambar 2.2. Zona arsitektural pada kartilago kondilus.
(Sumber: Williard *et al*, 2011).

2.3 Sel Kondrosit

Sel kondrosit berasal dari sel mesenkim yang berdiferensiasi menjadi kondroblas. Kemudian, sel ini membelah diri secara mitosis dan mensintesa matriks kartilago serta material ekstraseluler disekitarnya. Kondroblas dikelilingi matriks ekstraseluler dan terjebak dalam suatu ruang yang disebut dengan lakuna. Kondroblas dalam lakuna akan menjadi matur, yang kemudian disebut dengan sel kondrosit. Sel kondrosit merupakan komponen seluler utama kartilago (Eroschenko, 2008).

Sel kondrosit memiliki variasi bentuk, mulai dari bentuk pipih sampai dengan bulat tergantung dari lokasi dimana kondrosit tersebut berada dalam kartilago. Setiap sel kondrosit berada dalam lakuna dan kondrosit memiliki satu atau lebih nukleus yang berbentuk bulat (Eurell *et al*, 2006). Pada zona superfisial, sel kondrosit berukuran kecil dan pipih, sedangkan pada zona tengah lebih berbentuk bulat. Pada zona paling dalam, sel kondrosit berkelompok dan berukuran lebih besar (hipertrofi) (Garcia-Carvajal *et al*, 2013). Sel kondrosit juga ditemukan pada fibrokartilago dan tersebar berderet di dalam matriks. Semua sel kondrosit dan lakuna memiliki ukuran yang serupa, tidak ada gradasi dari kondrosit sentral yang lebih besar menjadi sel-sel perifer yang lebih kecil dan gepeng (Eroschenko, 2008). Sel kondrosit mensintesis kolagen dan matriks lainnya seperti glikoprotein dan proteoglikan dalam jumlah yang

bervariasi (Mescher, 2011; Remelia, 2014). Saat matriks diproduksi, sel-sel di agregat bergerak menjauh dan menempati lakuna yang terpisah (Mescher, 2011).

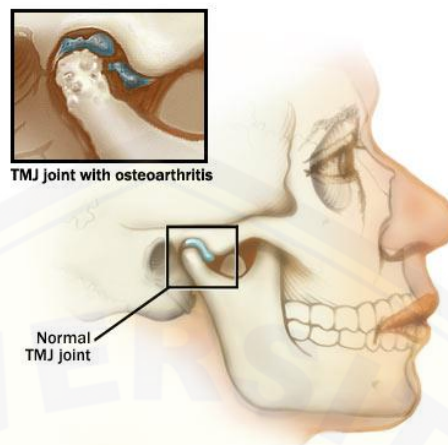


Gambar 2.3. Sel kondrosit dan matriks pada fibrokartilago. Pewarnaan: Hematoksilin dan Eosin. Pembesaran 1000X. (Sumber: Eroschenko, 2008).

2.4 Osteoarthritis Temporomandibula

2.4.1 Definisi dan Etiologi

Osteoarthritis (OA) merupakan penyakit yang biasa mengenai sendi temporomandibula (Bjornland *et al*, 2007). Osteoarthritis banyak mengenai usia menengah sampai usia tua, terutama pada wanita daripada laki-laki. Penyakit osteoarthritis mengenai keseluruhan dari sendi, meliputi kartilago, permukaan sendi, tulang subkondral, pembentukan osteofit, sinovial sendi, dan ligamen (Man *et al*, 2014). Osteoarthritis dikenal sebagai degenerasi sendi yang berasal dari kata *osteon* yaitu tulang, *arthron* yaitu sendi, dan akhiran *-itis* yaitu inflamasi, dimana area yang paling banyak mengalami perubahan adalah kartilago sendi (Israth *et al*, 2014).



Gambar 2.4. Osteoarthritis sendi temporomandibula.

(Sumber: <http://encinotmjmigraine.com/>)

Osteoarthritis sendi temporomandibula merupakan bentuk arthritis yang timbul pada sendi temporomandibula dengan gejala utama yaitu rasa sakit. Selain itu, sering pula timbul krepitasi (suara pada sendi) pada saat proses mastikasi. Tanda klinis meliputi nyeri sendi, krepitasi, perubahan tulang secara radiografi, penyempitan ruang sendi (Souza, 2012). Osteoarthritis pada sendi temporomandibula timbul ketika proses remodeling kartilago artikular terganggu (Ricks *et al*, 2013).

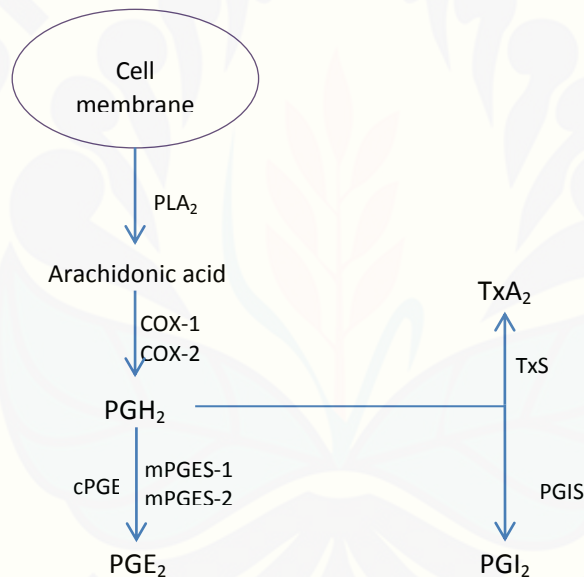
Etiologi arthritis pada sendi temporomandibula merupakan multifaktorial, seperti adanya penyakit poliartikular, meningkatnya usia, deposisi kristal intra-artikular, obesitas, ketidakstabilan sendi, kelemahan otot, neuropati. Dari beberapa faktor tersebut, faktor herediter dan faktor mekanis, penuaan serta infeksi sendi juga ikut berkontribusi dalam berkembangnya osteoarthritis (Goldring *et al*, 2006; Alcaraz *et al*, 2013). Beberapa faktor mekanis yang memicu seperti kelebihan beban (bruxism), ketidakstabilan oklusi (tingginya restorasi) atau trauma (mikrotrauma dan makrotrauma). Hal tersebut menyebabkan disfungsi artikular saat remodeling (Souza, 2012).

2.4.2 Patogenesis dan Respon Inflamasi Osteoarthritis

Sitokin, trauma mekanis, dan perubahan genetik terlibat dalam patogenesis osteoarthritis dan ketiga faktor inilah yang dapat menginisiasi terjadinya degenerasi pada kartilago artikular sehingga mengalami berbagai perubahan. Ketika terdapat faktor pemicu, akan menyebabkan matriks dan kartilago mengalami degenerasi dan setelah beberapa tahun proses regenerasi mengalami penurunan. Kartilago mengalami degradasi secara progresif sehingga terjadi osteoarthritis yang mempengaruhi seluruh struktur sendi, meliputi kartilago, membran sinovial, tulang subkondral, ligamen, dan otot periartikular. Pada akhirnya mengakibatkan inflamasi, rasa sakit, dan kerusakan struktural bahkan sampai kehilangan fungsi (Mahajan *et al*, 2005).

Proses inflamasi pada osteoarthritis terjadi melalui dua jalur yaitu jalur siklooksigenase (COX) dan lipoksigenase (LOX). Pada gambar 2.5 menunjukkan bahwa ketika terjadi kerusakan sel, sel akan melepaskan fosfolipid. Fosfolipid membran sel akan dirubah menjadi asam arakidonat (AA) melalui enzim *phospholipase A₂* (PLA₂) yang kemudian akan ditransformasi melalui jalur siklooksigenase dengan adanya *isoform* (protein) siklooksigenase berupa siklooksigenase-1 (COX-1) dan siklooksigenase-2 (COX-2). Kedua protein ini akan mengubah AA menjadi prostaglandin H₂ (PGH₂) dan selanjutnya akan dirubah menjadi prostaglandin dan tromboksan oleh sintesa-sintesa tertentu, seperti sintesa sitosolik prostaglandin E (cPGES), sintesa mikrosomal prostaglandin E-1 (mPGES-1), sintesa mikrosomal prostaglandin E-2 (mPGES-2), sintesa prostaglandin I (PGIS), dan sintesa tromboksan (TxS). PGH₂ akan disintesa oleh cPGES, mPGES-1, dan mPGES-2 menjadi prostaglandin E₂ (PGE₂). Sedangkan, tromboksan A₂ (TxA₂) akan terbentuk dari perubahan PGH₂ oleh TxS (Korbecki *et al*, 2014). PGE₂ dapat merangsang nosiseptor sehingga timbul rasa nyeri (Panggono *et al*, 2012). Selain itu, TxA₂ yang terbentuk dapat menstimuli monosit untuk melepas sitokin proinflamasi, seperti TNF- α , IL-1, IL-1 β , dan IL-6 yang dapat mempengaruhi sel-sel mesenkim yaitu fibroblas sinovial, kondrosit dan osteoklas.

Sitokin proinflamasi dapat merangsang pembentukan matriks metalloproteinase (MMPs) yang dapat merusak jaringan-jaringan tersebut dan meningkatkan aktivitas osteoklas dalam degradasi kartilago (Choy *et al*, 2001; Cleland *et al*, 2003). Apabila matriks ekstraseluler kartilago mengalami degradasi maka sel kondrosit menjadi rapuh. Rusaknya interaksi antara sel kondrosit dan matriks ini merupakan insiasi terjadinya apoptosis sel kondrosit (Aigner *et al*, 2015). Selain itu, IL-1 juga merangsang produksi NO (*nitric oxide*) yang dapat mempengaruhi kondrosit seperti inhibisi produksi kolagen dan proteoglikan, aktivasi matriks metalloproteinase, dan apoptosis sel kondrosit (Soeroso, 2014).



Gambar 2.5. Proses inflamasi osteoarthritis melalui jalur siklooksigenase. (Sumber: Korbecki *et al*, 2014).

Selain itu pada jalur lipoksigenase, AA yang dibentuk dari membran fosfolipid dirubah menjadi 5-HpETE oleh enzim 5-lipoksigenase dan kemudian dirubah lagi menjadi leukoterin A₄ (LTA₄). LTA₄ kemudian dirubah menjadi LTB₄ oleh enzim LTA₄ hidrolase dan LTC₄ oleh enzim LTC₄ sintesa. LTB₄ berperan sebagai agen kemotaktik dan vasodilatasi pembuluh darah. LTB₄ dapat menginduksi perlekatan neutrofil pada sel endotel pembuluh darah dan merangsang migrasi

neutrofil ke jaringan ekstraseluler untuk melepaskan protease, oksigen reaktif dan matriks metaloproteinase yang dapat merusak jaringan (Smith *et al*, 2002).

Kemampuan kartilago dalam regenerasi dapat dilakukan dengan adanya pengaruh dari faktor pertumbuhan seperti *transforming growth factor (TGF- β)*, *fibroblast growth factor (FGF)*, *insuline-like growth factor (IGF-1)*, *platelet-derived growth factor*, *growth hormone*, dan *coloni stimulating factors (CSFs)* yang mengontrol proliferasi sel dan menginduksi kondrosit untuk mensintesis asam deoksiribonukleat (DNA) dan protein seperti kolagen dan proteoglikan. TGF- β dapat menginduksi kondrogenesis dan merangsang produksi matriks ekstraseluler kartilago (Tuan *et al*, 2013) dengan menekan stromesilin, yaitu enzim yang mendegradasi proteoglikan dan meningkatkan produksi PGE₂. Sedangkan IGF-1 memegang peranan penting dalam proses perbaikan kartilago (Soeroso *et al*, 2014).

Tabel 2.1. Faktor Pertumbuhan pada Regenerasi Kartilago

Faktor Pertumbuhan	Pengaruh pada Kondrosit/Kartilago
BMP-2	Merangsang produksi matriks ekstraseluler Meningkatkan pergantian matriks ekstraseluler Meningkatkan degradasi aggrekan
BMP-7	Merangsang produksi matriks ekstraseluler Menghambat degradasi kartilago dengan menurunkan produksi ILs dan MMPs
FGF-18	Merangsang produksi matriks ekstraseluler pada sendi yang terkena Meningkatkan proliferasi kondrosit
IGF-1	Merangsang produksi matriks ekstraseluler Menurunkan aktivitas katabolisme matriks ekstraseluler
PDGF	Faktor kemotaktik pada sel mesenkim Menekan induksi IL-1 dalam degradasi kartilago
TGF- β 1	Merangsang produksi matriks ekstraseluler Mencegah degradasi kartilago dengan menurunkan produksi IL-1 dan MMPs

BMP = *bone morphogenic protein*, FGF = *fibroblast growth factor*, IGF = *insulin growth factor*, IL = *interleukin*, MMP = *matrix metalloproteinase*, PDGF = *platelet-derived growth factor*, TGF = *transforming growth factor*

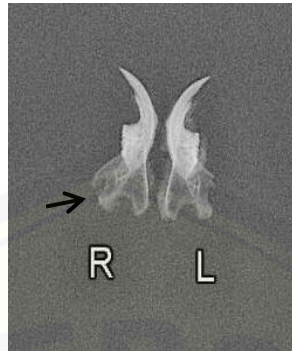
(Sumber: Tuan *et al*, 2013)

2.4.3 Induksi Osteoarthritis pada Hewan Coba

Complete Freund's Adjuvant (CFA) sebagai penginduksi arthritis dengan hewan uji tikus banyak digunakan sebagai model laboratorium dalam berbagai kasus nyeri arthritis (Nagakura *et al*, 2003). CFA terdiri atas *Mycobacterium tuberculosis* yang dilemahkan yang mengandung trehalose 6,6' dimycolate (TDM). Tiap 10 ml CFA mengandung 10 mg *Mycobacterium tuberculosis* yang dimatikan dan dikeringkan, 1,5 ml *Mannide Monooleate* dan 8,5 ml minyak parafin (InvivoGen chemical co.).

Mycobacterium pada CFA dapat menarik makrofag dan sel-sel lain pada area injeksi yang dapat meningkatkan respon imun (Sigma chemical co.). Selain itu, CFA dapat mengaktivasi sel T_H1 yaitu sel inflamatori yang kemungkinan melalui komponen bakteri tersebut meningkatkan produksi IL-12 oleh makrofag. Namun, pemberian CFA dapat memberikan efek pada daerah injeksi yaitu menyebabkan terbentuknya granuloma (Elgert, 2009).

Menurut Zhang, *et al* (2011) injeksi 0,05 ml dari 300 μg *Mycobacterium* pada sendi lutut juga menyebabkan monoarthritis. Kejadian tersebut diketahui melalui observasi klinis dan pengamatan radiografi dimana arthritis mulai terbentuk 2-6 minggu pasca injeksi. Berdasarkan penelitian Robin (2006), terbukti bahwa injeksi 0,08 ml CFA secara intraartikular pada sendi temporomandibula menimbulkan tanda-tanda inflamasi yaitu kemerahan dan pembengkakan pada sendi temporomandibula pada interval waktu 24-48 jam setelah injeksi CFA dan kerusakan kartilago pada minggu ke-6 setelah injeksi CFA. Hal tersebut juga telah dibuktikan pada trial penelitian yang menunjukkan bahwa injeksi CFA pada sendi temporomandibula sebelah kanan menyebabkan osteoarthritis pada minggu ke-4 yang ditandai dengan adanya *irregularity* pada permukaan kartilago sendi (gambar 2.6).



Gambar 2.6. Gambaran iregular pada permukaan sendi temporomandibula setelah 4 minggu injeksi CFA (anak panah) (Sumber: hasil trial penelitian, 2015).

2.4.4 Terapi Osteoarthritis

Terapi pada pasien osteoarthritis bertujuan untuk mengurangi rasa sakit, meningkatkan fungsi sendi dan menurunkan progresifitas penyakit. Terapi osteoarthritis pada umumnya simptomatik, misalnya dengan pengendalian faktor-faktor resiko, latihan fisioterapi, terapi farmakologis, dan terapi bedah (Pratiwi, 2015). Obat anti inflamasi non steroid (NSAID) merupakan salah satu kelompok obat yang banyak diresepkan untuk kasus arthritis. NSAID digolongkan menjadi beberapa kelompok menurut struktur kimia, waktu paruh, dan selektifitas dalam penghambatan COX-1 dan COX-2 (Crofford, 2013).

Piroksikam merupakan salah satu NSAID non selektif dengan struktur yaitu oksikam, derivat asam enolat. Waktu paruh dalam plasma lebih dari 45 jam sehingga dapat diberikan hanya sekali sehari dengan dosis 20 mg. Absorpsi berlangsung cepat di lambung, terikat 99% pada protein plasma dalam waktu 1 jam. Pemberian piroksikam dengan dosis lebih dari 20 mg perhari tidak disarankan karena dapat menimbulkan efek samping pada gastrointestinal (Katzung, 1998; Wilmana *et al*, 2012). Piroksikam bekerja dengan cara menghambat sintesa prostaglandin melalui jalur siklooksigenase. Terdapat dua macam protein siklooksigenase, yaitu COX-1 dan COX-2. COX-1 banyak ditemukan pada jaringan yang sehat yaitu pada gastrointestinal, ginjal dan hati. COX-1 berperan dalam menginduksi sintesa prostaglandin pada fungsi tubuh yang normal, yaitu menurunkan sekresi asam

lambung dan meningkatkan produksi mukus (lendir) sitoprotektif pada saluran pencernaan. Sedangkan, COX-2 banyak ditemukan pada jaringan yang mengalami inflamasi, sehingga apabila kerja COX-2 dihambat maka sintesa sitokin proinflamasi seperti PGE₂, TxA₂ dan PGI₂ pun terhambat, sehingga mengurangi inflamasi dan rasa sakit (Meek *et al*, 2010).

Penggunaan piroksikam dalam waktu yang lama dapat menimbulkan efek samping. Efek samping ini timbul ketika piroksikam menghambat COX-1 maka sintesa prostaglandin dalam menghasilkan mukus sitoprotektif tidak terjadi pada gastrointestinal dan organ lainnya sehingga fungsi fisiologis yang normal dilakukan prostaglandin tidak terjadi, akibatnya timbul suatu efek pada gastrointestinal seperti perdarahan dan terbentuknya ulser (Hertel, 1997; Cho *et al*, 2015).

2.5 Ikan Lemuru

Ikan lemuru disebut juga sebagai ikan pelagis kecil yang kaya akan omega-3 dan tersebar di Samudera Hindia bagian timur yang meliputi bagian selatan Jawa Timur, Bali dan Lombok. Ikan lemuru memiliki panjang 22 cm dengan bentuk tubuh silinder. Lebar badan ikan kurang dari 30% panjang ikan. Ciri lain dari ikan lemuru yaitu adanya titik hitam pada batas belakang penutup insang dan titik keemasan dibelakang celah insang dan garis keemasan pada bagian lateral badan ikan (Mahrus, 2012).

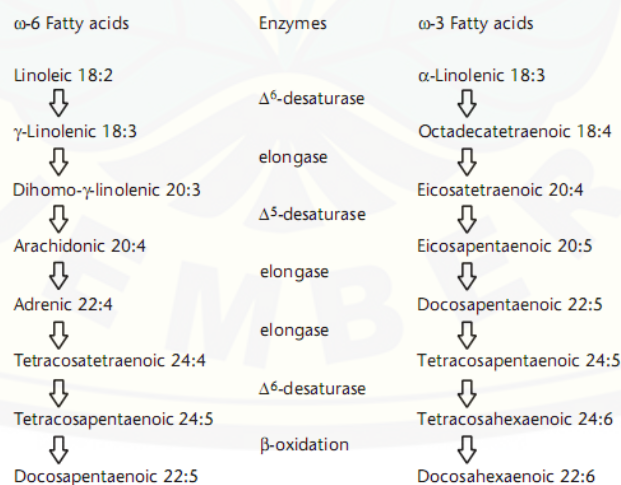
Klasifikasi ikan lemuru secara lengkap menurut Direktorat Jenderal Perikanan (1990) adalah sebagai berikut :

- Kelas : *Pisces*
- Ordo : *Milacopterygii*
- Famili : *Clupeidae*
- Sub famili : *Clupeinai*
- Genus : *Sardinella*
- Species : *S. longiceps*

2.6 Minyak Ikan Lemuru

2.6.1 Kandungan Minyak Ikan Lemuru

Minyak ikan merupakan lemak yang berbentuk cair dan berasal dari ikan. Minyak ikan mempunyai bau dan rasa agak amis, tetapi tidak berbau tengik. Kandungan yang terdapat pada minyak ikan yaitu vitamin A, vitamin D, asam lemak jenuh dan asam lemak tak jenuh (Indahyani *et al*, 2008). Minyak ikan yang berkualitas adalah minyak ikan yang kaya akan asam lemak yang bermanfaat bagi kesehatan. Asam lemak tidak jenuh rantai panjang disebut dengan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA). Pada PUFA, apabila ikatan rangkap pertama terdapat diantara atom karbon ketiga dan keempat, maka disebut dengan omega-3 (ω -3). Sedangkan, apabila ikatan rangkap pertama terdapat diantara atom karbon keenam dan ketujuh maka disebut dengan omega-6 (ω -6). Omega-6 banyak ditemukan pada minyak nabati, sedangkan omega-3 yang banyak ditemukan pada minyak ikan. Omega-6 linoleic acid dirubah melalui proses desaturasi dan elongasi menjadi γ -linoleic acid dan asam arakidonat (AA). Sedangkan, omega-3 dirubah menjadi *eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *docohexaenoic acid* (DHA) (Rustan *et al*, 2005).



Gambar 2.7. Sintesis ω -3 dan ω -6 PUFA pada proses desaturasi dan elongasi.
(Sumber: Rustan *et al*, 2005)

Minyak ikan lemuru mengandung EPA dan DHA paling tinggi dibandingkan minyak ikan lainnya. Ikan lemuru mengandung EPA dan DHA sebesar 13,70% dan 8,91% (Indahyani *et al*, 2008). Pada penelitian Suseno, *et al* (2014), kandungan EPA dan DHA minyak ikan lemuru terbukti paling tinggi dibandingkan dengan minyak ikan tuna dan minyak hati ikan hiu di perairan Indonesia. Kandungan EPA dan DHA bermanfaat dalam penyembuhan gejala keloid, menurunkan kolesterol dalam darah khususnya LDL, anti agregasi platelet, menurunkan resiko serangan jantung, dan sebagai anti inflamasi (Indahyani, 2003; Maulana *et al*, 2014).

Tabel 2.2. Perbandingan Kadar EPA dan DHA Beberapa Minyak Ikan

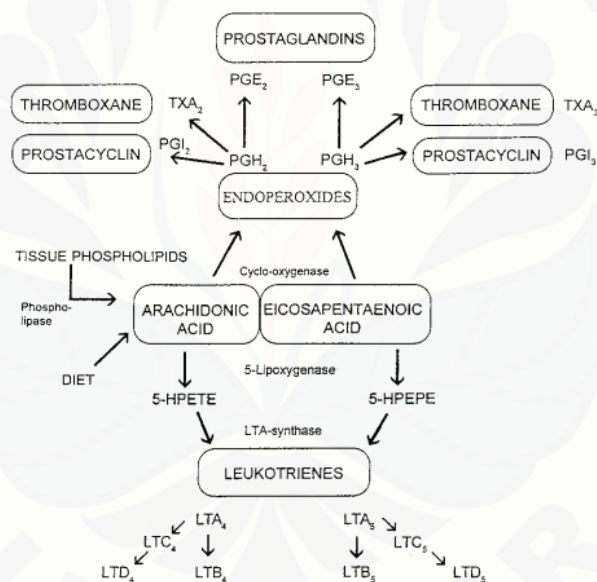
Sumber Minyak Ikan	Total Asam Lemak (%)	
	EPA	DHA
Minyak hati ikan hiu	0,05	0,28
Tuna	0,92	7,81
Lemuru	21,77	11,59
<i>Mackerl</i>	5,7	7
<i>Herring</i>	7,4	6,7
Salmon	12,7	10
Halibut	12,2	25,4
<i>Sand eel</i>	10,9	9,7
<i>Menhaden</i>	10,6	6,4
<i>Capelin</i>	9,9	7,9

(Sumber : Suseno *et al*, 2014)

2.6.2 Peran Minyak Ikan sebagai Anti Inflamasi

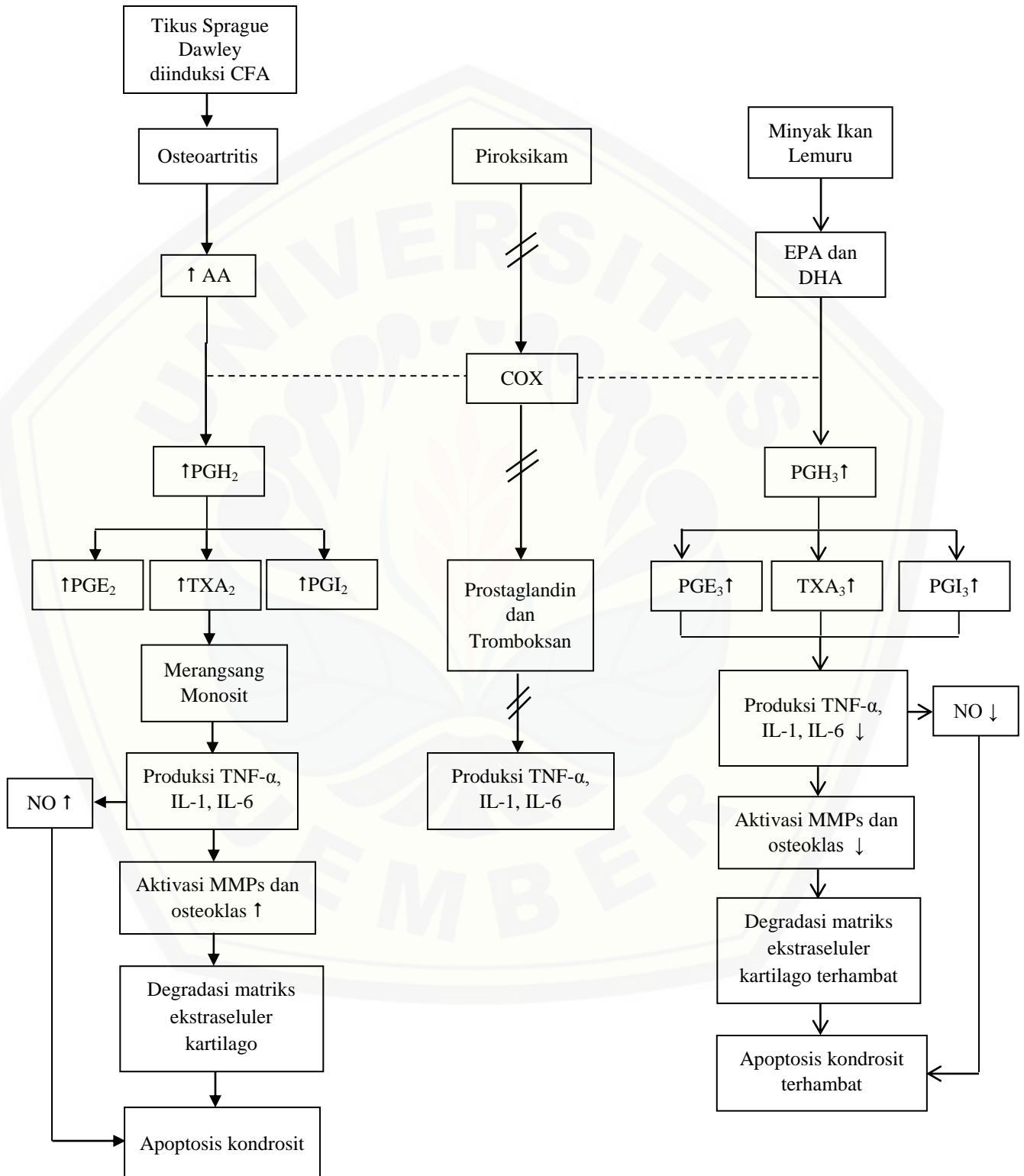
Minyak ikan yang kaya omega-3 PUFA memiliki beberapa efek yang dapat mempengaruhi perubahan pada komposisi asam lemak membran sel. Perubahan komposisi membran dapat mempengaruhi struktur lipid, proses sinyal intraseluler, ekspresi gen, dan produksi mediator lipid (Calder, 2012). EPA memiliki persamaan struktur rantai panjang dengan AA. Oleh karena itu, EPA mampu menjadi substrat kompetitor yang dapat menggantikan AA dalam metabolisme jalur siklooksigenase dan lipoksigenase, sehingga produksi eikosanoid PGE₂ dan LTB₄ berkurang dan meningkatkan eikosanoid yang berasal dari EPA yaitu PGE₃ dan LTB₅. Berkurangnya PGE₂ dan LTB₄ dapat menghambat inflamasi sedangkan eikosanoid

yang berasal dari EPA bersifat anti inflamasi (Indahyani, 2003; Cleland *et al*, 2003). Penggantian AA oleh EPA yang bersifat anti inflamasi menyebabkan terjadinya penurunan produksi sitokin. PGE₃ dan TxA₃ memiliki efek dalam menghambat produksi TNF- α , IL-1 β , dan IL-6. Selain sitokin proinflamasi, EPA dan DHA dapat menurunkan produksi oksigen reaktif dan menurunkan ekspresi adhesi molekul (Indahyani *et al*, 2003; Calder, 2006). Menurut Sakata (2014) EPA bersifat antioksidan, dimana EPA dapat menghambat stres oksidatif yang dapat memicu terjadinya apoptosis sel dan juga menurunkan produksi MMPs yang dapat mendegradasi matriks kartilago.



Gambar 2.8. Metabolisme oksidatif asam arakidonat dan asam eikosapentanoid melalui jalur siklooksigenase dan 5-lipoksigenase. (Sumber: Simopoulos, 2002)

2.7 Kerangka Konsep



2.8 Hipotesa Penelitian

Hipotesa pada penelitian ini yaitu minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) dapat meningkatkan jumlah sel kondrosit kartilago sendi temporomandibula tikus yang mengalami osteoarthritis.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan *eksperimental laboratoris* (Notoatmodjo, 2010).

3.2 Rancangan Penelitian

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

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

3.3.1 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2015 – Mei 2016.

3.3.2 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar FMIPA Universitas Jember, Laboratorium Biomedik dan Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember, dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.4 Identifikasi Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas (Pengaruh)

- a. Lama pemberian minyak ikan lemuru
- b. Asal Ikan Lemuru

3.4.2 Variabel Terikat (Terpengaruh)

Jumlah kondrosit kartilago sendi temporomandibula

3.4.3 Variabel Terkendali

- a. Jenis hewan coba : Tikus *Sprague Dawley*
- b. Berat badan tikus
- c. Umur tikus
- d. Makanan tikus
- e. Tempat dan cara pemeliharaan tikus
- f. Jenis ikan
- g. Konsentrasi minyak ikan lemuru
- h. Dosis minyak ikan lemuru dan larutan salin
- i. Dosis piroksikam
- j. Dosis *Complete Freund's Adjuvant (CFA)*
- k. Metode pemberian salin, piroksikam, dan minyak ikan lemuru
- l. Prosedur pembuatan preparat histologis menggunakan *paraffin embedded tissue*
- m. Metode pewarnaan dengan menggunakan *Hematoxylin Eosin*

3.5 Sampel Penelitian

3.5.1 Subyek penelitian

Populasi penelitian adalah hewan coba tikus jenis *Sprague Dawley* jantan.

3.5.2 Kriteria sampel penelitian

Kriteria sampel yang digunakan dalam penelitian yaitu :

1. Jenis tikus *Sprague Dawley*
2. Kondisi fisik sehat dan tidak mengalami kelainan
3. Jenis kelamin tikus jantan

4. Umur 3 bulan dan berat badan 200-339 gram

3.5.3 Besar dan pengelompokkan sampel penelitian

- a. Besarnya sampel penelitian ditentukan dengan rumus Federer (Maryanto dan Fatimah, 2004) :

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

Keterangan :

n = besar sampel minimal tiap kelompok

t = jumlah kelompok

$$(n-1)(9-1) \geq 15$$

$$(n-1)8 \geq 15$$

$$8n-8 \geq 15$$

$$8n \geq 23$$

$$n \geq 2,875$$

$$n \geq 3$$

Berdasarkan rumus di atas, didapatkan besar sampel minimal sebanyak 3 sampel (pada penelitian menggunakan 4 sampel). Dalam penelitian ini terdapat tiga kelompok yang dibagi menjadi tiga subkelompok dengan jumlah sampel sebesar 4 ekor untuk setiap subkelompok. Sehingga, total sampel yang digunakan dalam penelitian yaitu 36 ekor.

- b. Pengelompokkan Sampel

Pengelompokkan sampel dilakukan dengan menggunakan metode *simple random sampling*, yang artinya setiap anggota populasi memiliki peluang yang sama untuk masuk ke dalam kelompok penelitian (Nurhayati, 2008).

3.6 Definisi Operasional

3.6.1 Osteoarthritis Sendi Temporomandibula

Kondisi osteoarthritis dibuat dengan cara induksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) secara intraartikular pada sendi temporomandibula tikus *Sprague Dawley* jantan sebelah kanan sebanyak satu kali pada hari pertama. Osteoarthritis ditandai dengan adanya *irregularity* pada permukaan kartilago sendi yang terjadi pada minggu ke-4 setelah injeksi CFA.

3.6.2 Piroksikam

Piroksikam merupakan obat anti inflamasi non steroid yang digunakan untuk osteoarthritis (Wilmana *et al*, 2012). Piroksikam yang digunakan pada penelitian yaitu obat generik dengan nama dagang *Piroxicam* dengan bentuk sediaan berupa kapsul (20 mg/kapsul). Piroksikam diberikan satu kali sehari selama 7, 14, dan 21 hari setelah 4 minggu induksi osteoarthritis.

3.6.3 Ikan Lemuru dan Minyak Ikan Lemuru

Ikan lemuru yang digunakan yaitu ikan lemuru yang didapatkan di Muncar, Banyuwangi, Jawa Timur yang kemudian dibuat ekstraknya di Laboratorium Kimia Dasar FMIPA Universitas Jember. Minyak ikan lemuru yang digunakan dalam penelitian ini yaitu minyak ikan yang dihasilkan dari ekstraksi kepala dan daging ikan lemuru melalui proses perebusan. Pemberian minyak ikan lemuru dilakukan selama 7, 14, dan 21 hari setelah 4 minggu induksi osteoarthritis.

3.6.4 Kartilago Sendi Temporomandibula

Sel kondrosit kartilago sendi temporomandibula berbentuk bulat, tersebar berderet di dalam matriks dan inti berwarna ungu dengan pewarnaan HE. Kondrosit diamati dan dihitung jumlahnya di bawah mikroskop cahaya dan *graticulae* (mm²) dengan perbesaran 400X. Kondrosit yang dihitung yaitu kondrosit yang terdapat pada

zona matur yang dibagi menjadi tiga lapang pandang yaitu bagian kiri, tengah, dan kanan kondilus oleh tiga observer.

3.7 Konversi Penghitungan Dosis

3.7.1 Dosis Ketamin

Dosis anestesi ketamin untuk tikus menurut Kusumawati (2004) yaitu 40 mg/KgBB dan berat badan tikus diasumsikan sebesar 300 gram. Maka, dosis yang digunakan adalah $40 \text{ mg/KgBB} \times 0,3 \text{ Kg} = 12 \text{ mg}$. Ketamin yang digunakan adalah ketamin 1000 *anesject* yang mempunyai konsentrasi 50 mg/ml.

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

$$X \text{ ml}$$

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

$$50 \text{ mg} \text{ ml}$$

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

$$\text{ml}$$

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

Sehingga dosis ketamin yang diberikan ke tikus dengan berat badan 300 gram yaitu 12 mg dalam 0,24 ml.

3.7.2 Dosis Piroksikam

Dosis piroksikam yang efektif diberikan pada manusia yaitu 20 mg. Dosis piroksikam pada tikus didapatkan dengan cara mengkalikan dosis piroksikam manusia dengan faktor konversi (0,018) (Laurence *et al*, 1964). Pada tikus dengan berat badan 200 gram, dosis yang diberikan yaitu $20 \text{ mg} \times 0,018 = 0,36 \text{ mg}$. Pada penelitian ini menggunakan piroksikam dengan bentuk sediaan kapsul dimana rata-rata berat bahan dari 10 kapsulnya, yaitu 258,7 mg. Oleh karena itu, dengan rata-rata bahan sebesar 258,7 mg perlu diketahui berapa banyak berat piroksikam dalam 1 mg, yaitu $\frac{20 \text{ mg}}{258,7 \text{ mg}} = 0,077 \text{ mg}$.

$$\frac{20 \text{ mg}}{258,7 \text{ mg}}$$

Pada hasil perhitungan dosis diketahui dosis piroksikam untuk tikus 200 gram yaitu 0,36 mg. Sehingga perlu diketahui berapa banyak berat piroksikam yang dibutuhkan dalam 0,36 mg, yaitu :

$$0,077 \text{ mg} = \frac{0,36 \text{ mg}}{X}$$

$$X = 4,6 \text{ mg piroksikam}$$

Sehingga dosis piroksikam yang diberikan untuk tikus dengan berat badan 200 gram yaitu 0,36 mg dalam berat 4,6 mg piroksikam.

3.7.3 Dosis Minyak Ikan Lemuru

Dosis minyak ikan kemuru yang diberikan pada tikus dengan berat badan 300 gram yaitu 1 ml (Indahyani, 2001). Setiap hari dilakukan penimbangan berat badan tikus untuk menentukan takaran dosis yang tepat sesuai dengan berat badan tikus.

3.8 Alat dan Bahan Penelitian

3.8.1 Alat Penelitian

a. Alat untuk ekstraksi minyak ikan

1. Bak plastik
2. Sentrifuse (*EBA, Germany*)
3. Tabung sentrifuse (*Pyrex, Japan*)
4. Corong pisah (*Duran, Germany*)
5. Kompor
6. Panci

b. Alat untuk perlakuan hewan coba

1. Kandang yang disekat, 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 salin, piroksikam, dan minyak ikan lemuru
 6. Gelas Ukur (*One lab, Indonesia*)
 7. Spuit tuberkulin untuk injeksi CFA
- c. Alat untuk euthanasi dan pengambilan sampel
1. Toples plastic kedap udara (*Lion Star, Indonesia*) Pinset *irurgis (Medica Stainless)*
 2. Gunting bedah (*Dentica*)
 3. Gunting (*SDI, Indonesia*)
 4. Skalpel (*Meiden Stainless, Japan*)
 5. Mata pisau skalpel (*Meiden Stainless, Japan*)
 6. Papan fiksasi
 7. Botol untuk dekalsifikasi
 8. Masker (*J-Spin, Indonesia*)
 9. Sarung tangan (*Senstouch, Indonesia*)
- d. Alat untuk pembuatan dan pewarnaan preparat
1. Alat cetak blok parafin
 2. Pinset
 3. *Cassette tissue* (*Leica*)
 4. Botol untuk dekalsifikasi
 5. Stopwatch (*Diamond, Cina*)
 6. Mikrotom (*Leica RM 2135*)
 7. *Block holder* mikrotom
 8. *Water bath* (*Memmert, Jepang*)
 9. *Slide warmer* (*Sakura, Jepang*)
 10. Oven (*Memmert, Jepang*)

11. Kuas kecil
 12. *Object glass* (Thermo Scientific)
 13. *Deck glass*
 14. Spiritus
 15. Sarung tangan (*Latex*)
 16. Masker
- e. Alat untuk pembacaan preparat
1. Mikroskop cahaya dengan perbesaran 400X (Leica)
 2. *Graticulae* (mm²) yang dibuat dari mika bening dipasang di lensa okuler
 3. Optilab
 4. *Cell Counter*

3.8.2 Bahan Penelitian

- a. Tikus *Sprague Dawley* jantan
- b. Ikan Lemuru
- c. Minyak ikan lemuru
- d. Makanan standar untuk tikus merk Turbo 521-CP, Indonesia dan minuman tikus (Aqua)
- e. *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) (Sigma-Aldrich)
- f. Ketamin (*Ketamine-hameln Injection*)
- g. Piroksikam (*Piroxicam*)
- h. Klorofom (Merck Milliapore)
- i. Larutan *Hematoxylin Eosin* (Gamma Scientific Biolab)
- j. Formalin 10% (Makmur Sejati)
- k. Asam formiat 10% (Makmur Sejati)
- l. Salin (NaCl Otsu 500 ml)
- m. Aquades

- n. Alkohol 70%, 80%, 95%, dan 100% (OneMed dan Aneka Kimia)
- o. *Xylol* (Aneka Kimia)
- p. *Paraffin* (*Merck Paraffin Pastilles Form*)
- q. *Meyer egg albumin*
- r. Entelen

3.9 Prosedur Penelitian

3.9.1 *Ethical Clearence*

Sebelum dilakukan penelitian, hewan coba dan prosedur penelitian dilakukan pengurusan *ethical clearance* di Unit Etika dan Advokasi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada.

3.9.2 Persiapan dan Pemeliharaan Hewan Coba

- a. Memilih tikus putih *Sprague Dawley* jantan secara acak.
- b. Melakukan penimbangan berat badan tikus dengan neraca Ohaus (berat badan tikus 200-339 gram).
- c. Menyiapkan kandang tikus dengan ukuran 30 cm x 30 cm sebanyak 9 buah dan mengadaptasikan tikus tersebut didalam kandang dengan jumlah 4 ekor dalam satu kandang selama 7 hari dan diletakkan di ruang perawatan hewan.

3.9.3 Pengelompokkan dan Perlakuan Hewan Coba

Hewan coba tikus *Sprague Dawley* jantan sebanyak 36 ekor dibagi menjadi tiga kelompok, berikut pembagian kelompok :

- a. Kelompok I, merupakan kelompok kontrol negatif (K(-)) yang terdiri dari 12 ekor hewan coba yang dibagi menjadi 3 subkelompok. Pada kelompok ini hanya dilakukan injeksi CFA 0,08 ml secara intraartikular pada sendi temporomandibula satu kali pada hari pertama dan larutan salin 1

ml/sonde secara sondase lambung. Kemudian subkelompok K(-)7 dikorbankan pada hari ke-7, subkelompok K(-)14 dikorbankan pada hari ke-14, dan subkelompok K(-)21 dikorbankan pada hari ke-21.

- b. Kelompok II, merupakan kelompok kontrol positif (K(+)) yang terdiri dari 12 ekor hewan coba yang dibagi menjadi 3 subkelompok. Pada kelompok ini dilakukan injeksi CFA 0,08 ml secara intraartikular pada sendi temporomandibula satu kali pada hari pertama. Setelah 4 minggu, dilakukan pemberian piroksikam sebanyak 4,6 mg secara sondase lambung 1 kali per hari selama 7 hari, 14 hari, dan 21 hari. Kemudian subkelompok K(+)₇ dikorbankan pada hari ke-7, subkelompok K(+)₁₄ dikorbankan pada hari ke-14, dan subkelompok K(+)₂₁ dikorbankan pada hari ke-21.
- c. Kelompok III, merupakan kelompok perlakuan (P) yang terdiri dari 12 ekor hewan coba yang dibagi menjadi 3 subkelompok. Pada kelompok ini dilakukan injeksi CFA 0,08 ml secara intraartikular pada sendi temporomandibula satu kali pada hari pertama. Setelah 4 minggu, dilakukan pemberian minyak ikan lemuru sebanyak 1 ml secara sondase lambung 1 kali per hari selama 7 hari, 14 hari, dan 21 hari. Kemudian subkelompok P₇ dikorbankan pada hari ke-7, subkelompok P₁₄ dikorbankan pada hari ke-14, dan subkelompok P₂₁ dikorbankan pada hari ke-21.

3.9.4 Persiapan Bahan Perlakuan

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

CFA yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* (1mg/ml, sigma®) sebanyak 0,08 ml dilarutkan dalam larutan salin dengan perbandingan 1:1 (Robin, 2006).

b. Ketamin

Dosis anestesi ketamin untuk tikus yaitu 40 mg/KgBB dan berat badan tikus diasumsikan sebesar 300 gram (Kusumawati, 2004). Pada penelitian menggunakan ketamin dengan konsentrasi 50 mg/ml, sehingga dosis ketamin yang diberikan ke tikus dengan berat badan 300 gram sebesar 0,24 ml.

c. Dosis Piroksikam

Dosis piroksikam yang diberikan yaitu 4,6 mg sondase lambung sebanyak 1 kali perhari. Setiap hari dilakukan penimbangan berat badan tikus untuk menentukan takaran dosis yang tepat sesuai dengan berat badan tikus.

d. Ekstraksi Minyak Ikan Lemuru

1. Ikan lemuru dicuci dengan air sampai bersih, membuang seluruh isi perut ikan dan mencucinya sampai bersih.
2. Ikan lemuru yang sudah bersih dipotong menjadi dua bagian.
3. Merebus bagian kepala dan badan ikan lemuru dengan 10 L aquades sehingga ikan lemuru tenggelam dalam aquades dengan suhu kira-kira 80-90°C sambil diaduk. Proses merebus dihentikan ketika didapatkan minyak ikan dibagian permukaan.
4. Setelah proses merebus, ikan lemuru diangkat dan diperas dengan kain saring untuk mendapatkan minyak ikan.
5. Kemudian hasil saringan dicampur dengan NaCl 5% dalam corong pisah.
6. Minyak ikan yang telah diberi NaCl 5% dalam corong pisah dituang ke dalam tabung sentrifus untuk mendapatkan minyak ikan murni yang

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

7. Setelah disentrifugasi, pada tabung terdapat tiga bagian, yaitu minyak ikan pada bagian atas, molekul lemak pada bagian tengah dan molekul air pada bagian bawah. Kemudian, minyak ikan yang sudah murni dipisahkan dengan molekul lemak dan air ke dalam tabung reaksi.

(Puspitaningrum, 2012)

- e. Dosis Minyak Ikan Lemuru

Dosis minyak ikan lemuru yang diberikan yaitu 1 ml/300 gram berat badan tikus (Indahyani, 2001). Minyak ikan lemuru ini diberikan selama 7 hari, 14 hari, dan 21 hari. Setiap hari dilakukan penimbangan berat badan tikus untuk menentukan takaran dosis yang tepat sesuai dengan berat badan tikus.

3.9.5 Prosedur Penelitian

- a. Pembiusan Sampel

Sebelum diberi perlakuan, seluruh sampel terlebih dahulu dilakukan pembiusan dengan menggunakan ketamin. Dosis yang diberikan adalah 0,24 ml (tikus dengan berat badan 300 gram) yang disuntikan pada daerah kaki belakang sebelah kanan di muskulus triceps.

- b. Penginduksian Osteoarthritis

Osteoarthritis pada tikus diinduksi dengan menginjeksikan *Complete Freund's Adjuvat* (CFA) secara intraartikular pada sendi temporomandibula tikus sebelah kanan. Dosis CFA sebanyak 0,08 ml diberikan satu kali pada hari pertama (Robin, 2006). Tanda inflamasi osteoarthritis terlihat secara klinis pada interval waktu 24-48 jam setelah injeksi CFA. Sedangkan kondisi arthritis terbentuk antara minggu ke-2

sampai minggu ke-6 setelah injeksi CFA (Zhang *et al*, 2011). Pada hasil trial penelitian menunjukkan keadaan osteoarthritis terjadi pada minggu ke-4 yang terlihat adanya permukaan kondilus yang iregular.

c. Aplikasi Pemberian Piroksikam dan Minyak Ikan Lemuru

Pemberian piroksikam pada kelompok kontrol positif dilakukan pada minggu ke-4 setelah injeksi CFA. Dosis piroksikam yang diberikan yaitu 4,6 mg sondase lambung sebanyak satu kali per hari yang disesuaikan dengan berat badan tikus. Sedangkan, pada kelompok perlakuan dilakukan pemberian minyak ikan lemuru pada minggu ke-4 setelah injeksi CFA. Dosis pemberian minyak ikan lemuru adalah 1 ml sondase lambung sebanyak satu kali per hari yang disesuaikan dengan berat badan tikus.

d. Pengambilan Jaringan

Hewan coba baik dari kelompok kontrol maupun perlakuan dieuthanasi pada hari ke-7, 14, dan 21 dengan menggunakan klorofom secara inhalasi. Kemudian dilakukan pengambilan jaringan tikus *Sprague Dawley* pada bagian tulang temporal dan kondilus mandibula sebelah kanan di atas papan fiksasi. Jaringan yang sudah diambil dilakukan fiksasi dengan menggunakan formalin 10% selama 24 jam.

e. Dekalsifikasi Sampel

Sampel yang telah difiksasi menggunakan formalin 10% dilakukan dekalsifikasi dengan larutan asam formiat 10% selama 7-14 hari. Tujuannya adalah untuk melepaskan bahan anorganik selain tulang tanpa merusak protein yang ada. Setelah jaringan lunak, jaringan dibilas dengan aquades kemudian dilakukan fiksasi kembali selama 24 jam.

f. Pemrosesan Jaringan

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

1. Dehidrasi

Dehidrasi adalah proses penarikan molekul air dari potongan jaringan yang akan dipendam dengan cara merendamnya ke larutan Alkohol dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi (Mescher, 2011).

Berikut tahapan dehidrasi :

- (a) Alkohol 70 % selama 15 menit
- (b) Alkohol 80 % selama 1 jam
- (c) Alkohol 95 % selama 2 jam
- (d) Alkohol 95 % selama 1 jam
- (e) Alkohol absolute (100%) selama 1 jam
- (f) Alkohol absolute (100%) selama 1 jam
- (g) Alkohol absolute (100%) selama 1 jam

2. Penjernihan (*Clearing*)

Clearing adalah proses penjernihan potongan jaringan dengan menggunakan bahan penjernih. Jaringan direndam dalam larutan *xylol* sebanyak tiga kali, masing-masing 1 jam satu kali dan 2 jam dua kali.

3. Impregnasi

Setelah *clearing* dilanjutkan dengan impregnasi, yaitu proses infiltrasi bahan parafin dalam jaringan pada suhu 56°-60°C.

Sebelumnya, jaringan diletakkan dalam *cassette tissue* yang sudah diberi label untuk menghindari kekeliruan identitas sampel, kemudian dimasukkan ke dalam parafin cair dengan titik didih 56°-58°C selama 2 jam yang diulang sebanyak 3 kali.

4. *Embedding*

Proses *embedding* adalah penanaman jaringan ke dalam parafin cair 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, diberi label identitas sampel dan ditunggu beberapa menit sampai parafin membeku. Selanjutnya blok parafin sudah siap untuk dipotong (Sudiana, 1993).

5. Penyayatan

Penyayatan blok parafin dilakukan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 mikron. Jaringan di potong dengan arah sagital sehingga terlihat gambaran antero-posterior kondilus dan menunjukkan adanya zona-zona pada kartilago (Harper *et al*, 2001). 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 *meyer egg albumin* sehari sebelumnya agar merekat erat. Preparat yang telah berisi jaringan diletakkan di atas *slide warmer* dengan suhu 30-35°C minimal selama 12 jam. Setelah itu preparat siap untuk dilakukan pewarnaan (Sudiana, 1993; Subowo, 2009).

g. Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Preparat yang akan diwarnai diletakkan pada rak slide (*slide jar*) dan dicelupkan secara berurutan ke dalam beberapa larutan yang dapat dilihat pada tabel 3.1.

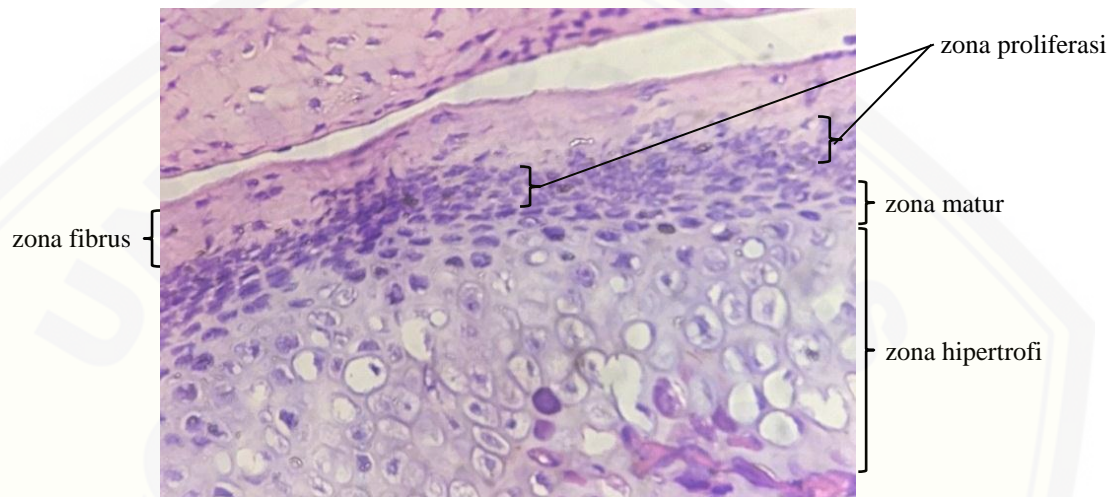
Tabel 3.1. Tahap pewarnaan jaringan

Proses	Larutan	Waktu
Deparafinisasi	Xylol	2-3 menit
	Xylol	2-3 menit
	Alkohol absolut	3 menit
	Alkohol absolut	3 menit
	Alkohol 95%	3 menit
	Alkohol 95%	3 menit
Pengecatan I	Air mengalir	10-15 menit
	Hematoksilin	15 menit
	Air mengalir	20 menit
Pengecatan II	Eosin	2-3 menit
	Alkohol 95%	2-3 menit
	Alkohol 95%	2-3 menit
	Alkohol absolut	2-3 menit
	Alkohol absolut	2-3 menit
Clearing	Xylol	3 menit
	Xylol	3 menit
	Xylol	3 menit
Mounting	Entellan	5 menit

(Sumber : Tim Patologi Anatomi FKG Unej, 2007)

h. Perhitungan Jumlah Sel Kondrosit

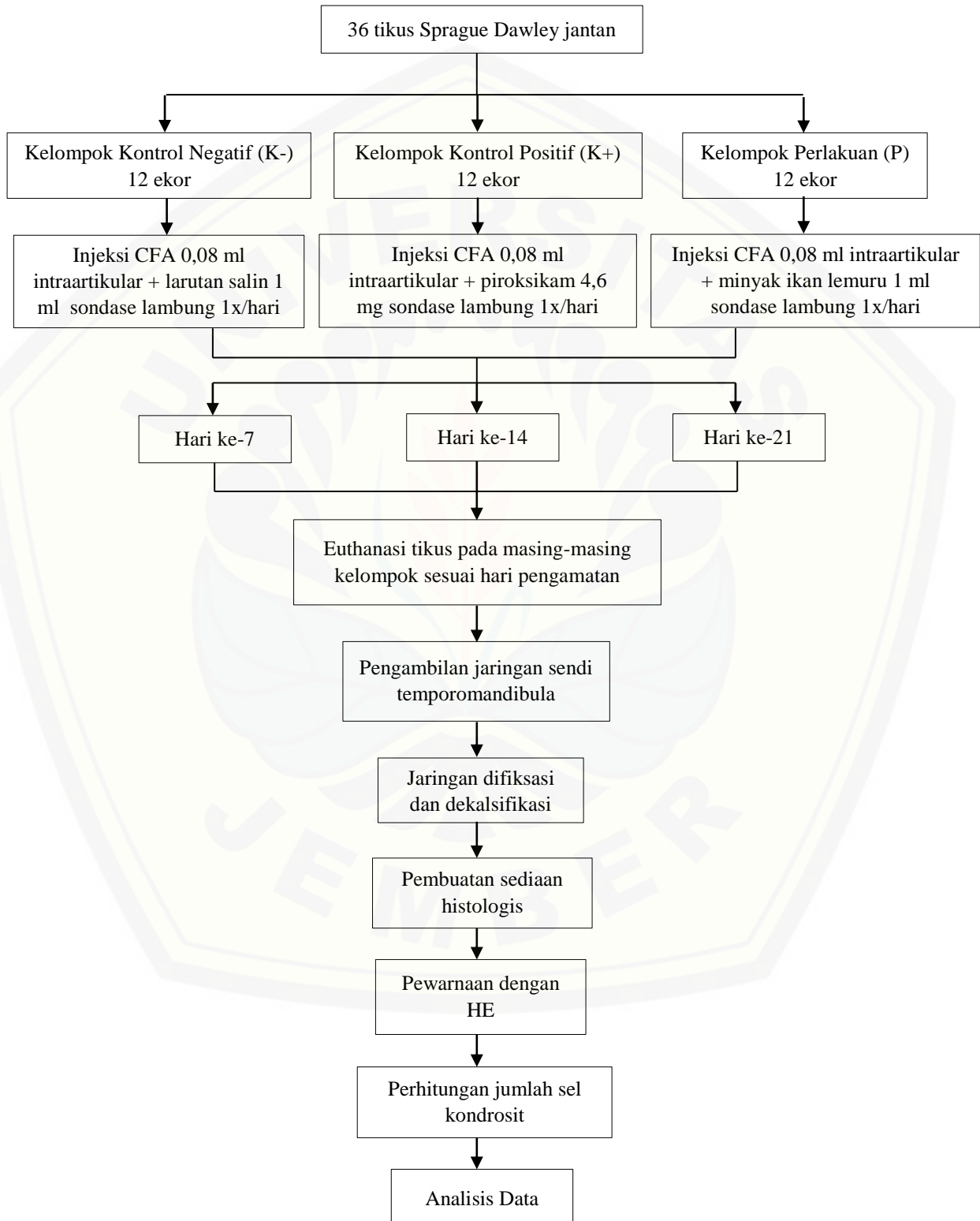
Kondrosit yang dihitung adalah sel kondrosit yang matur yaitu berada pada zona matur, berbentuk bulat, dan inti berwarna ungu (basofilik).



Gambar 3.1. Zona matur sebagai zona perhitungan jumlah sel kondrosit kartilago sendi temporomandibula. (Sumber: hasil trial penelitian, 2015)

Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dan *graticulae* dengan perbesaran 400X dan diamati oleh 3 observer agar mendapatkan hasil yang akurat. Tiap preparat dibaca dengan 3 lapang pandang yaitu pada bagian kiri, tengah, dan kanan kartilago kondilus. Kemudian hasil ketiga lapang pandang setiap pengamat dijumlahkan, setelah itu perhitungan jumlah sel kondrosit dari ketiga pengamat dijumlahkan dan dirata-rata, sehingga didapatkan data jumlah sel kondrosit yang valid.

3.10 Alur Penelitian



3.11 Analisis Data

Penelitian ini menghasilkan data kuantitatif berupa hasil perhitungan jumlah sel kondrosit pada kartilago sendi temporomandibula. Data di uji normalitasnya dengan uji *Kolmogorov-Smirnov*, kemudian diuji homogenitasnya dengan uji *Levene*. Apabila hasil pengujian berdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$) maka pengujian dilanjutkan dengan uji statistik parametrik *One-Way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan antar kelompok. Apabila menunjukkan hasil yang signifikan ($p < 0,05$), maka dilakukan uji *Least Significance Difference (LSD)* yaitu uji lanjutan untuk mengetahui kelompok mana saja yang memiliki perbedaan.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat diambil kesimpulan bahwa minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) dapat menghambat inflamasi sama seperti piroksikam dan kemungkinan dipertimbangkan dapat meningkatkan proliferasi sel kondrosit kartilago sendi temporomandibula tikus yang mengalami osteoarthritis.

5.2 Saran

Saran yang dapat diambil dari penelitian ini yaitu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang mekanisme minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) dalam meningkatkan proliferasi sel kondrosit pada sendi temporomandibula tikus yang mengalami osteoarthritis.

DAFTAR PUSTAKA

- Aigner, T., Nicole, S. 2015. *Rheumatology, 6th edition*. Philadelphia: Elsevier (hal. 1741-1758).
- Akkiraju, H., Anja, N. 2015. Role of Chondrocyte in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration. *Journal of Developmental Biology*. 3: 177-192.
- Alcaraz, M.J., Gualilo, O., Pernaut, S.O. 2013. *Studies on Arthritis and Joint Disorders*. Spain: Humana Press.
- Alomar, Medrano, Cabratosa, Clavero, Lorente, Serra, Monil, dan Salvador. 2007. Anatomy of the Temporomandibular Joint. *Elsevier*. 170-183.
- Bath-Balogh, M., Fehrenbach, M.J. 2011. *Illustrated Dental Embryology, Histology, and Anatomy 3rd edition*. Washington: Elsevier Saunders.
- Bjorland, T., Gjaerum, Moystad. 2007. Osteoarthritis of the Temporomandibular Joint : An Evaluation of the Effects and Complications of Corticosteroid Injection Compared with Injection with Sodium Hyaluronate. *Journal of Oral Rehabilitation*. 34:583-589.
- Blot, L., Marcelis, A., Devogelaer, JP., dan Manicourt, DH.2000. Effects of Diclofenac, Aceclofenac, and Meloxicam on the Metabolism of Proteoglycans and Hyaluronan in Osteoarthritic Human Cartilage. *Journal of Pharmacology*. 131: 1413-1421.
- Bulstra, S.K., Kuijer, R.,Buurman, W.A., Rouwenhorst, E.T., Guelen, P.J.M., dan Linden, A.J. 1992. The Effect of Piroxicam on The Metabolism of Isolated Human Chondrocyte. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 277: 289-296.
- Buckwalter, J.A., Henry, J.M., Alan, J.G. 2005. Articular Cartilage and Osteoarthritis. *AAOS Instructional Course Lectures*. 54: 456-480.
- Calder, P.C. 2006. n-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Inflammation, and Inflammatory Disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 83: 1505S-19S.
- Calder, P.C. 2012. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. *The Journal of Nutrition*. 142(3): 592S-599S.

- Carlo, M.D., Loeser, R.F. 2003. Increased Oxidative Stress with Aging Reduces Chondrocyte Survival. *Arthritis and Rheumatism*. 48(12): 3419-3430.
- Chen, Sorensen, Gupta, Kilts, Young, dan Wadhwa. 2009. Osteoarthritis and Cartilage : Altered Functional Loading Causes Differential Effects In The Subchondral Bone And Condylar Cartilage In The Temporomandibular Joint From Young Mice. *Elsevier*. 17: 354-361.
- Cho, H., Andrew, W., Jeb, W., dan Karen, A.H. 2015. Study of Osteoarthritis Treatment with anti-Inflammatory Drugs: Cyclooxygenase-2 Inhibitor and Steroids. *BioMed Research International*. 1-10.
- Choy, E.H.S., Gabriel S.P. 2001. Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med*. 344(12): 907-916.
- Crofford, L.J. 2013. Use of NSAIDs in Treating Patient with Arthritis. *Arthritis Reasearch and Therapy*. 15(3): 1-10.
- Cleland, J., Michael J. James, dan Susanna, M.P. 2003. The Role of Fish Oils in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *J Drugs*. 63(9): 845-853.
- Ducheyne, P. 2011. *Comprehensive Biomaterials*. Netherlands: Elsevier.
- Elgert, K.D. 2009. *Immunology : Understanding the Immune System 2nd edition*. New Jersey: Wiley-Blackwell (hal.109).
- Eroschenko, V.P. 2008. *diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlation*. China: Lippincolt Williams & Wilkins (hal.74-77).
- Eurell, J.A., Brian L.F. 2006. *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology 6th edition*. Australia: Blackwell.
- Garcia-Carvajal, David, Carmen, Rocio, Cristina, Clemente, dan Javier. 2013. Cartilage Tissue Engineering: The Role of Extracellular Matrix (ECM) and Novel Strategies. *InTech*. 15: 365-398.
- Goldring, S.R., M.B. Goldring. 2006. Clinical Aspect Pathology and Pathophysiology of Osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 6(4): 376-378.
- Gomes, Elisangela, Tatiane, Monique, Carlos, dan Susana. 2014. Effects of One Minute and Ten Minutes of Walking Activity in Rats with Arthritis Induced by Complete Freund's Adjuvant on Pain and Edema Symptoms. *Rev Bras Reumatol*. 54 (2): 83-89.

- Harper, R.P., C.A. Kerins, J.E. McIntosh, R. Spear, dan L.L. Bellinger. 2001. Modulation of the Inflammatory Response in the Rat TMJ with Increasing Doses of Complete Freund's Adjuvant. *Osteoarthritis and Cartilage*. 9:619-624.
- Herb, K., Cho, S., Stiles, M.A. 2006. Temporomandibular Joint Pain and Dysfunction. *Current Pain and Headache Reports*. 10: 408-414.
- Hertel, J. 1997. The Role of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in The Treatment of Acute Soft Tissue Injuries. *Journal of Athletic Training*. 32: 350-358.
- Indahyani, D.E. 2003. Potensi Minyak Ikan dalam Mencegah dan Mengobati Reumatoid Arthritis. *Stomatognati*. I (1): 1-4.
- Indahyani, D.E., Barid, I., Handayani, A.W. 2008. Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) Meregulasi Survival Osteoblas dan Osteoklas, Ekspresi Integrin $\text{Av}\beta 3$ Tulang Alveolaris serta Struktur Gigi pada Tikus yang Mengalami Infeksi Periodontal Selama Masa Odontogenesis. Dipublikasikan. *Laporan Hasil Penelitian*. Jember: Universitas Jember (hal. 2).
- Indahyani, Pudyani, Al-Supartinah, dan Jonarta. 2003. Pengaruh Diet Minyak Jagung dan Minyak Ikan terhadap Ekspresi Osteoklas Periapikal Gigi pada Tikus. *J. Kedokteran Gigi Indonesia*. 10(3): 31-36.
- Indahyani, D.E. 2001. Pengaruh Minyak Ikan terhadap Jumlah dan Aktivitas Osteoklas Tulang Periapikal Tikus yang Terinduksi Infeksi pada Pulpa. Tidak Dipublikasikan. *Tesis*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- Ingawale, S. M., T. Goswami. 2012. *Human Musculoskeletal Biomechanics*. Croatia: InTech (hal.159-160).
- Isberg, A. 2003. *Temporomandibular Joint Dysfunction: A Practitioner's Guide*. Spain: Isis Medical Media (hal.3-5).
- Ishrath, F., Vijaya, K.S. 2014. Osteoarthritis – A Minireview. *International Journal of Pharmacology Research*. 4(1): 6-10.
- Jacobson, J.A., Girish, G., Jiang, Y., Sabb, B.J. Radiographic Evaluation of Arthritis: Degenerative Joint Disease and Variation. *Radiology*. 248(3): 737-747.
- Katzung, B.G. 1998. *Basic and Clinical Pharmacology 7th Edition*. San Francisco: Prentice Hall International (hal.588).

- Kraan, P.M., Berg, W.B. 2011. Chondrocyte Hypertrophy and Osteoarthritis: Role in Initiation and Progression of Cartilage Degeneration?. *Osteoarthritis and Cartilage*. 20: 223-232.
- Korbecki, Irena, Izabela, dan Dariusz. 2014. Cyclooxygenase Pathways. *Acta Biochimica Polonica*. 61(4): 639-649.
- Kuroda, Tanimoto, Izawa, Fujihara, Koolstra, dan Tanaka. 2009. Biomechanical dan Biochemical Characteristic of The Mandibular Condylar Cartilage. *Elsevier*. 17(11): 1408-1415.
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Yogyakarta: Gajah Mada Universiti Press.
- Laurence, D.R., A.L. Bacharach. 1964. *Evaluation of Drug Activities: Pharmacometrics*. London: Academic Press Inc.
- Lotz, M., Hashimoto, K. Kuhn. 1999. Mechanism of Chondrocyte Apoptosis. *Journal of the Osteoarthritis Research Society International*. 7: 389-391.
- Mahajan, A., S. Verma, dan V. Tandon. 2005. Osteoarthritis. *JAPI*. 53: 634-641.
- Mahrus, Sutiman, Nashi, dan Aida. 2012. The Association between Genetic Variations and Omega-3 Production on *Sardinella lemuru* in Lombok Strait. *Journal of Agriculture and Veterinary*. 1(6): 12-16.
- Maldonado, M., Nam, J. 2013. The Role of Changes in Extracellular Matrix of Cartilage in the Presence of Inflammation on the Pathology of Osteoarthritis. *BioMed Research International*. 2013: 1-10.
- Man, G.S., G. Mologhianu. 2014. Osteoarthritis Pathogenesis – A Complex Process that Involves the Entire Joint. *Journal of Medicine and Life*. 7(1): 37-41.
- Maulana, I.T., Sukraso, Sophi, D. 2014. Kandungan Asam Lemak dalam Minyak Ikan Indonesia. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 6 (1): 121-130.
- Meek, I.L., Mart A.F.J., Harald E.V. 2010. Non-Steroidal Anti Inflammatory Drugs: An Overview of Cardiovascular Risks. *Pharmaceuticals*. 3: 2146-2162.
- Mescher, A.L. 2011. *Histologi Dasar JUNQUEIRA : Teks dan Atlas edisi 12*. Jakarta: EGC (hal.114).

- Nagakura, Okada, Kohara, Kiso, Toya, Iwai, Wanibuchi, dan Yamaguchi. 2003. Allodynia and Hyperalgesia in Adjuvant-Induced Arthritic Rats: Time Course of Progression and efficacy of Analgesics. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 306(2): 490-497.
- 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*. 3(1): 19.
- Panggono, Vidyazti, Pratiwi, Rahmad, Dike, dan Prasetyo. 2012. Pemanfaatan Ekstrak Kecubung (*Datura metel*) untuk Mengatasi Nyeri Gigi dan Gingiva. *BIMKGI*. 1(1): 15-18.
- 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.
- Pratiwi, A.I. 2015. Diagnosis and Treatment Osteoarthritis. *J Majority*. 4(4): 10-17.
- Remelia, M. 2014. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Proliferasi dan Diferensiasi MSC (*Mesenchymal Stem Cell*) menjadi Sel Kondrosit untuk Pengembangan Terapi Sel Tulang Rawan. 41(12): 945-947.
- Ricks, Farrell, Falk, Holt, Rees, Carr, Williams, Nichols, Bridgewater, Reynolds, Kooyman, dan Seegmiller . 2013. Osteoarthritis in Temporomandibular Joint of Col2a1 Mutant Mice. *Archives of Oral Biology*. Elsevier.
- Robin, D.M.C. 2006. The Effect of Curcuminoid to the Collagen Fibers Density of Osteoarthritis of Temporomandibular Joint. *The Indonesian Journal Research*. 197-201.
- Rustan, A.C., Christian, A.D. 2005. Fatty Acids: Structures and Properties. *Encyclopedia of Life Science*. 1-7.
- Sakata, Shinya, Takaaki, Kohei, Noriyuki, Shingo, Kenjiro, Nobuaki, Shinsuke, Masahiko, Takeshi, Takayuki, Ryosuke, dan Masahiro. 2014. Oxidative Stress-induced Apoptosis and Mtrix Loss of Chondrocyte is Inhibited by Eicosapentanoid Acid. *Journal of Orthopaedic Research*. 33: 359-365.

- Sandell, L., Thomas, A. 2001. Articular Cartilage and Changes in Arthritis, An Introduction: Cell Biology of Osteoarthritis. *Arthritis Research*. 3(2): 107-113.
- Saputra, D.R. 2016 Pengaruh Pemberian Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) terhadap Densitas Serabut Kolagen Kartilago Sendi Temporomandibula Tikus yang Mengalami Osteoarthritis. Tidak Dipublikasikan. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember (hal.45).
- Sellam, J., Berenbaum, F. 2010. The Role of Synovitis in Pathophysiology and Clinical Symptoms of Osteoarthritis. *Nat.Rev.Rheumatol*. 6: 625-635.
- Simopoulos, A.P. 2002. Omega-3 Fatty Acid in Inflammation Autoimmune Disease. *Journal of the American College of Nutrition*. 21(6): 495-505.
- Smith, W.L., Robert C. Murphy. 2002. The Eicosanoids : Cyclooxygenase, Lipoxygenase, and Epoxygenase Pathways. *Biochemistry of Lipids*. 13: 341-371.
- Soeroso, Isbagio, Kalim, Broto, dan Pramudiyo. 2014. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam (Osteoarthritis), Jilid III edisi VI*. Jakarta: InternaPublishing.
- Sokolove, J., Lepus, C.M. 2013. Role of Inflammation in the Pathogenesis of Osteoarthritis: Latest Findings and Interpretations. *Ther Adv Musculoskel Dis*. 5(2): 77-94.
- Souza, R.F., Lovato, S., Nasser, M., Fedorowicz, Z., dan Al-Muharraqi, M.A. 2012. Interventions For the Management of Temporomandibular Joint Osteoarthritis. *The Cochrane Collaboration*. 4:1-54.
- Subowo. 2009. *Histologi Umum*. Edisi ke-2. Jakarta: CV. Agung Seto.
- Sudiana, I.K. 1993. *Teknik 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. No. (3): 975-990.
- Tuan, R.S., Chen, A.F., Klatt, B.A. 2013. Cartilage Regeneration. *J Am Acad Orthop Surg*. 21(5): 303-311.

- Wang, L., M. Lazebnik, M.S. Detamore. 2009. Hyaline Cartilage Cells Outperform Mandibular Condylar Cartilage Cells in a TMJ Fibrocartilage Tissue Engineering Application. *Elsevier*. 17(3): 346-353.
- Williard, V.P., Zhang, L., Athanasiou. 2011. Tissue Engineering on the Temporomandibular Joint. *Elsevier*. 221-234.
- Wilmana, P.F., Sulistia G. 2012. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5*. Jakarta: Badan Penerbit FKUI (hal.241).
- Yakan, A., Toameh, M. 2014. Treatment of Temporomandibular Joint Osteoarthritis by Using Arthrocentesis and Hyaluronic Acid Injection: Modified Protocol. *Journal of Dental Health, Oral Disorders and Therapy*. 1(5): 1-5.
- Zhang, R., K. Ren. 2011. Animal Models of Inflammatory Pain Neuromethods. *Springer Science*. 49: 23-40.

LAMPIRAN A. Surat Keterangan *Ethical Clearance*

	UNIT ETIKA DAN ADVOKASI
	FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS GADJAH MADA Sekretariat: Fakultas Kedokteran Gigi UGM Jl. Denta Sekip Utara Yogyakarta Telp. 081239447900

KETERANGAN KELAIKAN ETIK PENELITIAN
("ETHICAL CLEARANCE")

No.00784/KKEP/FKG-UGM/EC/2016

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

Judul : **PENGARUH LAMA PEMBERIAN MINYAK IKAN LEMURU (*Sardinella longiceps*) TERHADAP JUMLAH KONDROSIT KARTILAGO SENDI TEMPOROMANDIBULA TIKUS YANG MENGALAMI OSTEOARTRITIS**

Peneliti Utama : Anindya Roshida

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

Unit/Lembaga : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Lokasi Penelitian : 1. Laboratorium Kimia Dasar FMIPA Universitas Jember
2. Laboratorium Biomedik dan Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember
3. Laboratorium Histologi FKG Universitas Jember

Waktu Penelitian : September 2016- Selesai

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

Yogyakarta, 9 September 2016

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

LAMPIRAN B. Surat Ijin Laboratorium Biomedik Farmasi

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

Nomor : 3628/UN25.8/TL/2015
Perihal : Ijin Penelitian

Kepada Yth.
Kepala Laboratorium Biomedik Farmasi
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 penelitian bagi mahasiswa di bawah ini :

1. Nama : Anindya Roshida
2. NIM : 121610101082
3. Tahun Akademik : 2015/2016
4. Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat : Jl. Danau Toba VII No. 222 A Jember
6. Judul Penelitian : Potensi Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella Longiceps*) Terhadap Jumlah Kondrosit Kartilago Sendi Temporomandibula Tikus Yang Diinduksi Osteoarthritis
7. Lokasi Penelitian : Lab. Biomedik Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember
8. Data/Alat yg dipinjam : Neraca ohaus, alat dekaputasi
9. Waktu : Oktober 2015 s/d Selesai
10. Tujuan Penelitian : Untuk Mengetahui Potensi Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella Longiceps*) Terhadap Jumlah Kondrosit Kartilago Sendi Temporomandibula Tikus Yang Diinduksi Osteoarthritis
10. Dosen Pembimbing : 1. drg. Dwi Merry C R, M.Kes
2. drg. Yani Corvianindya, M.KG

Demikian atas perkenan dan kerjasama yang baik disampaikan terima kasih.

Jember, 29 SEP 2015

Dekan
Bantuan Dekan I



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

LAMPIRAN C. Surat Ijin Laboratorium Kimia Farmasi



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

Nomor : 1448/UN25.8.TL/2016
Perihal : Ijin Menimbang Bahan

Kepada Yth.
Kepala Laboratorium Kimia
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 menimbang bahan bagi mahasiswa di bawah ini :

1. Nama : Anindya Roshida
2. NIM : 121610101082
3. Tahun Akademik : 2015/2016
4. Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat : Jl. Danau Toba VII No. 222 A Jember
6. Judul Penelitian : Pengaruh Pemberian Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella Longiceps*) Pada Gambaran Histopalogi Kondrosit Kartilago Sendi Temporomandibula Tikus Yang Mengalami Osteoarthritis
7. Lokasi Penelitian : Lab. Farmakologi FKG Universitas Jember
8. Data/alat yang dipinjam : Timbangan elektrik
9. Waktu : Mei 2016 s/d Selesai
10. Tujuan Penelitian : Untuk Mengetahui Pengaruh Pemberian Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella Longiceps*) Pada Gambaran Histopalogi Kondrosit Kartilago Sendi Temporomandibula Tikus Yang Mengalami Osteoarthritis
11. Dosen Pembimbing : 1. drg. Dwi Merry C R, M.Kes
2. drg. Yani Corvianindya R, M.KG

Demikian atas perkenan dan kerjasama yang baik disampaikan terima kasih.

Jember, 27 APR 2016
anDekan
Pembantu Dekan I

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

LAMPIRAN D. Surat Ijin Laboratorium Biomedik FKG



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

Nomor : 218 /UN25.8.TL/2016
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 : Anindya Roshida
2. NIM : 121610101082
3. Tahun Akademik : 2015/2016
4. Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat : Jl. Danau Toba VIII No. 222 A Jember
6. Judul Penelitian : Pengaruh Pemberian Minyak Ikan Lemuru (Sardinella Longiceps) Terhadap Jumlah Kondrosit Kartilago Sendi Temporomandibula Tikus Yang Mengalami Osteoarthritis
7. Lokasi Penelitian : Lab. Patologi Anatomi FKG Universitas Jember
8. Data/alat yang dipinjam : Oven, mikrotom, waterbath, staining jar
9. Waktu : Januari 2016 s/d Selesai
10. Tujuan Penelitian : Untuk Mengetahui Pengaruh Pemberian Minyak Ikan Lemuru (Sardinella Longiceps) Terhadap Jumlah Kondrosit Kartilago Sendi Temporomandibula Tikus Yang Mengalami Osteoarthritis
11. Dosen Pembimbing : 1. drg. Dwi Merry C R, M.Kes
2. drg. Yani Corvianindya R, M.KG

Demikian atas perkenan dan kerjasama yang baik disampaikan terima kasih.

Jember, 18 JAN 2016
an. Dekan
Pembantu Dekan I

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

LAMPIRAN E. Data Kasar Hasil Penghitungan Kondrosit**Kelompok Kontrol Negatif**

Sub Kelompok	Pengamat	Lapang Pandang			Jumlah	Total	Rata-Rata	Rata-Rata Kelompok			
		1	2	3							
(K-)7.1	I	85	95	91	271	794	264	202			
	II	83	90	84	257						
	III	87	91	88	266						
(K-)7.2	I	72	66	35	173	530	176		202		
	II	70	66	39	175						
	III	69	68	45	182						
(K-)7.3	I	66	70	53	189	572	190			202	
	II	71	65	55	191						
	III	73	68	51	192						
(K-)7.4	I	54	62	69	185	545	181				202
	II	61	58	61	180						
	III	57	60	63	180						
(K-)14.1	I	98	94	95	287	861	297	257			
	II	96	93	92	281						
	III	95	101	97	293						
(K-)14.2	I	86	86	63	235	694	231		257		
	II	85	83	62	230						
	III	85	84	60	229						
(K-)14.3	I	84	90	88	262	789	263			257	
	II	83	90	90	263						
	III	81	92	91	264						
(K-)14.4	I	80	93	61	234	715	238				257
	II	88	91	60	239						
	III	85	92	65	242						
(K-)21.1	I	56	49	46	151	456	152	138			
	II	57	48	49	154						
	III	59	45	47	151						
(K-)21.2	I	53	43	42	138	394	131		138		
	II	51	37	41	129						
	III	52	35	40	127						
(K-)21.3	I	37	60	49	146	444	148			138	
	II	39	57	52	148						
	III	35	59	56	150						
(K-)21.4	I	41	36	42	119	363	121				138
	II	38	40	44	122						
	III	39	42	41	122						

Kelompok Kontrol Positif

Sub Kelompok	Pengamat	Lapang Pandang			Jumlah	Total	Rata-Rata	Rata-Rata Kelompok			
		1	2	3							
(K+)7.1	I	64	54	34	152	470	156	210			
	II	66	48	39	153						
	III	71	59	35	165						
(K+)7.2	I	85	96	64	245	722	240		210		
	II	83	92	61	236						
	III	81	93	67	241						
(K+)7.3	I	57	73	94	224	663	221			210	
	II	64	77	90	231						
	III	52	68	88	208						
(K+)7.4	I	82	72	65	219	675	225				210
	II	96	68	69	233						
	III	90	71	62	223						
(K+)14.1	I	39	28	36	103	307	102	133			
	II	35	31	35	101						
	III	36	35	32	103						
(K+)14.2	I	34	64	37	135	421	140		133		
	II	42	65	35	142						
	III	39	63	42	144						
(K+)14.3	I	41	66	44	151	452	151			133	
	II	40	64	46	150						
	III	41	63	47	151						
(K+)14.4	I	39	53	43	135	411	137				133
	II	44	50	45	139						
	III	41	51	45	137						
(K+)21.1	I	60	45	45	150	445	148	183			
	II	62	42	40	144						
	III	61	41	49	151						
(K+)21.2	I	58	64	58	180	531	177		183		
	II	56	65	55	176						
	III	53	68	54	175						
(K+)21.3	I	82	84	83	249	741	247			183	
	II	81	81	82	244						
	III	79	85	84	248						
(K+)21.4	I	61	51	50	162	477	159				183
	II	59	52	47	158						
	III	51	58	48	157						

Kelompok Perlakuan

Sub Kelompok	Pengamat	Lapang Pandang			Jumlah	Total	Rata-Rata	Rata-Rata Kelompok			
		1	2	3							
P 7.1	I	74	81	77	232	701	233	211			
	II	77	82	75	234						
	III	78	85	72	235						
P 7.2	I	65	76	67	208	623	207		211		
	II	68	73	66	207						
	III	63	83	62	208						
P 7.3	I	77	64	65	206	610	203			211	
	II	75	60	64	199						
	III	82	62	61	205						
P 7.4	I	74	52	82	208	605	201				211
	II	67	56	79	202						
	III	68	47	80	195						
P 14.1	I	109	107	112	328	995	332	305			
	II	105	115	117	337						
	III	106	114	110	330						
P 14.2	I	109	104	105	318	947	315		305		
	II	102	107	108	317						
	III	105	101	106	312						
P 14.3	I	98	102	103	303	905	301			305	
	II	94	104	101	299						
	III	96	100	107	303						
P 14.4	I	92	93	84	269	819	273				305
	II	93	95	85	273						
	III	95	93	89	277						
P 21.1	I	95	76	82	253	766	255	280			
	II	92	78	87	257						
	III	91	82	83	256						
P 21.2	I	87	98	83	268	814	271		280		
	II	96	97	83	276						
	III	95	88	87	270						
P 21.3	I	80	106	103	289	867	289			280	
	II	75	104	104	283						
	III	82	100	113	295						
P 21.4	I	93	102	105	300	915	305				280
	II	97	103	107	307						
	III	95	106	107	308						

LAMPIRAN F. Uji Statistik

Hasil Uji Statistik Kolmogorov-Smirnov dan Anova K(-)7 – K(+)7 – P7

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		JUMLAHKONDROSIT
N		12
Normal Parameters(a,b)	Mean	208,08
	Std. Deviation	30,300
Most Extreme Differences	Absolute	,098
	Positive	,098
	Negative	-,082
Kolmogorov-Smirnov Z		,338
Asymp. Sig. (2-tailed)		1,000

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

JUMLAHKONDROSIT

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,456	2	9	,283

ANOVA

JUMLAHKONDROSIT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	171,167	2	85,583	,078	,926
Within Groups	9927,750	9	1103,083		
Total	10098,917	11			

Hasil Uji Statistik Kolmogorov-Smirnov dan Anova K(-)14 – K(+)14 – P14

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		JUMLAHKONDROSIT
N		12
Normal Parameters(a,b)	Mean	231,67
	Std. Deviation	79,489
Most Extreme Differences	Absolute	,178
	Positive	,178
	Negative	-,163
Kolmogorov-Smirnov Z		,617
Asymp. Sig. (2-tailed)		,840

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

JUMLAHKONDROSIT

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,329	2	9	,728

ANOVA

JUMLAHKONDROSIT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	63612,167	2	31806,083	48,596	,000
Within Groups	5890,500	9	654,500		
Total	69502,667	11			

Hasil Uji Statistik Kolmogorov-Smirnov dan Anova K(-)21 – K(+)21 – P21

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		JUMLAHKONDROSIT
N		12
Normal Parameters(a,b)	Mean	200,25
	Std. Deviation	67,517
Most Extreme Differences	Absolute	,229
	Positive	,229
	Negative	-,172
Kolmogorov-Smirnov Z		,795
Asymp. Sig. (2-tailed)		,553

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

JUMLAHKONDROSIT

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,866	2	9	,210

ANOVA

JUMLAHKONDROSIT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	42165,500	2	21082,750	23,781	,000
Within Groups	7978,750	9	886,528		
Total	50144,250	11			

Hasil Uji Statistik Kolmogorov-Smirnov dan Anova Antar Semua Kelompok

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		HASILKON DROSIT
N		36
Normal Parameters(a,b)	Mean	213,33
	Std. Deviation	62,373
Most Extreme Differences	Absolute	,114
	Positive	,114
	Negative	-,065
Kolmogorov-Smirnov Z		,682
Asymp. Sig. (2-tailed)		,741

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

HASILKON
DROSIT

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,045	8	27	,428

ANOVA

HASILKON
DROSIT

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	112367,000	8	14045,875	15,936	,000
Within Groups	23797,000	27	881,370		
Total	136164,000	35			

Hasil Uji Statistik *Least Significance Differences* (LSD)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: HASILKONDROSIT
LSD

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KN7	KN14	-54,500(*)	20,993	,015	-97,57	-11,43
	KN21	64,750(*)	20,993	,005	21,68	107,82
	KP7	-7,750	20,993	,715	-50,82	35,32
	KP14	70,250(*)	20,993	,002	27,18	113,32
	KP21	20,000	20,993	,349	-23,07	63,07
	P7	-8,250	20,993	,697	-51,32	34,82
	P14	-102,500(*)	20,993	,000	-145,57	-59,43
	P21	-77,250(*)	20,993	,001	-120,32	-34,18
KN14	KN7	54,500(*)	20,993	,015	11,43	97,57
	KN21	119,250(*)	20,993	,000	76,18	162,32
	KP7	46,750(*)	20,993	,034	3,68	89,82
	KP14	124,750(*)	20,993	,000	81,68	167,82
	KP21	74,500(*)	20,993	,001	31,43	117,57
	P7	46,250(*)	20,993	,036	3,18	89,32
	P14	-48,000(*)	20,993	,030	-91,07	-4,93
	P21	-22,750	20,993	,288	-65,82	20,32
KN21	KN7	-64,750(*)	20,993	,005	-107,82	-21,68
	KN14	-119,250(*)	20,993	,000	-162,32	-76,18
	KP7	-72,500(*)	20,993	,002	-115,57	-29,43
	KP14	5,500	20,993	,795	-37,57	48,57
	KP21	-44,750(*)	20,993	,042	-87,82	-1,68
	P7	-73,000(*)	20,993	,002	-116,07	-29,93
	P14	-167,250(*)	20,993	,000	-210,32	-124,18
	P21	-142,000(*)	20,993	,000	-185,07	-98,93
KP7	KN7	7,750	20,993	,715	-35,32	50,82
	KN14	-46,750(*)	20,993	,034	-89,82	-3,68
	KN21	72,500(*)	20,993	,002	29,43	115,57
	KP14	78,000(*)	20,993	,001	34,93	121,07
	KP21	27,750	20,993	,197	-15,32	70,82
	P7	-,500	20,993	,981	-43,57	42,57
	P14	-94,750(*)	20,993	,000	-137,82	-51,68
	P21	-69,500(*)	20,993	,003	-112,57	-26,43

KP14	KN7	-70,250(*)	20,993	,002	-113,32	-27,18
	KN14	-124,750(*)	20,993	,000	-167,82	-81,68
	KN21	-5,500	20,993	,795	-48,57	37,57
	KP7	-78,000(*)	20,993	,001	-121,07	-34,93
	KP21	-50,250(*)	20,993	,024	-93,32	-7,18
	P7	-78,500(*)	20,993	,001	-121,57	-35,43
	P14	-172,750(*)	20,993	,000	-215,82	-129,68
	P21	-147,500(*)	20,993	,000	-190,57	-104,43
KP21	KN7	-20,000	20,993	,349	-63,07	23,07
	KN14	-74,500(*)	20,993	,001	-117,57	-31,43
	KN21	44,750(*)	20,993	,042	1,68	87,82
	KP7	-27,750	20,993	,197	-70,82	15,32
	KP14	50,250(*)	20,993	,024	7,18	93,32
	P7	-28,250	20,993	,190	-71,32	14,82
	P14	-122,500(*)	20,993	,000	-165,57	-79,43
	P21	-97,250(*)	20,993	,000	-140,32	-54,18
P7	KN7	8,250	20,993	,697	-34,82	51,32
	KN14	-46,250(*)	20,993	,036	-89,32	-3,18
	KN21	73,000(*)	20,993	,002	29,93	116,07
	KP7	,500	20,993	,981	-42,57	43,57
	KP14	78,500(*)	20,993	,001	35,43	121,57
	KP21	28,250	20,993	,190	-14,82	71,32
	P14	-94,250(*)	20,993	,000	-137,32	-51,18
	P21	-69,000(*)	20,993	,003	-112,07	-25,93
P14	KN7	102,500(*)	20,993	,000	59,43	145,57
	KN14	48,000(*)	20,993	,030	4,93	91,07
	KN21	167,250(*)	20,993	,000	124,18	210,32
	KP7	94,750(*)	20,993	,000	51,68	137,82
	KP14	172,750(*)	20,993	,000	129,68	215,82
	KP21	122,500(*)	20,993	,000	79,43	165,57
	P7	94,250(*)	20,993	,000	51,18	137,32
	P21	25,250	20,993	,239	-17,82	68,32
P21	KN7	77,250(*)	20,993	,001	34,18	120,32
	KN14	22,750	20,993	,288	-20,32	65,82
	KN21	142,000(*)	20,993	,000	98,93	185,07
	KP7	69,500(*)	20,993	,003	26,43	112,57
	KP14	147,500(*)	20,993	,000	104,43	190,57
	KP21	97,250(*)	20,993	,000	54,18	140,32
	P7	69,000(*)	20,993	,003	25,93	112,07
	P14	-25,250	20,993	,239	-68,32	17,82

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

LAMPIRAN G. Prosedur Penelitian



Kandang pemeliharaan hewan coba



Vibrasi CFA + salin steril



Anastesi ketamin pada hewan coba



Injeksi CFA secara intraartikular sendi temporomandibula sebelah kanan



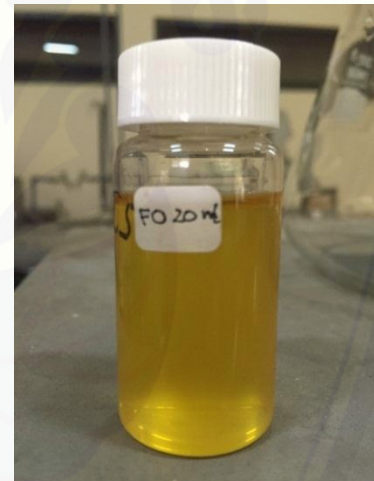
Pemotongan ikan lemuru menjadi 2 bagian



Perebusan ikan lemuru



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



Minyak ikan murni diletakkan
dalam botol bening



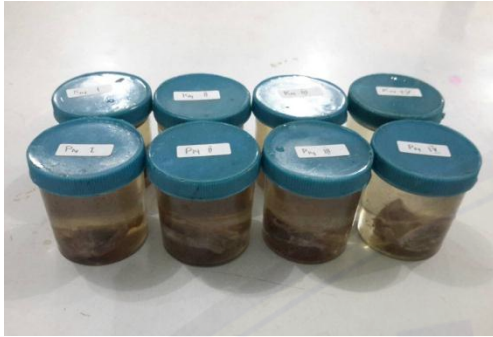
Sondase salin steril



Sondase minyak ikan lemuru



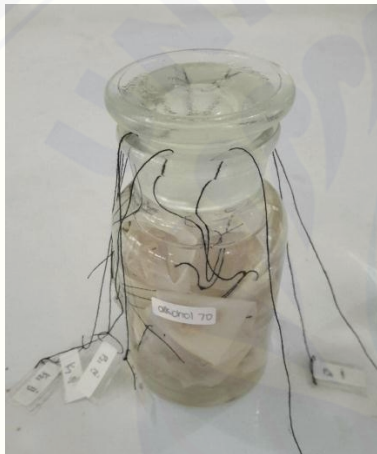
Pengambilan jaringan hewan coba



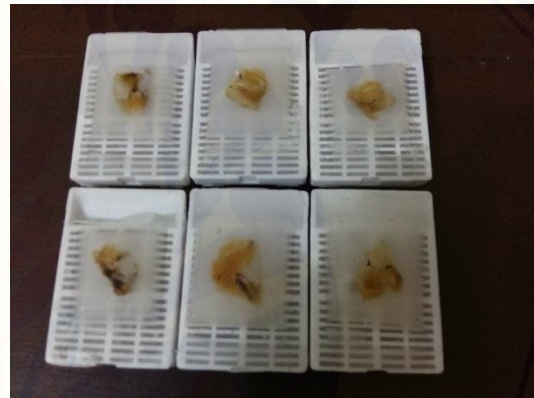
Fiksasi jaringan



Dekalsifikasi jaringan



Dehidrasi jaringan

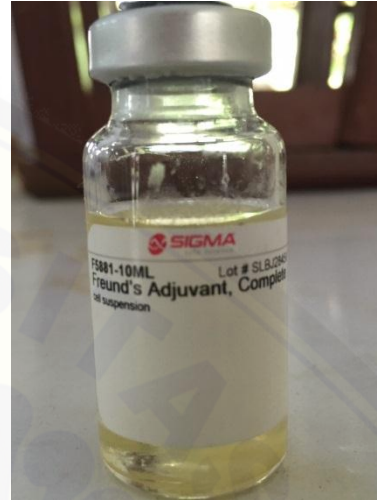


Penanaman jaringan (embedding)

LAMPIRAN H. Alat dan Bahan Penelitian



Ketamin



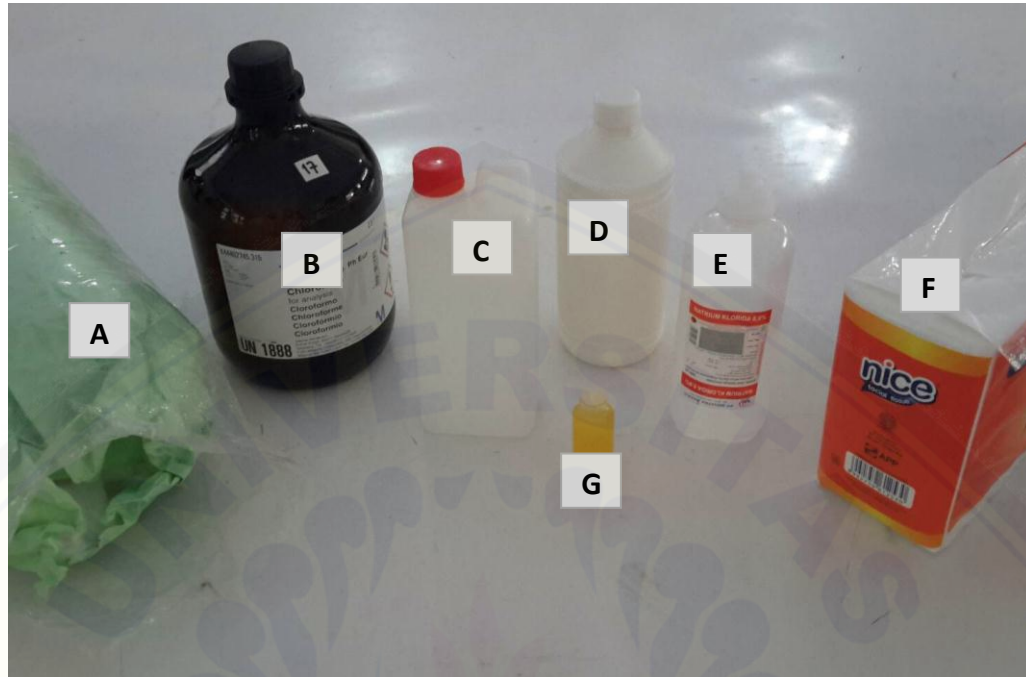
Complete Freund's Adjuvant (CFA)



Sprit tuberkulin



Piroksikam



A.Kapas steril; B. Klorofom; C. Asam formiat 10%; D. Buffer formalin; E. Salin steril; F. Tisu; G. Minyak ikan lemuru



A.Papan fiksasi; B. Gelas ukur; C. Spuit tuberkulin; D. Spuit terumo; E. Gunting bedah; F. Pinset sirurgis; G. Pinset anatomis; H. *Handle* scalpel



Botol dehidrasi dan *clearing*



Mikrotom



Oven



Water bath



Slide Warmer



Pewarna Hematoxylin Eosin (HE)