



**PENGARUH MINYAK IKAN LEMURU (*Sardinella Longiceps*) TERHADAP
EKSPRESI *TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF- α)* KARTILAGO YANG
DIINDUKSI *COMPLETE FREUND'S ADJUVANT***

SKRIPSI

Oleh
Kiki Andari
NIM 122010101021

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



**PENGARUH MINYAK IKAN LEMURU (*Sardinella Longiceps*) TERHADAP
EKSPRESI *TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF- α)* KARTILAGO YANG
DIINDUKSI *COMPLETE FREUND'S ADJUVANT***

SKRIPSI

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

Oleh
Kiki Andari
NIM 122010101021

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

PERSEMBAHAN

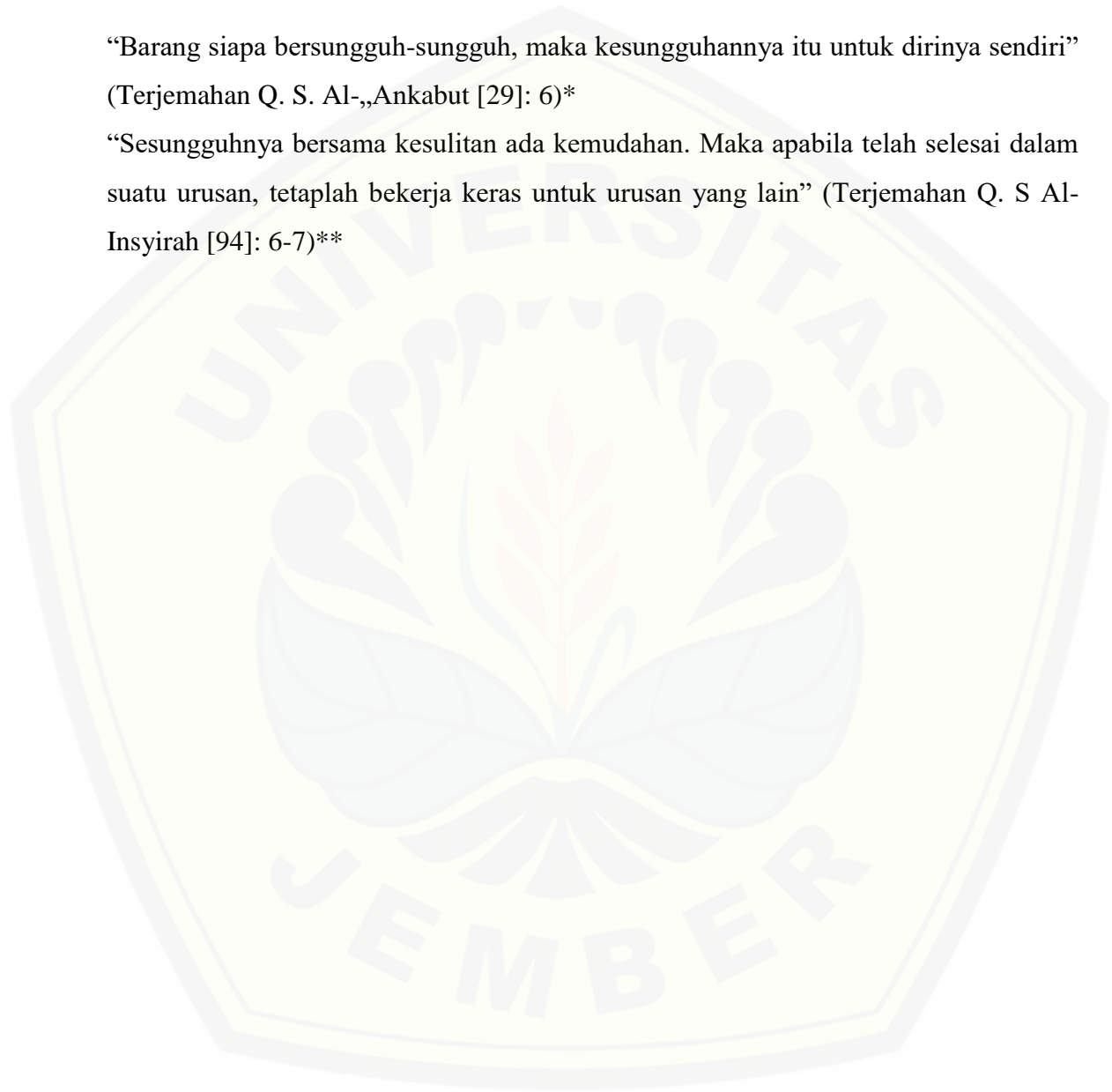
Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Tuhan Yang Maha Esa atas limpahan rahmat-Nya dalam setiap langkah;
2. Ayah Amin Riski Agung dan mama Indi Tri Andari tercinta yang senantiasa memberikan doa, dukungan, bimbingan, kasih sayang tiada henti serta pengorbanan yang telah dilakukan setiap waktu;
3. Guru-guru dari taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi, yang telah memberikan ilmu dan mendidik saya dengan penuh kesabaran untuk menjadikan saya manusia yang berilmu dan bertaqwa;
4. Almamater yang saya banggakan, Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTO

“Barang siapa bersungguh-sungguh, maka kesungguhannya itu untuk dirinya sendiri”
(Terjemahan Q. S. Al-„Ankabut [29]: 6)*

“Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila telah selesai dalam suatu urusan, tetaplah bekerja keras untuk urusan yang lain” (Terjemahan Q. S Al-Insyirah [94]: 6-7)**



*) **) Departemen Agama Republik Indonesia. 2005. Al Qur“an dan Terjemahannya.
Bandung: PT Sygma

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama: Kiki Andari

NIM: 122010101021

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Pengaruh Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella Longiceps*) terhadap Ekspresi *Tumor Necrosis Factor (TNF- α)* Kartilago yang Diinduksi *Complete Freund’s Adjuvant*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali dalam pengutipan substansi yang sudah disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta 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 adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 4 Agustus 2016
yang menyatakan,

Kiki Andari
NIM 122010101021

SKRIPSI

**PENGARUH MINYAK IKAN LEMURU (*Sardinella Longiceps*) TERHADAP
EKSPRESI *TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF- α)* KARTILAGO
YANG DIINDUKSI *COMPLETE FREUND'S ADJUVANT***

Oleh

Kiki Andari

NIM 122010101021

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : dr. Rena Normasari, M. Biomed

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Muhammad Hasan, M. Kes. Sp.OT

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella Longiceps*) terhadap Ekspresi *Tumor Necrosis Factor (TNF-a)* Kartilago yang Diinduksi *Complete Freund’s Adjuvant*” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 4 Agustus 2016

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji,

Penguji I,

dr. Sugiyanta, M.Ked

NIP 19790207 200501 1 001

Penguji II,

dr. Ali Santosa, Sp.PD

NIP 19590904 198701 1 001

Penguji III,

dr. Rena Normasari, M. Biomed

NIP 19830512 200812 2 002

Penguji IV,

dr. Muh. Hasan, M. Kes. Sp.OT

NIP 19690411 199903 1 001

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember

dr. Enny Suswati, M. Kes

NIP 197002141999032001

RINGKASAN

Pengaruh Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella Longiceps*) terhadap Ekspresi Tumor Necrosis Factor (TNF- α) Kartilago yang Diinduksi Complete Freund's Adjuvant ; Kiki Andari, 122010101021; 2016: 60 halaman; Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Osteoarthritis adalah suatu kelainan sendi kronis dimana terjadi proses pelemahan dan disintegrasi dari tulang rawan sendi yang disertai dengan pertumbuhan tulang dan tulang rawan baru pada sendi. Menurut WHO (2010), kejadian osteoarthritis lebih tinggi pada wanita dibandingkan dengan pria di antara semua kelompok umur (wanita 2,95 per 1000 penduduk dan pria 1,71 per 1000).

Pada osteoarthritis, mediator-mediator inflamasi ikut berperan penting dalam progresifitas penyakit. Salah satunya TNF- α yang merupakan sitokin yang disekresikan oleh makrofag. Adanya TNF- α pada sendi dikarenakan induksi CFA yang memicu kerusakan *synovial membrane* sehingga vaskularisasi dan infiltrasi sel-sel meningkat pada sel T CD4+, mengaktivasi makrofag, memproduksi sitokin TNF- α dan terjadi inflamasi. Selain itu, faktor-faktor pro-inflamasi juga terinduksi dan dilepaskan ke dalam rongga sendi, seperti *Nitric Oxide*, IL-1b, dan TNF- α lalu menginduksi kondrosit dengan cara menempel pada reseptor di permukaan kondrosit dan menyebabkan transkripsi gen MMP sehingga produksi enzim meningkat. Akibatnya, sintesis matriks terhambat dan apoptosis sel meningkat.

Ada beberapa para ahli menggunakan alternatif lain sebagai terapi osteoarthritis yaitu dengan menggunakan minyak ikan lemuru. Minyak ikan lemuru memiliki kandungan EPA dan DHA yang dapat menurunkan mediator resorpsi tulang prostaglandin (PGE2) dan sitokin proinflamasi (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α). Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh minyak ikan lemuru terhadap ekspresi TNF- α pada kartilago yang diinduksi oleh CFA.

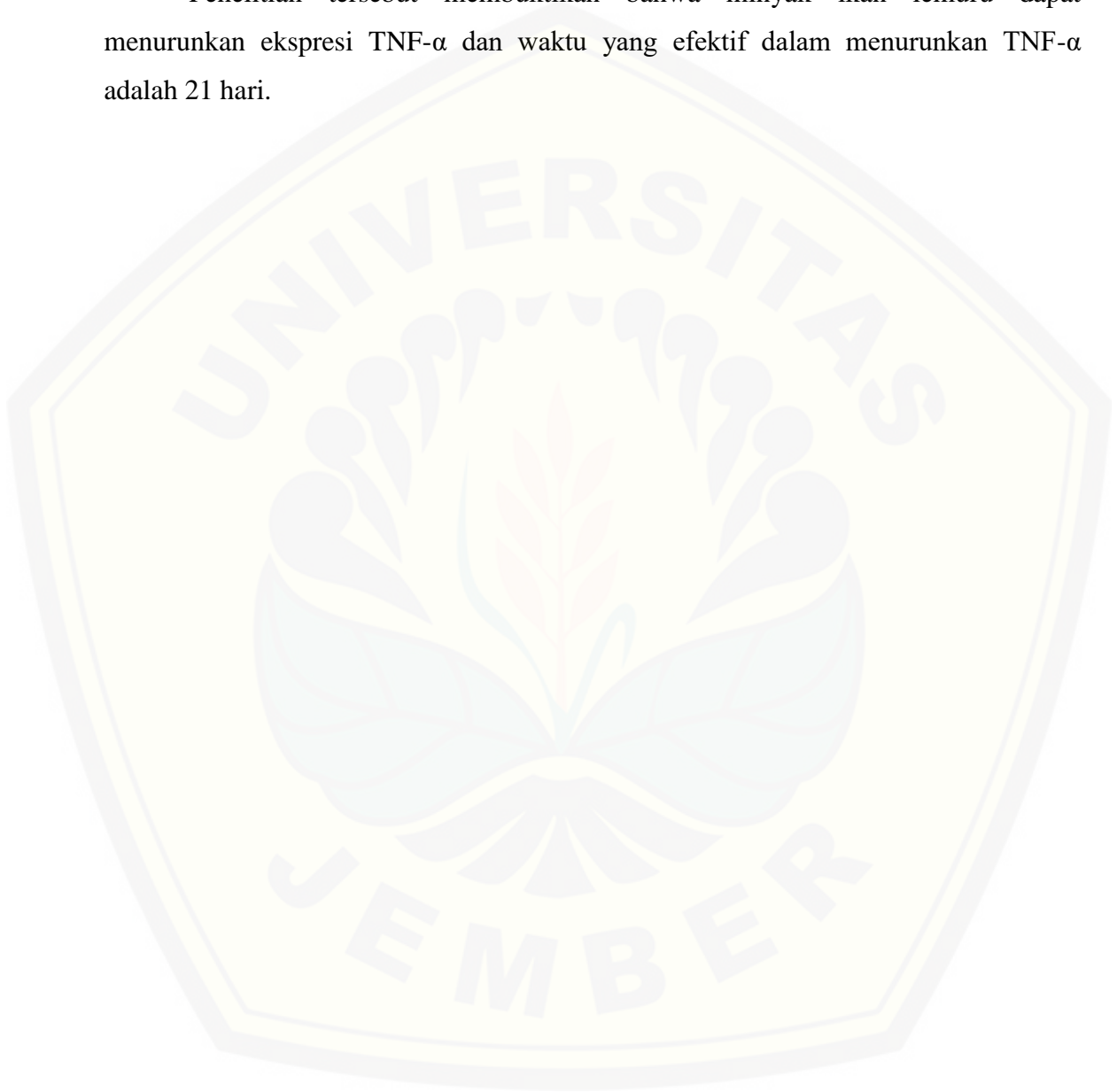
Penelitian ini menggunakan jenis penelitian *True Eksperimental* dengan menggunakan *The Randomized Post Test Only Kontrol Group Design*, dilaksanakan

pada bulan Desember 2015 sampai Mei 2016 di laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, di laboratorium Biokimia dan Parasit Fakultas Kedokteran Universitas Jember serta di laboratorium Patologi Anatomi dan Fisiologi Universitas Brawijaya. Sampel yang digunakan adalah tikus *Sprague Dawley* berwarna putih, jenis kelamin jantan dengan berat 200-300 gram dan berumur 3-5 bulan. Jumlah sampel adalah 24 ekor tikus yang terbagi kedalam 2 kelompok, yaitu: kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok terbagi menjadi 3 sub kelompok berdasarkan lama pemberian minyak ikan lemuru yaitu kelompok 1 diberikan minyak ikan lemuru selama 7 hari, kelompok 2 selama 14 hari dan kelompok 3 selama 21 hari. Pada awalnya, semua kelompok diinduksi CFA dengan dosis 0,08 ml secara intra-artikular pada sendi tibiofemoral kaki kanan. Setelah 6 minggu pasca induksi CFA, kelompok perlakuan di berikan minyak ikan lemuru selama 7, 14 dan 21 hari, lalu di dekapitasi bersamaan dengan kelompok kontrol negatif berdasarkan waktu pemberian minyak ikan lemuru. Selanjutnya pengambilan dan pembuatan preparat jaringan sendi tibiofemoral serta pewarnaan *Imunohistokimia* dan pengamatan ekspresi TNF- α . Ekspresi TNF- α didapatkan dari skor histologi. Variabel bebas pada penelitian ini adalah lama pemberian minyak ikan lemuru dan variabel terikat adalah ekspresi TNF- α .

Data berupa skor histologi ekspresi TNF- α diuji normalitasnya dengan uji *Saphiro Wilk* menunjukkan data terdistribusi normal ($p>0,05$), dilanjutkan dengan uji homogenitas menggunakan *Levene Test* menunjukkan data memiliki varian sama ($p>0,05$) dan diuji *One Way Anova* dengan nilai sig 0,000 yang menunjukkan terdapat perbedaan skor TNF- α yang bermakna pada kelompok yang dibandingkan yaitu antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan dalam tiap waktu 7 hari, 14 hari maupun 21 hari. Selain itu, perbandingan antara kelompok perlakuan dalam setiap waktu, diduga kelompok perlakuan yang diberikan minyak ikan lemuru selama 21 hari yang memiliki skor TNF- α paling kecil dibandingkan pada pemberian minyak ikan lemuru selama 7 hari dan 14 hari. Hal ini dikarenakan semakin lama pemberian minyak ikan lemuru maka akan semakin meningkat kadar EPA dan DHA dalam

jaringan sehingga daya hambat proses inflamasi minyak ikan semakin baik bagi persendian.

Penelitian tersebut membuktikan bahwa minyak ikan lemuru dapat menurunkan ekspresi TNF- α dan waktu yang efektif dalam menurunkan TNF- α adalah 21 hari.



PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Minyak Ikan Lemuru *Sardinella Longiceps* terhadap Ekspresi *Tumor Necrosis Factor (TNF- α)* Kartilago yang Diinduksi *Complete Freund’s Adjuvant*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Roni Prasetyo, selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
3. dr. Rena Normasari, M. Biomed dan dr. Muh. Hasan, M. Kes. Sp.OT selaku dosen pembimbing utama dan anggota yang telah meluangkan waktu, serta memberikan ilmu, tenaga dan dukungan untuk membimbing dan memotivasi saya dalam melakukan penelitian dan menyusun skripsi ini sebaik-baiknya;
4. dr. Sugiyanta, M.Ked. dan dr. Ali Santosa, Sp.PD sebagai dosen penguji yang berkenan memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
5. seluruh staf pengajar dan karyawan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas bimbingan serta bantuannya selama ini;
6. orang tua tercinta, ayah Amin Riski Agung dan mama Indi Tri Andari, adik Adi Kurniawan dan Laila Riska serta adik sepupu, Meidyna Wirdalia yang selalu mendoakan, mendukung dan memberikan semangat hingga saya dapat menyelesaikan pendidikan tinggi ini;

7. sahabat sekaligus rekan kerja terbaikku, Muhammad Nur Arifin, Dwi Riski Saputra atas segala kerja sama, bantuan, semangat, dorongan dan motivasi yang selalu diberikan dalam menyelesaikan penelitian dan skripsi ini;
8. sahabat-sahabat dekatku Siti Sarah Hajar, Ongky Dyah Anggraini, dan Farmitalia Nisa Trisianti yang selalu memberikan motivasi dan masukan yang positif dalam mengerjakan skripsi ini;
9. teman-temanku Putri Rahmawati Yusuf, Sabrina Maharani Pratama, Sanggam Atmajaya Nugraha, Sovira Maris Sabrina, Dzurrotul Athiyat, Galih Putri Wahyuningtiyas, Rosita Sopwi Nur Laily, Imam Adi Nugroho, Hans Kristian Owen, Dimes Atika Permanasari, dan Asyirah Mujahidah Fillah yang telah meluangkan waktunya untuk membantu dalam menyelesaikan skripsi ini;
10. analis Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Agusmurdojohadi Putradjaka A,Md., yang telah banyak membantu dalam penelitian ini;
11. keluarga besar PANACEA FK UJ 2012 yang telah menuliskan berbagai catatan tak terlupakan dalam kesejawatan ini;
12. semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terima kasih atas segala bantuan dan kerjasamanya. Penulis juga menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 4 Agustus 2016

Penulis,

DAFTAR ISI

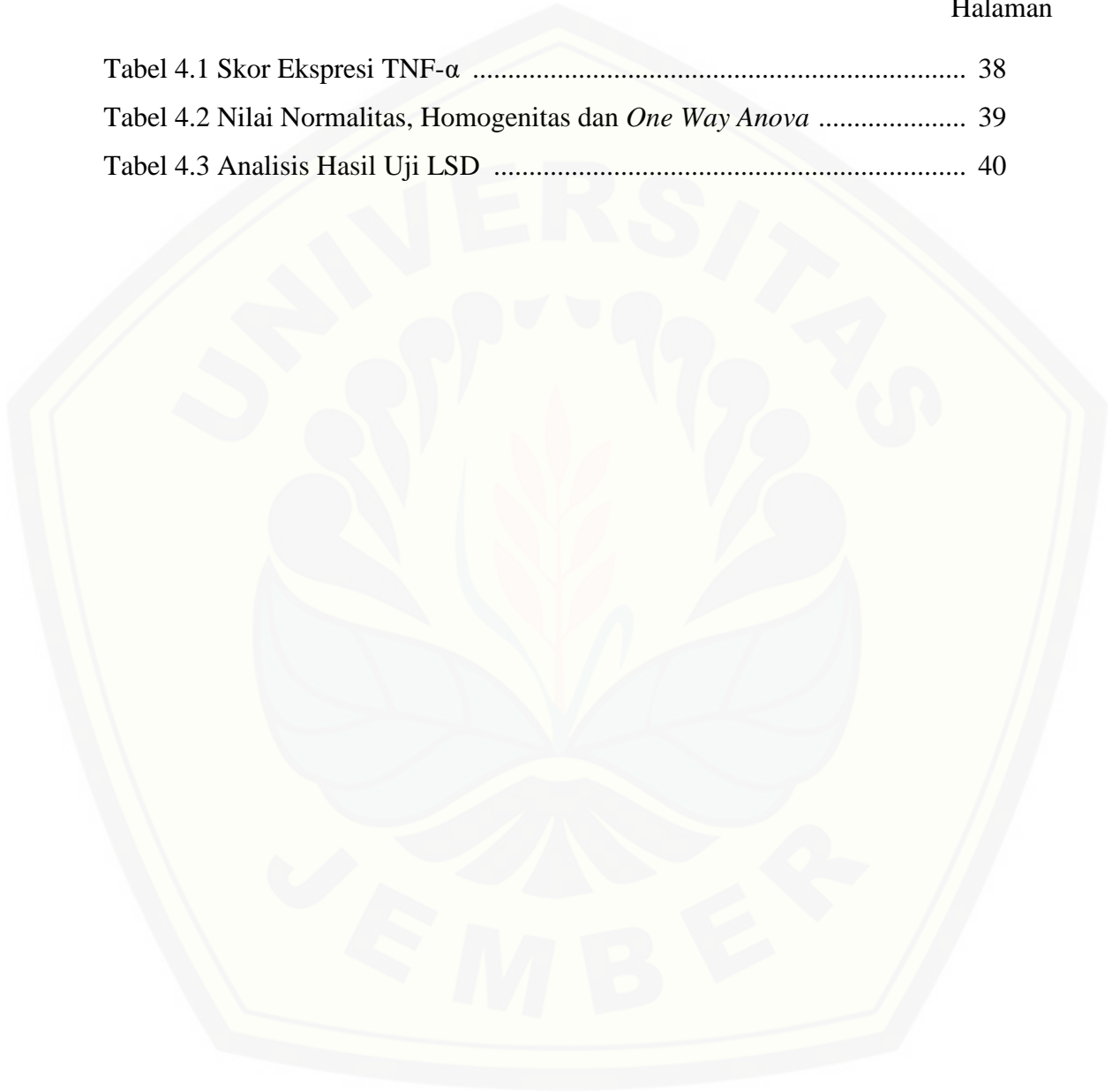
	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN SAMPUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Osteoarthritis	5
2.1.1 Faktor Resiko	5
2.1.2 Patogenesis	7
2.1.3 Manifestasi Klinis	11
2.2 Ikan Lemuru	13
2.2.1 Klasifikasi	13

2.2.2 Manfaat dan Kandungan Minyak Ikan Lemuru	15
2.2.3 Asam Lemak EPA dan DHA	15
2.3 Tumor Necrosis Factor (TNF-α)	16
2.4 Complete Freund's Adjuvant (CFA)	17
2.5 Kerangka Konsep	18
2.6 Hipotesis	20
BAB 3. METODE PENELITIAN	21
3.1 Jenis Penelitian	21
3.2 Rancangan Penelitian	21
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	22
3.3.1 Tempat Penelitian	22
3.3.2 Waktu Penelitian	23
3.4 Populasi, Sampel dan Besar Sampel	23
3.4.1 Populasi Penelitian	23
3.4.2 Sampel Penelitian	23
3.4.3 Besar Sampel Penelitian	23
3.5 Variabel Penelitian	24
3.5.1 Variabel Bebas	24
3.5.2 Variabel Terikat	24
3.5.3 Variabel Terkendali	25
3.6 Definisi Operasional	25
3.6.1 Osteoarthritis	25
3.6.2 Minyak Ikan Lemuru	26
3.6.3 <i>Tumor Necrosis Factor</i> (TNF- α)	26
3.7 Dosis Ketamin, Minyak Ikan Lemuru dan CFA	26
3.8 Alat dan Bahan Penelitian	27
3.8.1 Pembuatan Minyak Ikan Lemuru	27
3.8.2 Perawatan dan Perlakuan Hewan Coba	27
3.8.3 Dekapitasi dan Pengambilan Sampel	27

3.8.4 Pembuatan dan Pewarnaan Preparat	27
3.9 Prosedur Penelitian	28
3.9.1 <i>Ethical Clearence</i>	28
3.9.2 Persiapan Sampel Penelitian.....	28
3.9.3 Pembuatan Minyak Ikan Lemuru	28
3.9.4 Perlakuan pada Hewan Coba Selama Penelitian	29
3.9.5 Pembuatan Preparat Histopatologi	30
3.9.5.1 Proses Pemotongan Jaringan berupa Makross.....	30
3.9.5.2 Proses Pengeblokan dan Pemotongan Jaringan	30
3.9.5.3 Proses Deparafinisasi	31
3.9.6 Pewarnaan Imunohistokimia	31
3.9.7 Pengamatan Histopatologi	32
3.10 Analisis Data	34
3.11 Alur Penelitian	35
BAB 4. HASIL dan PEMBAHASAN	36
4.1 Hasil	36
4.2 Analisis Data	39
4.3 Tempat dan Waktu Penelitian.....	40
BAB 5. PENUTUP	44
5.1 Kesimpulan	44
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN A	50
LAMPIRAN B	52
LAMPIRAN C	54
LAMPIRAN D	58

DAFTAR TABEL

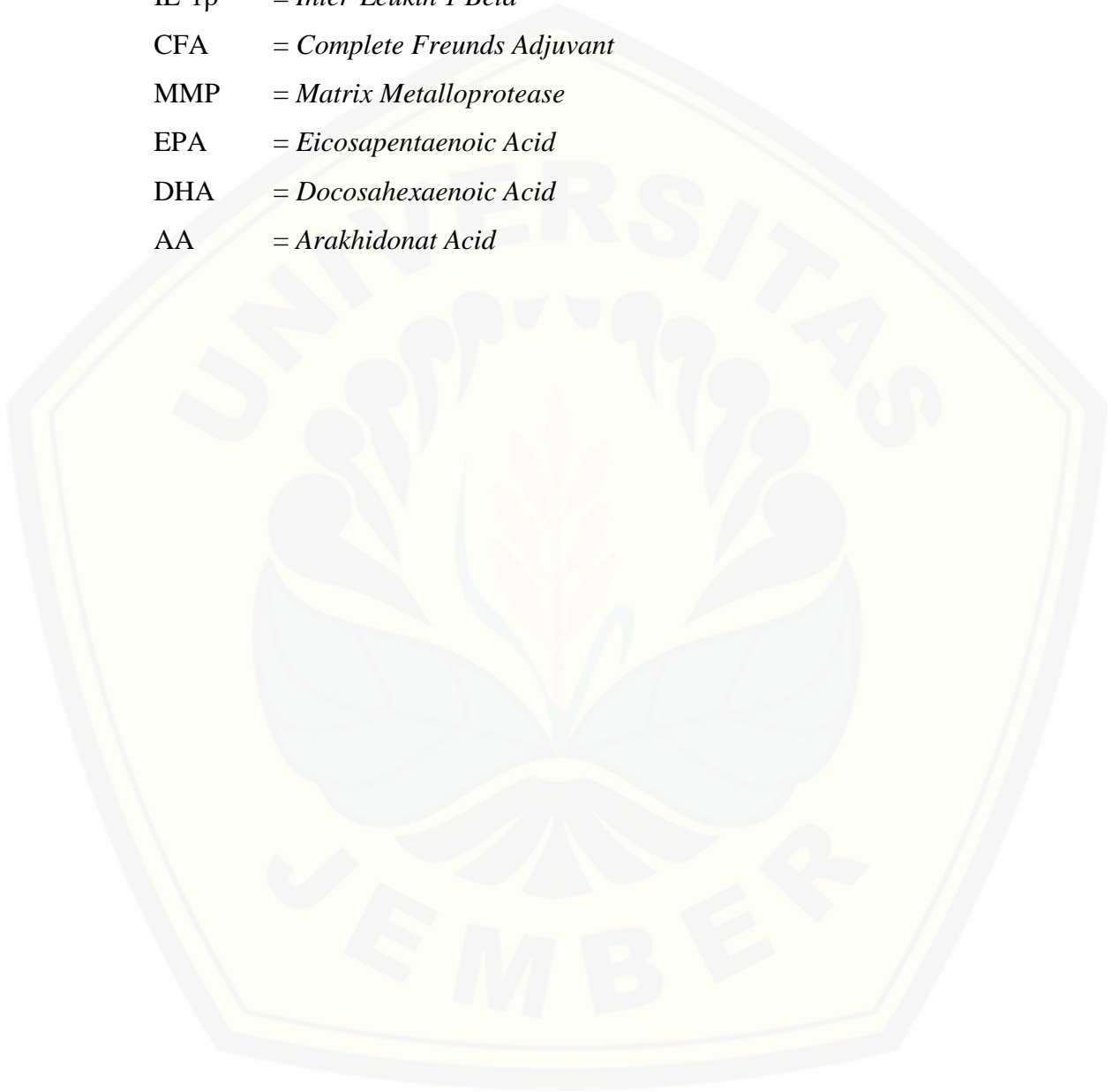
	Halaman
Tabel 4.1 Skor Ekspresi TNF- α	38
Tabel 4.2 Nilai Normalitas, Homogenitas dan <i>One Way Anova</i>	39
Tabel 4.3 Analisis Hasil Uji LSD	40



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Skema Patogenesis Osteoarthritis	8
Gambar 2.2 Ikan Lemuru (<i>Sardinella Longiceps</i>)	14
Gambar 2.3 Mekanisme Terjadinya Inflamasi yang diinduksi CFA	18
Gambar 2.4 Skema Kerangka Konsep Penelitian	19
Gambar 3.1 Skema Rancangan Penelitian	21
Gambar 3.2 Injeksi Intra-artikular	26
Gambar 3.3 Proses Deparafinisasi	31
Gambar 3.4 Pengamatan Histologi Pewarnaan <i>Imunohistokimia</i>	33
Gambar 3.5 Skema Alur Penelitian	35
Gambar 4.1 Hasil Pengamatan <i>Imunohistokimia</i>	36
Gambar 4.2 Grafik Rata-rata Skor TNF- α	38

NO	= <i>Nitric Oxide</i>
TNF- α	= <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
IL-1 β	= <i>Inter-Leukin 1 Beta</i>
CFA	= <i>Complete Freund's Adjuvant</i>
MMP	= <i>Matrix Metalloprotease</i>
EPA	= <i>Eicosapentaenoic Acid</i>
DHA	= <i>Docosahexaenoic Acid</i>
AA	= <i>Arachidonic Acid</i>



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. LEMBAR PERSETUJUAN ETIK	50
A.1a Halaman Pertama Lembar Persetujuan Etik	50
A.1b Halaman Kedua Lembar Persetujuan Etik	51
B. DOKUMENTASI PENELITIAN	52
C. DATA PENELITIAN	54
D. ANALISIS DATA	58
D.1 Uji Normalitas dan Homogenitas	58
D.2 Uji One Way Anova	59

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang

Osteoarthritis merupakan bentuk arthritis yang paling sering ditemukan di masyarakat, bersifat kronis dan memiliki progresifitas yang lambat. Dalam perjalanan penyakitnya, osteoarthritis tidak hanya mengenai kartilago sendi tetapi juga mengenai seluruh bagian sendi, termasuk tulang subkondral, ligamentum, kapsul dan *sinovial junction* serta jaringan ikat periartikular. Pada stadium lanjut, kartilago sendi mengalami kerusakan yang ditandai dengan adanya fibrilasi, fissura dan ulserasi yang dalam pada permukaan sendi (*Indonesian Rheumatology Assosiation, 2014*).

Menurut World Health Organization (2010), kejadian osteoarthritis lebih tinggi pada wanita dibandingkan pria di antara semua kelompok umur (wanita 2,95 per 1000 penduduk dan pria 1,71 per 1000). Pada wanita, insiden tertinggi berusia 65-74 tahun yang mencapai sekitar 13,5 per 1000 penduduk per tahun. Sedangkan pria, insiden tertinggi terjadi pada usia ≥ 75 tahun sekitar 9 per 1000 penduduk per tahun.

Seiring dengan meningkatnya usia harapan hidup, menurut WHO pada tahun 2025 populasi usia lanjut di Indonesia akan meningkat 414% dibanding tahun 1990. Di Indonesia prevalensi osteoarthritis yang tampak secara radiologis mencapai 15,5% pada pria dan 12,7% pada wanita yang berumur antara 40-60 tahun. Diduga osteoarthritis paling sering terjadi di bagian genu (Maria *et al*, 2012). Dengan demikian Osteoarthritis akan semakin banyak ditemukan dalam praktek dokter sehari-hari.

Osteoarthritis merupakan hasil kombinasi dari beberapa etiologi. Akan tetapi Solomon menyatakan bahwa, pada kebanyakan kasus penyebab tercepat terjadinya osteoarthritis adalah stress mekanik yang menimpa beberapa bagian dari permukaan sendi (Solomon *et al*, 2013). Pada penyakit ini pula, mediator-mediator inflamasi ikut berperan dalam progresifitas penyakit. Selain pelepasan enzim-enzim degradasi, faktor-faktor pro-inflamasi juga terinduksi dan dilepaskan ke dalam rongga sendi, seperti *Nitric Oxide*, IL-1 β , dan TNF- α . Sitokin-sitokin ini menginduksi kondrosit

untuk memproduksi protease, kemokin, dan eikosanoid seperti prostaglandin dan leukotrien dengan cara menempel pada reseptor di permukaan kondrosit dan menyebabkan transkripsi gen MMP sehingga produksi enzim tersebut meningkat. Akibatnya sintesis matriks terhambat dan apoptosis sel meningkat.

Beberapa pengobatan alternatif yang alami sering diperbincangkan akhir-akhir ini, salah satunya ikan laut seperti ikan lemuru dan salmon yang memiliki kandungan asam omega 3 yaitu EPA dan DHA serta omega 6 yang bermanfaat bagi kesehatan. Ikan lemuru (*Sardinella sp.*) merupakan jenis ikan pelagik kecil yang banyak dijumpai di perairan Indonesia. Ada dua jenis ikan lemuru yang penting secara ekonomis yaitu *Sardinella sirm* dan *Sardinella longiceps*. Daerah penyebaran jenis *Sardinella sirm* terutama di laut Jawa, sedangkan *Sardinella longiceps* didapatkan dalam jumlah besar di selat Bali (Rasyid, 2001; Dinas Kelautan dan Perikanan Bali, 2010). Limbah minyak ikan lemuru banyak terdapat di daerah Muncar, Banyuwangi, Jawa Timur sebagai hasil ekstraksi dari pengolahan tepung ikan. Akan tetapi, pemanfaatan minyak ikan lemuru masih belum optimal, dan biasanya minyak ikan lemuru di perdagangkan sebagai pakan ternak, industri cat dan tinta dengan harga yang sangat murah (Dewi, 1996).

Minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) merupakan salah satu jenis minyak ikan yang memiliki kandungan asam lemak tak jenuh paling tinggi dibandingkan dengan jenis minyak ikan lainnya (Irianto *et al*, 2013). Ikan lemuru mengandung EPA dan DHA sebesar 18 % dan 13% (Dewi, 1996). minyak ikan lemuru yang memiliki kandungan EPA dan DHA dapat berfungsi dalam menurunkan mediator resorpsi tulang prostaglandin (PGE₂) dan sitokin proinflamasi (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α). Apabila terjadi penurunan PGE₂, IL-1 β dan TNF- α , maka akan meningkatkan aktivitas osteoblast dan menghambat pembentukan osteoklas pada tulang alveolar (Indahyani, 2008).

Salah satu sitokin yang berperan penting dalam proses terjadinya osteoarthritis adalah TNF- α . TNF- α merupakan sitokin yang disekresikan oleh makrofag sehingga memiliki peranan penting dalam terjadinya inflamasi. Pada

penelitian ini, adanya TNF- α disebabkan karena injeksi CFA memicu kerusakan membrane synovial yang menyebabkan vaskularisasi dan infiltrasi sel-sel meningkat pada sel T CD4+ (sel inflamatori). Selanjutnya mengaktivasi makrofag sehingga memproduksi sitokin TNF-a yang mengakibatkan terjadinya inflamasi (Green dan Flavell, 2000). Menurut penelitian sebelumnya diduga tikus yang diinduksi CFA akan mengalami osteoarthritis pasca 6 minggu pemberian (Robin, 2006). Oleh karena itu, dalam penelitian ini penulis ingin mengkaji tentang pengaruh minyak ikan lemuru terhadap ekspresi TNF- α pada kartilago yang diinduksi CFA.

1.2.Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dapat dirumuskan permasalahan yaitu sebagai berikut :

1. Apakah ada pengaruh pemberian minyak ikan lemuru (*Sardinella Longiceps*) terhadap ekspresi TNF- α pada kartilago tikus yang diinduksi oleh CFA secara eksperimental?
2. Pada hari keberapakah pemberian minyak ikan lemuru yang paling efektif dalam menurunkan ekspresi TNF- α pada kartilago tikus yang diinduksi oleh CFA secara eksperimental?

1.3.Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah diatas tujuan penelitian adalah sebagai berikut :

1. Untuk mengetahui pengaruh minyak ikan lemuru (*Sardinella Longiceps*) terhadap ekspresi TNF- α pada kartilago tikus yang diinduksi oleh CFA secara eksperimental.
2. untuk mengetahui pada hari beberapa pemberian minyak ikan lemuru (*Sardinella Longiceps*) yang paling efektif dalam menurunkan ekspresi TNF- α pada kartilago tikus yang diinduksi oleh CFA secara eksperimental.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Manfaat Teoritis
 - a. Memberikan masukan atau informasi yang bermanfaat bagi institusi pendidikan kedokteran.
 - b. Memberikan manfaat keilmuan dalam menambah khazanah pengembangan ilmu pengetahuan terapan terutama dalam kombinasi obat–obatan.
2. Manfaat Aplikatif
 - a. Dapat dijadikan dasar pedoman terapi terbaru untuk mengatasi penyakit osteoarthritis dan sebagai data dasar pengembangan terapi anti-inflamasi.
 - b. Dapat dijadikan dasar untuk penelitian selanjutnya serta sebagai tambahan pustaka.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Osteoarthritis

Osteoarthritis adalah suatu kelainan sendi kronis dimana terjadi proses pelemahan dan disintegrasi dari tulang rawan sendi yang disertai dengan pertumbuhan tulang dan tulang rawan baru pada sendi. Kelainan ini merupakan suatu proses degeneratif pada sendi yang dapat mengenai satu atau lebih sendi. Osteoarthritis disebut primer, bila tidak diketahui penyebabnya, dan disebut sekunder bila diketahui penyebabnya, misalnya akibat artritis reumatoid, infeksi, gout dan pseudogout. Penyakit ini bersifat progresif lambat, umumnya terjadi pada usia lanjut, walaupun usia bukan satu-satunya faktor risiko. Faktor lain yang diduga menjadi pemicu osteoarthritis adalah faktor jenis kelamin, kegemukan, dan *overuse* (Maria *et al*, 2012).

2.1.1 Faktor Resiko

Faktor yang dapat meningkatkan resiko penyakit osteoarthritis adalah umur, jenis kelamin, suku bangsa, genetik, obesitas dan penyakit metabolik, cedera sendi dan olahraga, kelainan pertumbuhan (Setiyohadi *et al*, 2009).

a. Umur

Prevalensi dan beratnya osteoarthritis semakin meningkat dengan bertambahnya usia. Osteoarthritis hampir tidak pernah terjadi pada anak-anak, jarang pada usia <40 tahun dan sering pada usia >60 tahun. Akan tetapi, faktor usia bukanlah satu-satunya faktor yang dapat memperberat terjadinya osteoarthritis karena perubahan tulang sendi pada usia tua berbeda dengan perubahan tulang sendi pada osteoarthritis.

b. Jenis Kelamin

Wanita lebih sering terkena osteoarthritis lutut dan osteoarthritis banyak sendi sedangkan laki-laki lebih sering terkena osteoarthritis paha, pergelangan tangan, dan leher. Secara keseluruhan usia <45 tahun frekuensi osteoarthritis kurang lebih sama pada laki-laki dan wanita, tetapi usia >50

tahun setelah menopause, frekuensinya lebih banyak pada wanita dari pada pria. Hal ini menunjukkan adanya peran hormonal pada patogenesis osteoarthritis.

c. Suku Bangsa

Osteoarthritis paha lebih jarang terjadi pada orang-orang kulit hitam dan asia dari pada Kaukasia. Osteoarthritis lebih sering di jumpai pada orang amerika asli Indian dari pada orang berkulit putih. Hal ini mungkin berkaitan dengan perbedaan cara hidup *live style* maupun perbedaan pada frekuensi kelainan kongenital dan pertumbuhan.

d. Genetik

Adanya mutasi dalam gen prokolagen II atau gen-gen struktural lain untuk unsur-unsur kartilago sendi seperti kolagen tipe IX dan XII, protein pengikat atau proteoglikan dikatakan berperan dalam timbulnya kecenderungan familial pada osteoarthritis tertentu terutama osteoarthritis banyak sendi.

e. Obesitas dan Penyakit Metabolik

Berat badan yang berlebih dapat meningkatkan resiko osteoarthritis pada wanita maupun pria. Obesitas tidak hanya berkaitan dengan osteoarthritis pada sendi yang menanggung beban, tetapi juga dengan sendi lain. Oleh karena itu, selain faktor mekanis juga terdapat faktor metabolik yang berperan pada timbulnya osteoarthritis tersebut.

Peran faktor metabolik dan hormonal antara osteoarthritis dan obesitas didukung oleh adanya penyakit jantung koroner, diabetes melitus dan hipertensi. Penderita osteoarthritis ternyata mempunyai resiko penyakit jantung koroner dan hipertensi yang lebih tinggi dari pada orang-orang yang tanpa osteoarthritis.

f. Cedera sendi pekerjaan dan olahraga

Aktivitas tertentu dapat menjadi predisposisi osteoarthritis cedera traumatik misalnya robeknya meniskus, ketidakstabilan ligamen yang dapat

mengenai sendi. Meskipun demikian cedera yang berulang dapat menjadi faktor penentu lokasi pada orang-orang yang mempunyai predisposisi osteoarthritis dan dapat berkaitan dengan perkembangan dan beratnya penyakit.

g. Kelainan pertumbuhan

Kelainan kongenital dan pertumbuhan paha misalnya penyakit parthes dan dislokasi kongenital paha berkaitan dengan timbulnya osteoarthritis paha pada usia muda. Mekanisme ini diduga lebih banyak terjadi pada osteoarthritis paha laki-laki dan ras tertentu.

2.1.2 Patogenesis

Faktor-faktor resiko yang pada akhirnya dapat menyebabkan kerusakan pada daerah sendi melalui tiga mekanisme yaitu peningkatan *Matrix metalloprotease* (MMP), inflamasi pada membran synovial dan stimulasi *Nitric Oxide* yang ditunjukkan seperti gambar 2.1 (Bachtiar, 2010).

a. Peningkatan MMP

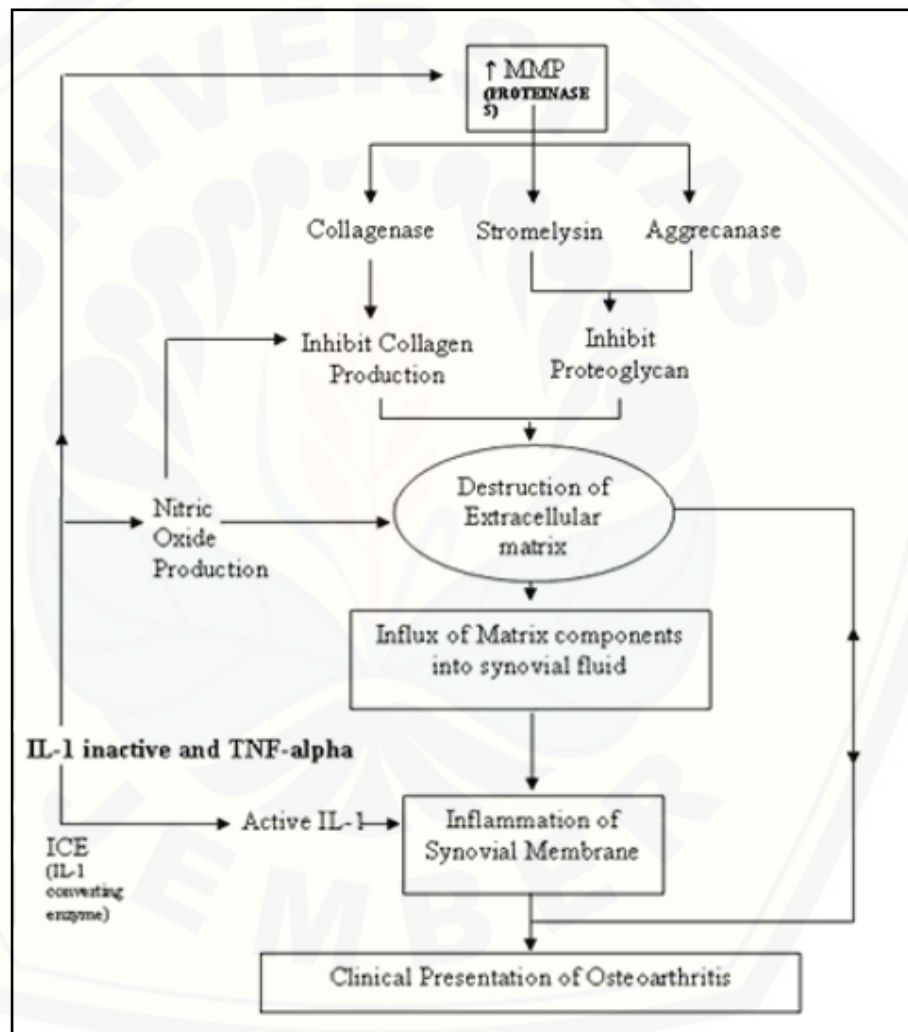
Kolagenase, sebuah enzim MMP bertanggung jawab atas degradasi kolagen. Begitu juga stromelysin bertanggung jawab atas degradasi proteoglikan. Sebuah enzim yang disebut aggrecanase juga bertanggung jawab atas degradasi proteoglikan.

b. Inflamasi membran synovial

Sintesis mediator-mediator seperti $IL-1\beta$ dan $TNF-\alpha$ pada membrane synovial menyebabkan degradasi kartilago. Sitokin ini mampu meningkatkan sintesis MMP, menghambat sintesis fisiologis utama inhibitor dan menghambat sintesis bahan-bahan matriks misalnya kolagen dan proteoglikan. Aksi $IL-1\beta$ dan $TNF-\alpha$ pada proses enzim, dikombinasikan dengan penekanan sintesis matriks, menghasilkan degradasi yang parah dalam tulang rawan.

c. Stimulasi *Nitric Oxide*

Disamping 2 mekanisme diatas, terdapat pula mekanisme lain dimana IL-1 β memunculkan efek yang dapat menyebabkan inflamasi dengan menstimulasi produksi *Nitric Oxide*. *Nitric Oxide* juga dapat menghambat produksi kolagen dan sintesis proteoglikan.



Gambar 2.1 Skema Pathogenesis Osteoarthritis (Bachtiar, 2010)

Berdasarkan penyebabnya, Osteoarthritis dibedakan menjadi dua yaitu osteoarthritis primer dan osteoarthritis sekunder. Osteoarthritis primer atau osteoarthritis

idiopatik tidak memiliki penyebab yang pasti dan tidak disebabkan oleh penyakit sistemik maupun proses perubahan lokal pada sendi. Osteoarthritis sekunder merupakan osteoarthritis yang disebabkan oleh inflamasi, kelainan sistem endokrin, metabolik, pertumbuhan, faktor keturunan (herediter), dan immobilisasi yang terlalu lama. Kasus osteoarthritis primer lebih sering dijumpai pada praktik sehari-hari dibandingkan dengan osteoarthritis sekunder (Soeroso *et al*, 2006).

Selama ini osteoarthritis sering dipandang sebagai akibat dari proses penuaan dan tidak dapat dihindari. Namun telah diketahui bahwa osteoarthritis merupakan gangguan keseimbangan dari metabolisme kartilago dengan kerusakan struktur yang penyebabnya masih belum jelas diketahui (Soeroso *et al*, 2006). Kerusakan tersebut diawali oleh kegagalan mekanisme perlindungan sendi serta diikuti oleh beberapa mekanisme lain dan pada akhirnya menimbulkan cedera (Felson, 2008).

Mekanisme pertahanan sendi diperankan oleh pelindung sendi yaitu : Kapsula dan ligamen sendi, otot-otot, saraf sensori aferen dan tulang di dasarnya. Kapsula dan ligamen-ligamen sendi memberikan batasan pada rentang gerak sendi *Range of motion* (Felson, 2008).

Cairan sendi *synovial junction* dapat mengurangi gesekan antar kartilago pada permukaan sendi sehingga mencegah terjadinya keletihan kartilago akibat gesekan. Protein yang disebut dengan *lubricin* merupakan protein pada cairan sendi yang berfungsi sebagai pelumas. Protein ini akan berhenti disekresikan apabila terjadi cedera dan peradangan pada sendi (Felson, 2008).

Ligamen bersama dengan kulit dan tendon mengandung suatu mekanoreseptor yang tersebar di sepanjang rentang gerak sendi. Umpan balik yang dikirimkannya memungkinkan otot dan tendon mampu untuk memberikan tegangan yang cukup pada titik-titik tertentu ketika sendi bergerak (Felson, 2008).

Otot-otot dan tendon yang menghubungkan sendi adalah inti dari pelindung sendi. Kontraksi otot yang terjadi ketika pergerakan sendi memberikan tenaga dan akselerasi yang cukup pada anggota gerak untuk menyelesaikan tugasnya. Kontraksi otot tersebut turut meringankan stres yang terjadi pada sendi dengan cara melakukan

deselerasi sebelum terjadi tumbukan *impact*. Tumbukan yang diterima akan didistribusikan ke seluruh permukaan sendi sehingga meringankan dampak yang diterima. Tulang yang ada dibalik kartilago memiliki fungsi untuk menyerap goncangan yang diterima (Felson, 2008).

Kartilago berfungsi sebagai pelindung sendi. Kartilago dilumasi oleh cairan sendi *synovial junction* yang mampu menghilangkan gesekan antar tulang yang terjadi ketika bergerak. Kekakuan kartilago yang dapat dimampatkan berfungsi sebagai penyerap tumbukan yang diterima sendi. Perubahan pada sendi sebelum timbulnya osteoarthritis dapat terlihat pada kartilago sehingga penting untuk mengetahui lebih lanjut tentang kartilago (Felson, 2008). Terdapat dua jenis makromolekul utama pada kartilago, yaitu kolagen tipe dua dan aggrekan. Kolagen tipe dua terjalin dengan ketat, membatasi molekul – molekul aggrekan di antara jalinan-jalinan kolagen. Aggrekan adalah molekul proteoglikan yang berikatan dengan asam hialuronat dan memberikan kepadatan pada kartilago (Felson, 2008).

Kondrosit merupakan sel yang terdapat di jaringan avaskular, mensintesis seluruh elemen yang terdapat pada matriks kartilago. Kondrosit menghasilkan enzim pemecah matriks, sitokin IL-1, TNF, dan faktor pertumbuhan. Umpan balik yang diberikan enzim tersebut akan merangsang kondrosit untuk melakukan sintesis dan membentuk molekul-molekul matriks yang baru. Pembentukan dan pemecahan ini dijaga keseimbangannya oleh sitokin faktor pertumbuhan, dan faktor lingkungan (Felson, 2008). Kondrosit mensintesis MMP untuk memecah kolagen tipe dua dan aggrekan. MMP memiliki tempat kerja di matriks yang dikelilingi oleh kondrosit. Namun pada fase awal osteoarthritis, aktivitas serta efek dari MMP menyebar hingga ke bagian permukaan *superficial* dari kartilago (Felson, 2008).

Stimulasi dari sitokin terhadap cedera matriks adalah menstimulasi pergantian matriks, namun stimulasi IL-1 yang berlebih malah memicu proses degradasi matriks. TNF menginduksi kondrosit untuk mensintesis prostaglandin, *nitric oxide*, dan protein lainnya yang memiliki efek terhadap sintesis dan degradasi matriks. TNF yang berlebihan mempercepat proses pembentukan tersebut. *Nitric oxide* yang

dihasilkan akan menghambat sintesis aggrekan dan meningkatkan proses pemecahan protein pada jaringan. Hal ini berlangsung pada proses awal timbulnya osteoarthritis (Felson, 2008).

Kartilago memiliki metabolisme yang lamban, dengan pergantian matriks yang lambat dan keseimbangan yang teratur antara sintesis dengan degradasi. Namun, pada fase awal perkembangan osteoarthritis kartilago sendi memiliki metabolisme yang sangat aktif (Felson, 2008).

Pada proses timbulnya osteoarthritis, kondrosit yang terstimulasi akan melepaskan aggrekan dan kolagen tipe dua yang tidak adekuat ke kartilago dan cairan sendi. Aggrekan pada kartilago akan sering habis serta jalinan-jalinan kolagen akan mudah mengendur (Felson, 2008). Kegagalan dari mekanisme pertahanan oleh komponen pertahanan sendi akan meningkatkan kemungkinan timbulnya osteoarthritis pada sendi (Felson, 2008).

2.1.3 Manifestasi Klinis

Pada umumnya, pasien osteoarthritis mengatakan bahwa keluhan-keluhan yang dirasakannya telah berlangsung lama, tetapi berkembang secara perlahan. Berikut adalah keluhan yang dapat dijumpai pada pasien OA :

a. Nyeri sendi

Nyeri biasanya bertambah dengan gerakan dan sedikit berkurang dengan istirahat. Beberapa gerakan dapat menimbulkan rasa nyeri yang melebihi gerakan lain. Umumnya bertambah berat dengan semakin beratnya penyakit sampai sendi hanya bisa digoyangkan dan menjadi kontraktur, Hambatan gerak dapat konsentris (seluruh arah gerakan) maupun eksentris (salah satu arah gerakan saja) (Soeroso *et al*, 2006).

Kartilago tidak mengandung serabut saraf dan kehilangan kartilago pada sendi tidak diikuti dengan timbulnya nyeri. Sehingga dapat diasumsikan bahwa nyeri yang timbul pada osteoarthritis berasal dari luar kartilago (Felson, 2008). Pada penelitian dengan menggunakan MRI,

didapat bahwa sumber dari nyeri yang timbul diduga berasal dari peradangan sendi (sinovitis), efusi sendi, dan edema sumsum tulang (Felson, 2008).

Osteofit merupakan salah satu penyebab timbulnya nyeri. Ketika osteofit tumbuh, invasi neurovaskular menembus bagian dasar tulang hingga ke kartilago dan menuju ke osteofit yang sedang berkembang sehingga menimbulkan nyeri (Felson, 2008). Nyeri dapat timbul dari bagian di luar sendi, termasuk bursa di dekat sendi. Sumber nyeri yang umum di lutut adalah akibat dari anserine bursitis dan sindrom iliotibial band (Felson, 2008).

b. Hambatan gerakan sendi

Gangguan ini biasanya semakin bertambah berat secara perlahan sejalan dengan pertambahan rasa nyeri (Soeroso *et al*, 2006).

c. Kaku pagi

Rasa kaku pada sendi dapat timbul setelah pasien berdiam diri atau tidak melakukan banyak gerakan, seperti duduk di kursi atau mobil dalam waktu yang cukup lama, bahkan setelah bangun tidur di pagi hari (Soeroso *et al*, 2006).

d. Krepitasi

Krepitasi atau rasa gemeratak yang timbul pada sendi yang sakit. Gejala ini umum dijumpai pada pasien osteoarthritis lutut. Pada awalnya hanya berupa perasaan akan adanya sesuatu yang patah atau remuk oleh pasien atau dokter yang memeriksa. Seiring dengan perkembangan penyakit, krepitasi dapat terdengar hingga jarak tertentu (Soeroso *et al*, 2006).

e. Deformitas

Sendi yang terkena secara perlahan dapat membesar (Soeroso, 2006).

f. Pembengkakan sendi yang asimetris

Pembengkakan sendi dapat timbul dikarenakan terjadi efusi pada sendi yang biasanya tidak banyak (<100cc) atau karena adanya osteofit, sehingga bentuk permukaan sendi berubah (Soeroso *et al*, 2006).

g. Inflamasi

Adanya inflamasi pada sendi ditandai dengan nyeri tekan, gangguan gerak, rasa hangat yang merata, dan warna kemerahan. Hal ini dapat dijumpai pada osteoarthritis karena adanya *synovitis* (Soeroso *et al*, 2006).

Pada penderita osteoarthritis dilakukan pemeriksaan radiografi pada sendi yang terkena sudah cukup untuk memberikan suatu gambaran diagnostik (Soeroso *et al*, 2006). Gambaran radiografi sendi yang menyokong diagnosis OA adalah :

- a. Penyempitan celah sendi yang seringkali asimetris (lebih berat pada bagian yang menanggung beban seperti lutut).
- b. Peningkatan densitas tulang subkondral (sklerosis).
- c. Kista pada tulang
- d. Osteofit pada pinggir sendi
- e. Perubahan struktur anatomi sendi.

2.2 Ikan Lemuru

Ikan lemuru memiliki ukuran dan berat maksimum sebesar 21-23 cm dan 200 gram serta mampu hidup selama 1 tahun (Hay, 2010). Ciri-ciri fisik ikan lemuru antara lain : Warna badan biru kehijauan pada bagian atas (punggung), putih keperakan pada bagian bawah. Sirip bewarna abu-abu kekuningan. Warna sirip ekor kehitaman demikian juga pada ujung moncongnya. Pada bagian atas tertutup insang sampai pangkal ekor terdapat sebaris bulatan hitam sebanyak 10-20 buah seperti pada gambar 2.2 (Hendrasaputra, 2008).

2.2.1 Klasifikasi

Klasifikasi ikan lemuru secara lengkap menurut direktorat jendral perikanan (1990) adalah sebagai berikut :

Kelas : *Pisces*
Ordo : *Milacopterygii*
Family : *Clupeidae*
Sub family : *Clupeinai*
Genus : *Sardnella*
Species : *S. Longiceps*



Gambar 2.2 Ikan Lemuru *Sardinella longiceps* (Rasyid, 2001)

Di perairan Indonesia banyak dijumpai jenis ikan lemuru (*Sardinella* sp.) yang merupakan jenis ikan pelagik kecil yaitu jenis ikan yang berenang di permukaan air laut. Ada dua jenis ikan lemuru yang penting secara ekonomis yaitu *Sardinella sirm* dan *Sardinella longiceps*. Daerah penyebaran jenis *Sardinella sirm* terutama di

laut Jawa, sedangkan *Sardinella longiceps* didapatkan dalam jumlah besar di selat Bali seperti gambar 2.2 (Rasyid, 2001 ; Dinas Kelautan dan Perikanan Bali, 2010).

2.2.2 Manfaat dan Kandungan Minyak Ikan Lemuru

Minyak ikan lemuru dapat dijadikan sebagai sumber asam lemak tak jenuh majemuk omega-3 khususnya *eicosapentaenoic* (EPA) dan *docosahexaenoic acid* (DHA) . Asam lemak tidak jenuh ini dapat memperbaiki sistem sirkulasi dan dapat membantu pencegahan penyempitan dan pengerasan pembuluh darah (*arteriosclerosis*) dan penggumpalan keping darah (*thrombosis*), sedangkan DHA penting untuk perkembangan otak manusia (Rasyid, 2001).

2.2.3 Asam Lemak EPA dan DHA

Asam lemak tidak jenuh disebut juga *polyunsaturated fatty acid* (PUFA), dibagi menjadi dua keluarga besar yaitu n-6 PUFA dan n-3 PUFA, yang keduanya mempunyai fungsi fisiologis berbeda (Winarno, 1997).

Dalam penelitian Indahyani 2008, n-6 PUFA banyak ditemukan terutama pada minyak nabati sedangkan n-3 PUFA banyak ditemukan terutama dalam minyak ikan. *Eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *docosahexaenoic acid* (DHA) hanya ditemukan pada minyak ikan (Newton, 1996), kandungannya sebesar $\pm 25\%$ - 35% 10 (Galli sit Raz, *et al.*, 1997). Satu gram minyak ikan mengandung ± 180 mg EPA dan 120 mg DHA (Kelley, 1996). Minyak ikan dari ikan lemuru mempunyai kandungan EPA dan DHA lebih tinggi dari pada minyak yang lain.

n-6 PUFA *linolenic acid* diubah menjadi rantai panjang melalui proses denaturasi dan elongasi menjadi γ -*linolenat acid* (GLA) dan *arakhidonat acid* (AA) sedang n-3 *fatty acid* α *linolenic acid* diubah menjadi EPA dan DHA. Proses metabolisme minyak ikan yang potensial adalah (Indahyani, 2008) :

1. EPA mengganti sebagian AA dalam jaringan atau kumpulan prekursor eikosanoid (prostaglandin (PGE₂), tromboksan (TXA₂), leukotrin (LTB,

LTC)) dengan demikian mengurangi persediaan AA untuk mensintesis eikosanoid.

2. EPA sebagai antagonis menggantikan peranan AA untuk oksigenase dengan enzim yang mensintesis eikosanoid (siklooksigenase dan lipoksigenase).
3. Eikosanoid yang disintesis dari EPA (contoh PGE3, TXA3, LTB5 atau LTC5) mengurangi sifat inflamasi (Galli, *et al*, sit Raz, *et al*, 1997; Calder, 1998).

Dalam penelitian indahyani 2008, n-3 PUFA dikatakan mempunyai efek anti-inflamasi karena kemampuannya merubah komposisi membran fosfolipid yang mengakibatkan terjadinya perubahan fluiditas membran, perubahan ikatan sitokin dan reseptornya, perubahan aktivitas protein (Grimble dan Tappia, 1998), serta berintegrasi langsung dengan aktivitas seluler (Peck, 1994b). Fluiditas membran mempunyai pengaruh kuat pada fungsi membran yang penting, seperti pembentukan dan aktivitas membran yang dihubungkan dengan enzim dan reseptor pada *second messenger system* dan *signaling cell* (Wiseman, 1996).

2.3 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α)

TNF- α merupakan sitokin yang disekresikan oleh makrofag sehingga memiliki peranan penting dalam terjadinya inflamasi. Keberadaan TNF- α disebabkan karena injeksi CFA yang memicu terjadinya kerusakan *synovial membrane* sehingga menyebabkan vaskularisasi dan infiltrasi sel-sel meningkat pada sel T CD4+ (sel inflamatori). Selanjutnya mengaktifasi makrofag sehingga memproduksi sitokin TNF- α yang mengakibatkan terjadinya inflamasi seperti pada gambar 2.3 (*Office of Animal Care and Use*, 2011).

Ekspresi TNF- α pada penelitian mandella ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada jaringan sendi (Green dan Flavels, 2000) dimana proses terjadinya inflamasi dikarenakan pada tulang rawan hialin tepatnya di sitoplasma jumlah sitokin TNF- α mengalami peningkatan. Meningkatnya TNF- α disebabkan karena makrofag dalam sendi aktif sehingga ekspresi TNF- α terekspresi pada sitoplasma yang ditandai

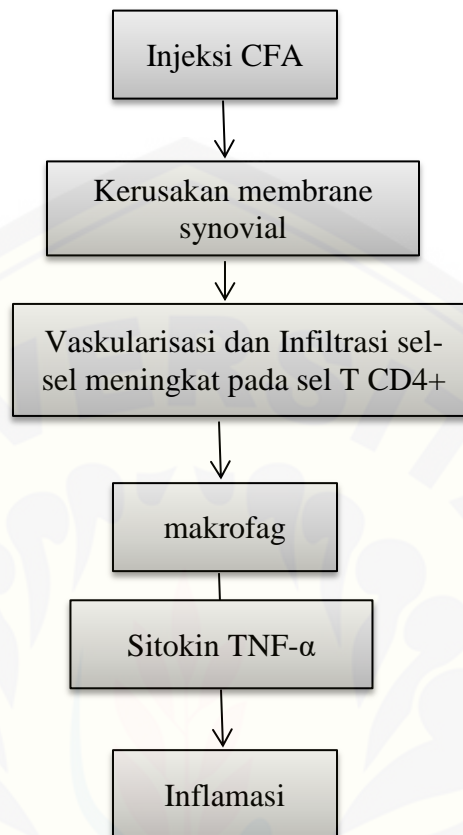
dengan banyaknya warna coklat pada kartilago hialin setelah dilakukan pewarnaan *Imunohistokimia* (Setiyohadi *et al*, 2009).

Lipopolisakarida merupakan rangsangan poten untuk mensekresi TNF- α , interferon gamma yang di produksi oleh sel T dan sel NK juga merangsang makrofag dalam meningkatkan sintesis TNF- α . Pada kadar rendah, TNF- α bekerja terhadap leukosit dan endotel menginduksi inflamasi akut. Pada kadar sedang, TNF- α berperan dalam inflamasi sistemik. Pada kadar tinggi TNF- α menimbulkan kelainan patologik syok septik (Misitahari, 2011).

Pada penelitian ini, ekspresi TNF- α dapat dilihat dari sitoplasma sel kondrosit yang terdapat di kartilago sendi. Hal ini dikarenakan kondrosit merupakan sel yang terdapat di jaringan avaskular, mensintesis seluruh elemen yang terdapat pada matriks kartilago dan menghasilkan enzim pemecah matriks, sitokin IL-1, TNF, dan faktor pertumbuhan.

2.4 Complete Freund's Adjuvant (CFA)

CFA merupakan emulsi air dalam minyak yang berisi *Mycobacterium* yang dimatikan oleh pemanasan atau berisi komponen dinding sel *Mycobacterium*. CFA efektif meningkatkan respon antibodi selular dan humoral terhadap immunogen yang diinjeksikan secara bermakna. Aktivitas alfa fase minyak dan stimulasi respon imun lokal bawaan yang menyebabkan peningkatan imunitas adaptif. Komponen penting dari respon ini adalah reaksi inflamasi kuat pada lokasi deposisi antigen akibat pembentukan influs lekosit dan interaksinya dengan antigen. CFA yang digunakan secara tidak tepat atau berlebihan dapat menyebabkan efek samping signifikan seperti inflamasi kronik, ulserasi kulit, abses local atau peluruhan jaringan (*Office of Animal Care and Use*, 2011)

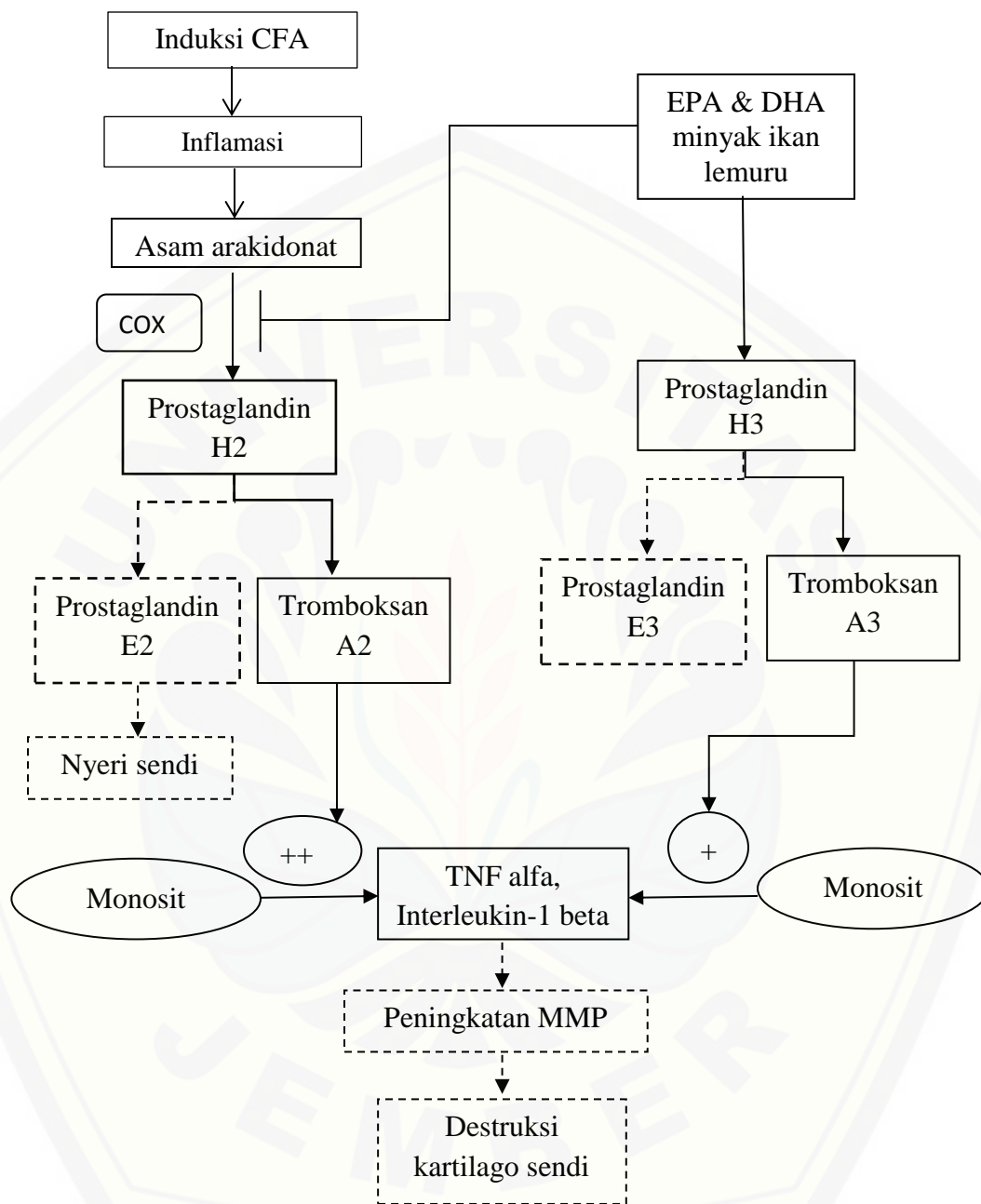


Gambar 2.3 Mekanisme Terjadinya Inflamasi yang diinduksi CFA

Sumber : (Office of Animal Care and Use, 2011)

2.5 Kerangka Konsep

EPA menggantikan sebagian asam arakidonat (AA) dalam jaringan dimana dalam terjadinya inflamasi AA mensintesis PGE2 dan TXA2 kemudian digantikan oleh EPA dalam proses oksigenase dengan enzim yang mensintesis eicosanoid sehingga menghasilkan PGE3 dan TXA3 yang dapat mengurangi sifat inflamasi yaitu dengan menurunnya produksi sitokin inflamasi IL-1, TNF- α , dan IL-6. Menurunnya sitokin inflamasi dapat menurunkan MMP sehingga dapat mengurangi terjadinya destruksi kartilago sendi.

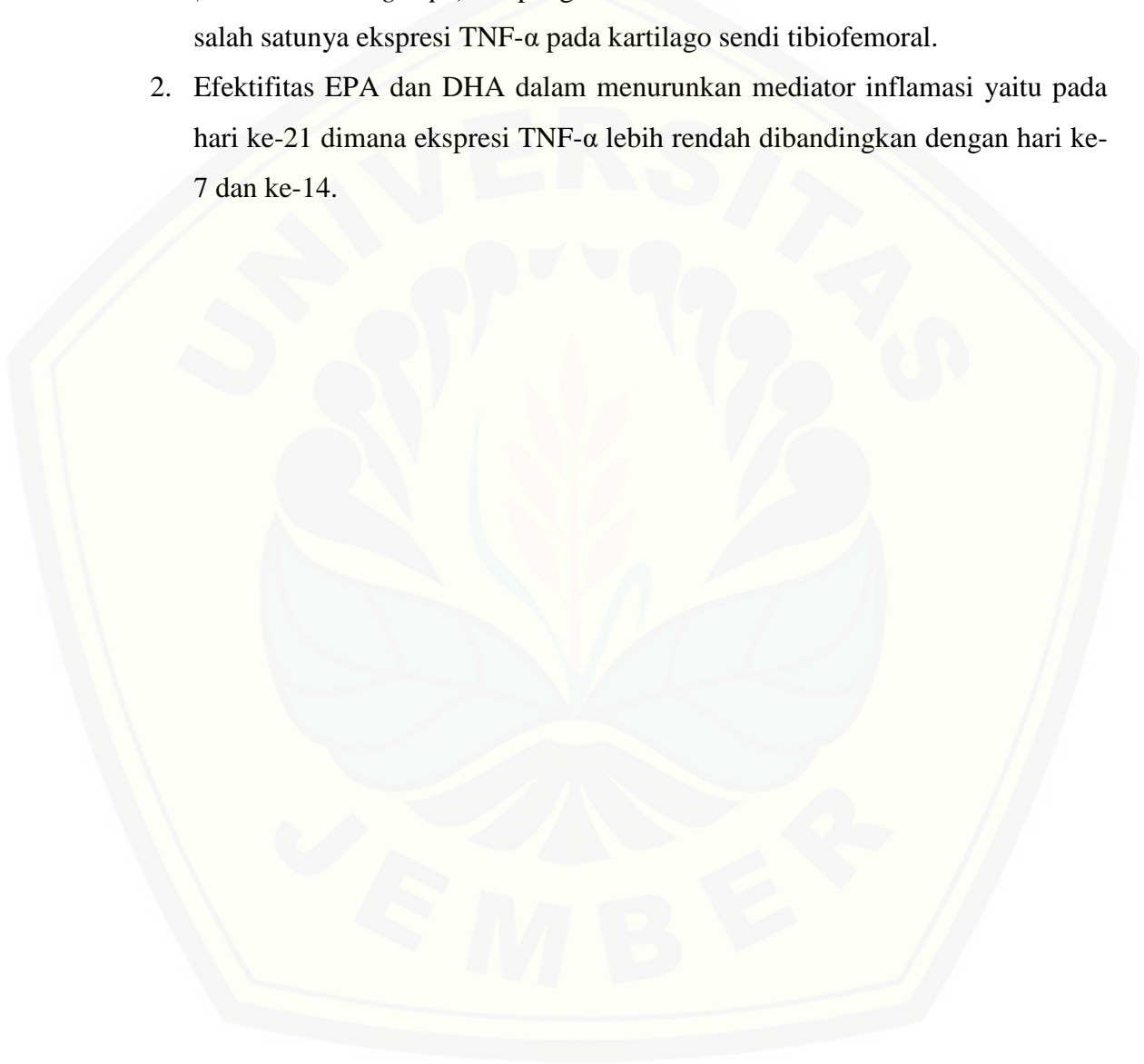


Gambar 2.4 Skema kerangka konsep penelitian

2.6 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah :

1. Kandungan EPA dan DHA yang terdapat dalam minyak ikan lemuru (*Sardinella Longiceps*) berpengaruh dalam menurunkan mediator inflamasi salah satunya ekspresi TNF- α pada kartilago sendi tibiofemoral.
2. Efektifitas EPA dan DHA dalam menurunkan mediator inflamasi yaitu pada hari ke-21 dimana ekspresi TNF- α lebih rendah dibandingkan dengan hari ke-7 dan ke-14.



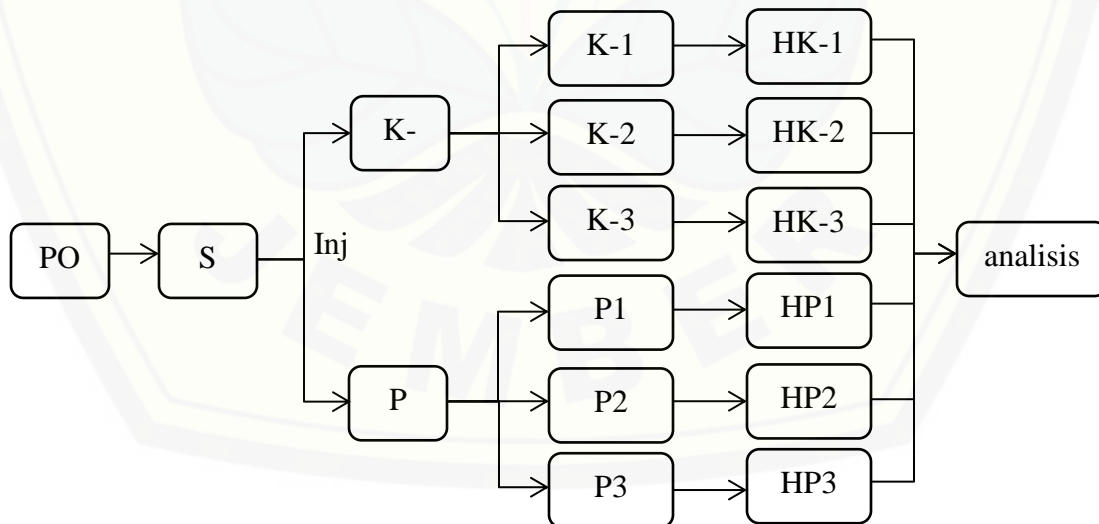
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah *True Eksperimental* dengan rancangan penelitian *The Randomized Post Test Only Kontrol Group Design*. (Notoadmodjo, 2010).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *The Randomized Post Test Only Kontrol Group Design*. (Notoadmodjo, 2010). Dimana dalam penelitian ini terdapat 2 kelompok yang dipilih secara random (R) yaitu kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan. Dalam masing-masing kelompok terbagi menjadi 3 sub kelompok berdasarkan lama pemberian minyak ikan lemuru yaitu kelompok 1, 2 dan 3 masing-masing diberikan minyak ikan lemuru selama 7 hari, 14 hari dan 21 hari.



Gambar 3.1 Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

- PO : Populasi tikus galur *Sprague Dawley* 30 ekor
- S : Sampel yang diambil secara *simple random sampling* dari populasi (PO) yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dengan jumlah total 24 tikus
- Inj : Sampel yang di injeksi injeksi CFA secara intra-artikular pada sendi tibiofemoral sebanyak 0,08 ml di kaki sebelah kanan dan dibiarkan selama 6 minggu.
- K- : kelompok kontrol negatif
- P : kelompok perlakuan
- K-1 : kelompok kontrol negatif yang didekapitasi pada hari ke-7
- K-2 : kelompok kontrol negatif yang didekapitasi pada hari ke-14
- K-3 : kelompok kontrol negatif yang didekapitasi pada hari ke-21
- P1 : kelompok perlakuan pertama dengan pemberian minyak ikan lemuru sebanyak 1ml/hari selama 7 hari
- P2 : kelompok perlakuan pertama dengan pemberian minyak ikan lemuru sebanyak 1ml/hari selama 14 hari
- P3 : kelompok perlakuan pertama dengan pemberian minyak ikan lemuru sebanyak 1ml/hari selama 21 hari
- HK-1 : hasil gambaran histopatologi kelompok kontrol negatif 1
- HK-2 : hasil gambaran histopatologi kelompok kontrol negatif 2
- HK-3 : hasil gambaran histopatologi kelompok kontrol negatif 3
- HP1 : hasil gambaran histopatologi kelompok perlakuan 1
- HP2 : hasil gambaran histopatologi kelompok perlakuan 2
- HP3 : hasil gambaran histopatologi kelompok perlakuan 3

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

3.3.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Laboratorium Kimia Dasar FMIPA Universitas Jember,

Laboratorium Patologi Anatomi dan Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2015 sampai Mei 2016.

3.4 Populasi, Sampel dan Besar Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah hewan coba tikus jenis *Sprague Dawley* jantan dengan berat 200-300 gram

3.4.2 Sampel Penelitian

a. Kriteria Sampel Penelitian

Kriteria sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- 1) Jenis tikus *Sprague Dawley*
- 2) Kondisi fisik sehat dan tidak mengalami kelainan
- 3) Jenis kelamin jantan
- 4) Umur 3-5 bulan dengan berat badan tikus 200-300 gram
- 5) Pakan standart

b. Pengelompokan Sampel

Pengelompokan sampel dilakukan dengan menggunakan metode *simple random sampling*, yang mengartikan tiap anggota populasi memiliki peluang yang sama untuk masuk ke dalam kelompok penelitian (Tjokronegoro, 1999).

3.4.3 Besar Sampel Penelitian

Besar sampel dalam penelitian ini ditentukan dengan rumus empiris Federer (Hanafiah, 2010) sebagai berikut :

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

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

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

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

$$P = t \times n$$

$$= 6 \times 4$$

$$= 24 \text{ ekor.}$$

Keterangan :

P = besar sampel yang dibutuhkan

t = jumlah kelompok = 6

n = jumlah ulang

Berdasarkan hitungan tersebut, besar sampel tikus *Sprague Dawley* yang dibutuhkan adalah 4 ekor tikus untuk masing-masing kelompok dan besar sampel penelitian ini adalah 24 ekor tikus dengan cadangan 1 tikus di masing-masing kelompok. Jadi total tikus yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah 30 ekor tikus *Sprague Dawley*.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan pada penelitian ini adalah lama pemberian minyak ikan lemuru. Dimana pada kelompok perlakuan pertama minyak ikan lemuru diberikan setiap hari selama 7 hari, kelompok perlakuan kedua selama 14 hari dan ketiga selama 21 hari.

3.5.2 Variable Terikat

Variable terikat pada penelitian ini adalah ekspresi TNF- α

3.5.3 Variabel Terkendali

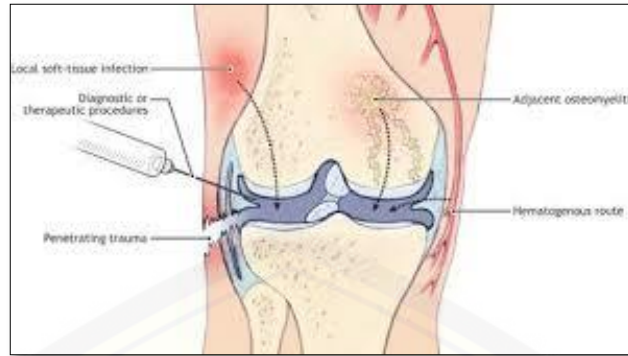
- a. Jenis hewan coba : Tikus galur *Sprague Dawley*
- b. Jenis tikus : Jantan
- c. Berat badan tikus : 200-300 gram
- d. Umur tikus : 3-5 bulan
- e. Makanan tikus (Pakan standar tikus merk *Turbo 521-CP*, Indonesia) dan minuman tikus (air minum kemasan aqua).
- f. Tempat dan cara pemeliharaan tikus.
Hewan percobaan ditempatkan dalam kandang dengan ukuran 30 cm x 30 cm dengan suhu kelembaban ruangan sebesar 37°C (suhu kamar).
- g. Pemberian minyak ikan lemuru secara sondasi lambung.
- h. Dosis CFA
- i. Prosedur pengambilan preparat.
- j. Metode pewarnaan dengan menggunakan *Imunohistokimia*.

3.6 Definisi Operasional

3.6.1 Osteoarthritis

Osteoarthritis merupakan gangguan sendi yang bersifat kronik serta progresif, gangguan ini ditandai kadar molekul perantara tertentu termasuk IL-1, TNF- α , dan *nitric oxide* yang meningkat pada kartilago sendi osteoarthritis dan berperan dalam menyebabkan perubahan komposisi tulang rawan di sendi tibiofemoral.

Dalam penelitian ini, pembuatan tikus model osteoarthritis dilakukan dengan injeksi CFA secara intra artikular pada sendi tibiofemoral tikus *Sprague Dawley* berjenis kelamin jantan di kaki sebelah kanan seperti gambar 3.2. CFA merupakan emulsi air dalam minyak yang berisi *mycobacterium* yang dimatikan oleh pemanasan atau berisi komponen dinding sel *mycobacterium*.



Gambar 3.2 Injeksi Intraartikular (<http://ojs.unud.ac.id>)

3.6.2 Minyak ikan lemuru

Minyak ikan yang digunakan diperoleh dari hasil proses pemerasan dan pemisahan molekul lemak dan air. Dimana minyak ikan lemuru ini, mengandung asam omega 3 yaitu EPA dan DHA serta omega 6 yang dapat menurunkan mediator resorpsi tulang yaitu PGE2 (prostaglandin), sitokin proinflamasi (IL-1 α , IL-1 β , dan TNF- α). Jika terjadi penurunan PGE2, IL-1 dan TNF- α akan meningkatkan aktivitas osteoblast dan pembentukan osteoclas pada tulang alveolar akan terhambat. Dalam penelitian ini, dosis pemberian minyak ikan lemuru adalah 1ml/150-200 BB.

3.6.3 Ekspresi Tumor Necrosis Faktor (TNF- α)

Pengamatan ini dilakukan pada bagian kartilago dengan pewarnaan *Imunohistokimia* untuk mengetahui ekspresi TNF- α . Gambaran kartilago diamati secara kualitatif menggunakan mikroskop Olympus BX51 dengan perbesaran 400x. Ekspresi TNF- α pada penelitian ini ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada kondrosit yang terdapat dalam kartilago sendi (Green dan Flavell, 2000).

3.7 Dosis Ketamin, Minyak Ikan Lemuru dan CFA

Dosis ketamin yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0,2 ml/ ekor (Dewi et al, 2013), dosis minyak ikan lemuru yang digunakan adalah 1 ml/150-200 gram berat badan tikus (Indahyani, 2008) dan dosis CFA yang digunakan adalah 0,08 ml dengan pengenceran menggunakan normal saline 1:1.

3.8 Alat dan Bahan Penelitian

3.8.1 Pembuatan Minyak Ikan Lemuru

Alat yang digunakan adalah bak plastik, *sentrifuge*, tabung *sentrifuge*, corong pisah, kompor, panci, gelas ukur, pipet, pipet *micrometer*.

Bahan yang digunakan adalah ikan lemuru, *aquadest*, tabung tempat minyak ikan.

3.8.2 Perawatan dan Perlakuan Hewan Coba

Alat yang digunakan adalah kandang tikus terbuat dari plastik yang ditutupi dengan penyekat, tempat makan dan minum tikus, timbangan (*neraca Ohaus, Germany*), sarung tangan (*Senstouch, Indonesia*), masker (*J-Spin, Indonesia*), sonde lambung untuk pemberian minyak ikan lemuru, gelas ukur (*One lab, Indonesia*), *syringe tuberculin*, gunting, silet

Bahan yang digunakan adalah makanan tikus *turbo*, air bersih, sekam / serbuk kayu, minyak ikan lemuru, CFA, ketamin, *normal saline*.

3.8.3 Dekapitasi Dan Pengambilan Sampel

Alat dan bahan yang digunakan adalah gunting bedah, gunting, toples plastik kedap udara, skalpel, mata pisau skalpel, botol untuk dekalsifikasi, masker, sarung tangan, *buffer formalin 10%*.

3.8.4 Pembuatan dan Pewarnaan Preparat

Alat yang digunakan adalah *object glass* dan *deck glass*, pinset, botol untuk dekalsifikasi, *vibrator* (*Vortex*), stopwatch, mikrotom, *block holder mikrotom*, *waretbath*, *slibe warmer*, oven, *automatic staining*, kuas kecil, mikroskop binokuler, *obyek glass*, *deck glass*, spiritus, sarung tangan (*latex*), masker

Bahan yang digunakan adalah *buffer formalin 10%*, antibodi *TNF- α* dan kit, etanol 100%, etanol 95%, etanol 70%, larutan *xylol*,

3.9 Prosedur Penelitian

3.9.1 *Ethical Clearence*

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

3.9.2 Persiapan Sampel Penelitan

- a. Memilih tikus *Sprague Dawley* jantan sebanyak 24 ekor.
- b. Melakukan penimbangan berat badan tikus dengan neraca *Ohaus* (berat badan tikus 200-300 gram).
- c. Menyiapkan kandang tikus dengan ukuran 30 cm x 30 cm 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 Pembuatan Minyak Ikan Lemuru

- a. Ikan lemuru dicuci dengan air sampai bersih, membuang seluruh isi perut ikan lemuru dan mencucinya sampai bersih.
- b. Ikan lemuru yang sudah bersih dipotong menjadi dua bagian.
- c. Merebus ikan lemuru yang sudah dipotong mnjadi dua bagian dengan aquadest sehingga ikan lemuru tenggelam dalam aquades dengan suhu kira-kira 80-90°C sambil diaduk-aduk terus. Setelah mendidih ditambahkan NaCl kemudian diaduk kembali sampai didapatkan minyak ikan dibagian permukaan. Perbandingan pemberian Nacl dan Aquadest :

Ikan lemuru : NaCl : *Aquadest*

3 kg : 100 mg : 5 liter

- d. Mengambil minyak ikan yang ada di permukaan lalu dipindahkan ke tabung reaksi.

- e. Untuk mendapatkan minyak ikan murni yang telah terpisah dari molekul lemak dan air. Tabung reaksi disentrifuse dengan kecepatan 5.000 - 6000 rpm selama 15 menit.
- f. Setelah disentrifuse, pada tabung sentrifuse terdapat tiga bagian, yakni minyak ikan pada bagian atas, molekul lemak pada bagian tengah serta molekul air pada bagian bawah. Kemudian menuang minyak ikan yang sudah murni ke dalam ependorf 1 ml.

3.9.4 Perlakuan Pada Hewan Coba Selama Penelitian

Penelitian dilakukan selama 63 hari dengan pembagian 7 hari untuk adaptasi hewan coba, 42 hari atau 6 minggu untuk pembuatan model tikus osteoarthritis dengan menginduksi CFA 0,08 ml secara intra-artikular dan 21 hari untuk perlakuan pada tikus dengan pemberian per-oral minyak ikan lemuru dosis 1 ml/150-200 gram.

Hasil pengukuran dicatat sebagai volume awal. Perlakuan pada hewan coba pada penelitian ini, sebagai berikut.

1. Kelompok K-1 : 4 ekor tikus pada hari ke 7 adaptasi diinduksi dengan CFA 0,08 ml. Ditunggu selama 42 hari atau 6 minggu dan selanjutnya didekapitasi 7 hari kemudian.
2. Kelompok K-2 : 4 ekor tikus pada hari ke 7 adaptasi diinduksi dengan CFA 0,08 ml. Ditunggu selama 42 hari atau 6 minggu dan selanjutnya didekapitasi 14 hari kemudian.
3. Kelompok K-3 : 4 ekor tikus pada hari ke 7 adaptasi diinduksi dengan CFA 0,08 ml. Ditunggu selama 42 hari atau 6 minggu dan selanjutnya didekapitasi 21 hari kemudian.
4. Kelompok P1 : 4 ekor tikus pada hari ke 7 adaptasi diinduksi dengan CFA 0,08 ml. Ditunggu selama 42 hari atau 6 minggu dan selanjutnya diberi minyak ikan lemuru 1 ml/150-200 gram 1x sehari secara per-oral selama 7 hari, kemudian didekapitasi.

5. Kelompok P2 : 4 ekor tikus pada hari ke 7 adaptasi diinduksi dengan CFA 0,08 ml. Ditunggu selama 42 hari atau 6 minggu dan selanjutnya diberi minyak ikan lemuru 1 ml/150-200 gram 1xsehari secara per-oral selama 14 hari, kemudian didekapitasi.
6. Kelompok P3 : 4 ekor tikus pada hari ke 7 adaptasi diinduksi dengan CFA 0,08 ml. Ditunggu selama 42 hari atau 6 minggu dan selanjutnya diberi minyak ikan lemuru 1 ml/150-200 gram 1xsehari secara per-oral selama 21 hari, kemudian didekapitasi.

3.9.5 Pembuatan Preparat Histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi dilakukan di laboratorium patologi anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Berikut prosedur pembuatan preparat jaringan kartilago sendi :

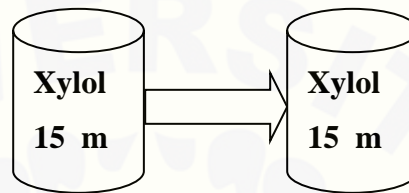
3.9.5.1 Proses Pematangan Jaringan Berupa Makross

- a. Gross hasil bedah dimasukan ke larutan buffer formalin 10 % (fiksasi) semalam
- b. Jaringan dilakukan dekalsifikasi (Pengembukan tulang sendi) 15 s/d 20 hari menggunakan EDTA
- c. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan yang akan diteliti
- d. Jaringan dipotong kurang lebih ketebalan 2-3 mili meter
- e. Di masukan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti
- f. Dicuci dengan air mengalir sebelum dilakukan proses jaringan / dimasukan ke alat *Tissue Tex Prosesor*
- g. Diproses menggunakan alat mesin *Automatis Tissue Tex Prosesor (Automatic Processing)*
- h. Alarm bunyi tanda selesai.

3.9.5.2 Proses Pengeblokan & Pemotongan Jaringan

1. Jaringan diangkat dari mesin *Tissue Tex Prosesor*
2. Jaringan diblok dengan *paraffin* sesuai kode jaringan
3. Jaringan dipotong dengan alat *microtome* ketebalan 3-5 mikron

3.9.5.3 Proses Deparafinisasi



Gambar 3.3 Proses Deparafinisasi

Setelah disayat atau dipotong dengan ketebalan 3-5 mikron, diletakkan dalam oven selama 30 menit dengan suhu panas 70-80 °C, kemudian dimasukkan ke dalam 2 tabung larutan *xylol* masing-masing 20 menit, setelah itu di masukan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (hidrasi), dan yang terakhir dimasukkan air mengalir selama 15 menit.

3.9.6 Pewarnaan *Imunohistokimia*

Pewarnaan *Imunohistokimia* dilakukan di laboratorium fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pewarnaan *Imunohistokimia* untuk melihat ekspresi TNF- α menggunakan *antibody* TNF- α . Berikut langkah-langkah pewarnaan *Imunohistokimia* :

- a. Sediaan dilakukan deparafinisasi preparat (blok parafin) dengan larutan *xylene* sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit
- b. Kemudian rehidrasi (dimasukkan ke dalam alcohol secara bertingkat dari tinggi ke rendah) preparat dengan menggunakan etanol 100%, etanol 95%, dan etanol 70% masing-masing selama dua menit, dua menit, satu menit dan terakhir dengan air selama satu menit.

- c. *Object glass* direndam ke dalam *peroxidasen blocking solution* pada suhu kamar selama 10 menit.
- d. Inkubasi preparat dalam *prediluted blocking serum* 25°C selama 10 menit.
- e. Rendam preparat di dalam *monoclonal antibody* TNF- α pada suhu 25°C selama 10 menit.
- f. Cuci preparat dengan *Phospate Buffer Saline* (PBS) selama 5 menit.
- g. Inkubasi preparat dengan antibodi sekunder pada suhu 25°C selama 10 menit.
- h. Cuci preparat dengan PBS selama 5 menit
- i. Inkubasi preparat dengan *peroxidase* pada suhu 25°C selama 10 menit
- j. Cuci preparat dengan *Phospate Buffer Saline* (PBS) selama 5 menit
- k. Inkubasi preparat dengan kromogen *Diaminobenzinidase* (DAB) pada suhu 25°C selama 10 menit.
- l. Inkubasi preparat dengan *Hematoxyline Eosin* selama 3 menit.
- m. Cuci preparat dengan air mengalir
- n. Bersihkan preparat dan tetesi dengan *mounting media*
- o. Tutup preparat dengan *coverslip*
- p. Amati ekspresi TNF- α pada jaringan kartilago
- q. Dokumentasi setiap pengamatan.

3.9.7 Pengamatan Histopatologi

Pengamatan dilakukan pada bagian kartilago dengan pewarnaan *Imunohistokimia* untuk mengetahui ekspresi TNF- α . Gambaran kartilago diamati secara kualitatif menggunakan mikroskop *Olympus BX51* dengan pembesaran 400x.

Peningkatan ekspresi TNF- α dapat dilihat dari skor histologi ekspresi TNF- α melalui hasil pengamatan preparat kartilago sendi tibiofemoral pada semua sampel setelah dilakukan pewarnaan *Imunohistokimia*. Sehingga, diperoleh nilai rata-rata dalam setiap kelompok.

Perhitungan ekspresi TNF- α menggunakan skor histologi yaitu (Setiabudi, 2005) :

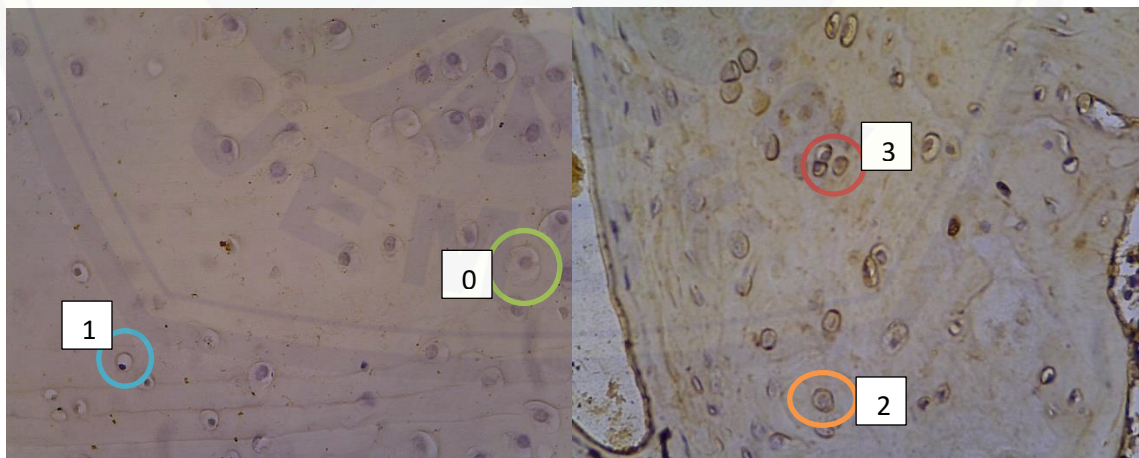
$$\text{Skor} = (IK \times PK) + (IS \times PS) + (IL \times PL) + (IN \times PN)$$

Keterangan :

- P = Persentase
I = Intensitas
K = Kuat
S = Sedang
L = Lemah
N = Negatif

Intensitas warna dapat diketahui sebagai nilai kuantitatif dan dapat dinilai sebagai :

- 0 = intensitas negatif/normal
- 1 = intensitas lemah
- 2 = intensitas sedang
- 3 = intensitas kuat



Gambar 3.4 Pengamatan histologi pewarnaan Imunohistokimia. Skoring ekspresi TNF- α lfa, skor 0 ditunjukkan pada lingkaran berwarna hijau, skor 1:warna biru, skor 2:warna orange dan skor 3:warna merah.

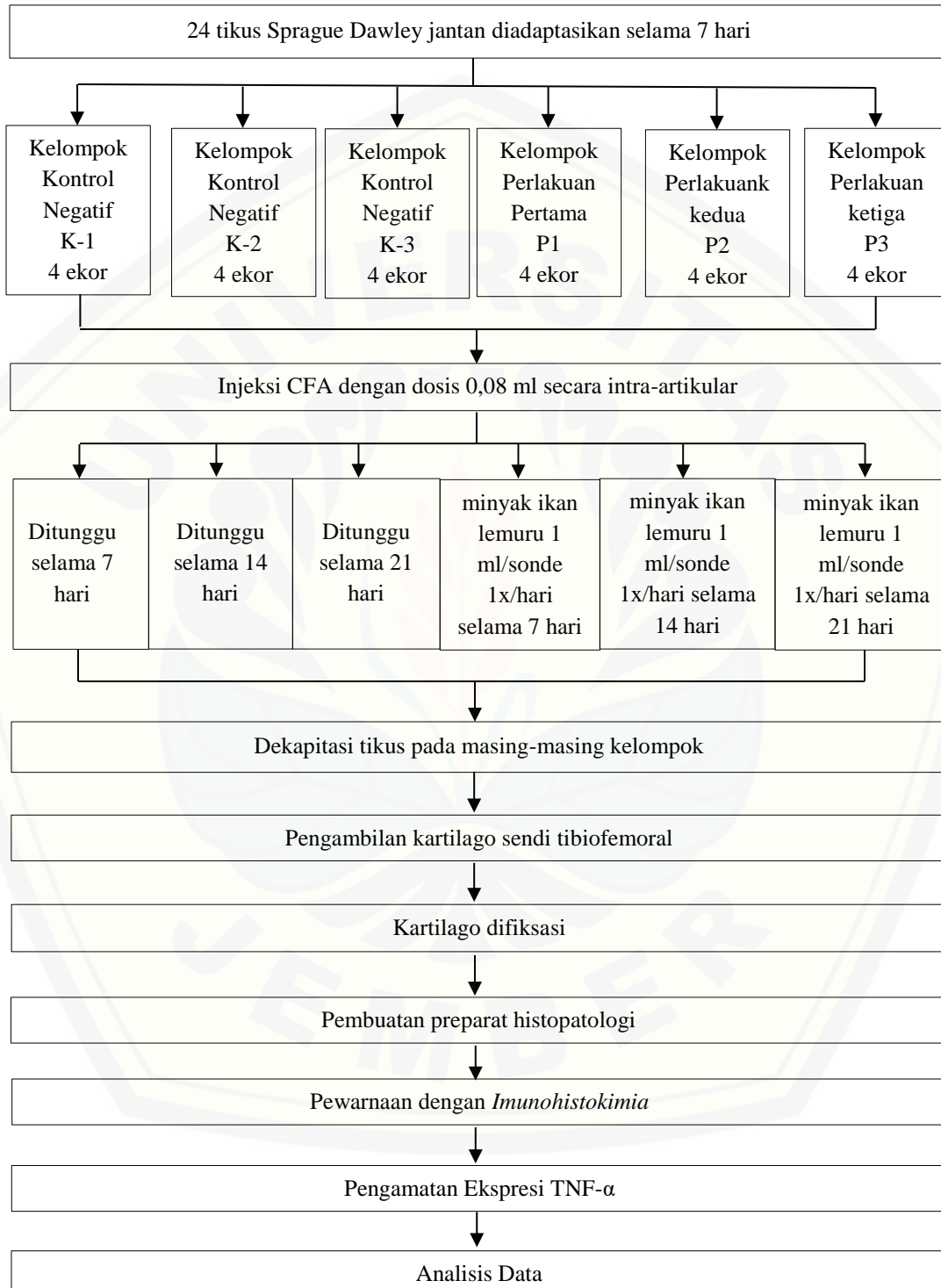
Berdasarkan paparan diatas, dalam penelitian ini ekspresi TNF- α terekspresi pada sitoplasma sel kondrosit. Nilai persentase TNF- α diperoleh dari rumus sebagai berikut (Herawati, 2014) :

$$\text{persentase TNF} - \alpha (\%) = \frac{\text{kondrosit yang mengekspresikan TNF-}\alpha}{\text{jumlah total kondrosit pada lapang pandang}} \times 100\%$$

3.10 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak uji statistik SPSS vers. 20. Data yang diperoleh dari penelitian akan diuji kenormalan distribusinya melalui hasil histogram atau box plot dengan menggunakan uji *shapiro wilk* (sampel <50). Apabila data terdistribusi normal (normalitas normal $p > 0,05$) maka digunakan uji hipotesis *one way anova*. Namun, jika tidak sama ($p < 0,05$) digunakan uji *kruskall wallis*. Selanjutnya, dilakukan uji *post hoc tukey* sebagai lanjutan *one way anova* dan *mann whitney* sebagai uji lanjutan *kruskall wallis* untuk menentukan perbedaan yang bermakna dalam tiap kelompok (Dahlan, 2009)

3.11 Alur Penelitian



Gambar 3.5 Skema Alur Penelitian

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat diambil kesimpulan bahwa :

- a. Minyak ikan lemuru dapat berpengaruh dalam menurunkan ekspresi TNF- α pada kartilago sendi yang diinduksi CFA.
- b. Waktu yang paling efektif dalam menurunkan TNF- α adalah 21 hari.

5.2 Saran

Dari penelitian yang telah dilakukan, penulis menyarankan beberapa hal sebagai berikut :

- a. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang ekstrak minyak ikan lemuru sebagai anti-inflamasi
- b. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang dosis optimal dari minyak ikan lemuru (*Sardinella Longiceps*).
- c. Diperlukan penelitian lebih lanjut menggunakan perbedaan dosis minyak ikan lemuru (*Sardinella Longiceps*).
- d. Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan membandingkan kelompok kontrol positif dan perlakuan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alcaraz, J. M., Gualillo, O., Pernaut, S. O. 2013. Studies on Arthritis a Joint Disorders. Spain: Humana Press.
- Bachtiar, Arief. 2010. Pengaruh Ekstrak Jahe (*Zingiber Officinale*) terhadap Tanda dan Gejala Osteoarthritis pada Pasien Rawat Jalan di Puskesmas Pandanwangi Kota Malang. *Tesis*. Jakarta : Fakultas Ilmu Keperawatan Universitas Indonesia
- Calder, P. C., 1998. Immunoregulatory and Anti Inflammatory Effect of n-3 Polyunsaturated Acids, *Braz-j-med-Biol-Res.*, 31(4) : 467-490.
- 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. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology. *Br J Pharmacol*. Vol. 75 No. 3: 645-662
- Cleland, James, Proundman, dan Susana. 2003. *The Role of Fish Oil in the Treatment of Remathoid Arthritis*. *J. Drug*. Vol. 63 No. 9: 845-853.
- Dahlan, M. Sopiudin. 2009. Statistik untuk Kedokteran Kesehatan. Edisi 4. Jakarta : Salemba Medika
- Dewi, E.N., 1996. Isolasi Asam Lemak Omega-3 Dari minyak hasil limbah penepungan dan pengalengan ikan lemuru. Skripsi, Fateta, IPB-Bogor.
- Dewi, Ida Ayu Laksmi Puspita, I Made Damriyasa, I Ketut Anom Dada. 2013. Bioaktivitas Ekstrak Daun Tapak Dara (*Catharanthus Roseus*) Terhadap Periode Epitelisasi Dalam Proses Penyembuhan Luka Pada Tikus Wistar. *Central Study of Animal Disease (CSAD)*. Bali: Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.
- Dinas Kelautan dan Perikanan. 2010. Statistik Perikanan Budidaya Indonesia. Jakarta : Direktorat Jendral Perikanan Budidaya.

- Federer, W.T. 1991. *Statistics and society: data collection and interpretation 2nd ed.* New York: Marcel Dekker.
- Felson, D.T., 2008. *Osteoarthritis*. Dalam : Fauci, A., Hauser, L.S., Jameson, J.L., Ed. *HARRISON's Principles of Internal Medicine Seventeenth Edition*. New York, United States of America. McGraw-Hill Companies Inc. : 2158-2165.
- Green, E.A, and R.A. Flavell. 2000. The temporal importance of TNF- α expression in the development of arthritis rheumatoid. *Journal Immunity*, 12 : 459-469
- Grimble, R.F. and Tappia, P.S., 1998. Modulation of Pro Inflammatory Cytokines Biology by Unsaturated Fatty Acid Ratio, *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 18:417-442
- Hanafiah, K. A. 2010. *Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi*. Edisi 3. Jakarta, Rajawali Pers.
- Hay, A. 2010. Sardinella Lemuru. Scaly Mackerel from Sydney Fish Market.
- Hendrasaputra, D. 2008. Optimasi proses kristalisasi urea pada pembuatan konsentrat asam lemak omega-3 dari minyak hasil samping penepungan ikan lemuru (*sardinella longiceps*). Skripsi. Jurusan teknologi hasil pertanian. Universitas brawijaya. Malang.
- Herawati, Yessy. 2014. Pemberian Oral Ekstrak Daun Pegagan (*Centella Asiatica*) Lebih Banyak Meningkatkan Jumlah Kolagen Dan Menurunkan Ekspresi Mmp-1 Daripada Vitamin C Pada Tikus Wistar (*Rattus Norvegicus*) Yang Dipapar Sinar Uv-B. *Tesis*. Denpasar : Program Studi Ilmu Biomedik Universitas Udayana
- Indahyani, D.E. 2003. Potensi Minyak Ikan dalam Mencegah dan Mengobati Reumatoid Artritis. *Stomatognati*. I (1): 1-4.
- Indahyani, Pudyani, Al-Supartinah, Jonarta. 2003. Pengaruh Diet Minyak Jagung dan Minyak Ikan terhadap Ekspresi Osteoklas Periapikal Gigi pada Tikus. *J. Kedokteran Gigi Indonesia*. Vol. 10(3):31-36.

- Indahyani, D.E., Barid, I., Handayani, Ari. W. 2008. Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) Meregulasi Survival Osteoblas dan Osteoklas, Ekspresi Integrin Av β 3 Tulang Alveolaris serta Struktur Gigi pada Tikus yang Mengalami Infeksi Periodontal Selama Masa Odontogenesis. Dipublikasikan. *Laporan Hasil Penelitian*. Jember: Universitas Jember.
- Indonesian Rheumatology Assosiation IRA. 2014. Diagnosis dan penatalaksanaan osteoarthritis.
- Irianto, J., R. P. Martins, D. A. Lee. 2013. *The effect of osmotic challenge on levels of chromatin condensation and histone expressions in chondrocyte. In Orthopedic Research Society 2013 Annual Meeting*. San Antonio, TX.
- Jerosch, jorg. 2011. Effects of Glucosamine and Chondroitin Sulfate on Cartilage Metabolism in OA: Outlook on Other Nutrient Partners Especially Omega-3 Fatty Acids. *Int J Rheumatol*. Vol. 2011 : 2-3
- Johansson, Unell, Carisson, Derfeldt, Halling. 2003. Gender Difference in Symptoms Related to Temporomandibular disorders nn A Population of 50 Year Old Subjects. *J Orofac Pain*. Vol. 17 : 29-35
- Kelley, S., 1996. Dietary Fat and Human Immune Respone. *Inform*, 7(8): 852-858.
- Maria I. ; Harry Fadjar, dr., SpOT ; Diana Natalia, dr. 2012. Pattern of Distribution of Osteoarthritis Cases in RSU dr. Soedarso Pontianak Period of 1st January 2008 until 31st December 2009. Pontianak : Fakultas Kedokteran Tanjungpura.
- Misitahari, Made Ita. 2011. Pemberian *Growth Hormone* Menurunkan Kadar *Tumor Necrosis Factor (TNF-a)* Tikus Jatan yang Dislipidemia. Tesis. Denpasar : Universitas Udayana.
- Newton, I. S., 1996. Food Enrichment with Long-Chain n-3 PUFA. *Inform*, 7(2) : 169-178

- Notoatmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan Cetakan Ketiga*. Jakarta: Rineka Pustaka.
- Office of Animal Care and Use. 2011. *Guidelines for the Research Use of Adjuvant*. 18 Januari 2012. Oacu.od.nih.gov/ARAC/freunds.pdf.
- Ogura, N., Kondoh, T. 2015. Molecular Aspects In Inflammatory Events of Temporomandibular Joint: Microarray-Based Identification of Mediators. *Jpn Dent Sci Rev*. Vol. 51: 10-24
- Pantsulaia, I., Kalichman, L., dan Konyliansky, E. 2010. Association Between Radiographic Hand Osteoarthritis and RANKL, OPG, and Inflammatory Markers. *Osteoarthr cartilage*. Vol. 18: 1448-1463.
- Peck, M.D., 1994b, Interaction of Lipids with immune Funtion II: Experimental and Clinical Studies of Lipids and Immunity, *J. Nutr. Biochem.*, 5:514-521.
- Rasyid, A. 2001. Isolasi Asam Lemak Tak Jenuh Majemuk Omega-3 dari Ikan Lemuru (*Sardinella sp.*). *Prosiding Seminar Riptek Kelautan Nasional*. Jakarta.
- Raz, A., Kamin-Blesky, N., Przedeki, F., Obukowicz, M. G., 1997. Fish Oil Inhibits Λ -6 Denaturase Activity in-vivo : Utility in a Dietary Paradigm to Obtain Mice Depleted of Arachidonic Acid, *J. Nutr. Biochem.*, 8:558-565.
- Robin, Dwi Merry C. 2006. The Effect of Curcuninoid to The Collagen Fibers Density of Osteoarthritis of Temporomandibular Joint. *The Indonesian Journal of Dental Research* : 197-201
- Setiabudi, Andri. 2005. Perbandingan Ekspresi Sel T Cd4+ Di Jaringan Sekitar Luka Dengan Dan Tanpa Infiltrasi Levobupivakain Pada Nyeri Pasca Insisi. *Tesis*. Semarang : Progam Magister Ilmu Biomedik Dan Ppds I Universitas Diponegoro
- Setiyohadi, Bambang, Aru W. Sudoyo, Idrus Alwi, Marcellus Simadibrata K., Siti Setiati. 2009. Buku ajar Ilmu Penyakit Dalam Edisi kelima jilid III. Interna Publishing. Jakarta Pusat: hal 2538-2549, 2382.

- Simopoulus, A.P. 2002. Omega-3 Fatty Acid in Inflammation Autoimmune Disease. *Journal of the American College of Nutrition*. 21(6): 495-505.
- Soeroso, J., Isbagio, H., Kalim, H., Broto, R., dan Pramudiyo, R., 2006. Osteoarthritis. Dalam : Alwi, I., Sudoyo, A.W., dan Setiati, S., ed. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid II Edisi IV. Jakarta, Indonesia : Penerbit FKUI Pusat, 1195-1201.
- Solomon, L., A.Graham Apley, Henry J. Mankin. 2013. Buku Ajar Ortopedi dan Fraktur Sistem Apley. Jakarta : Edisi ke-7
- Solomon, L., Warwick, D., dan Nayagam S. 2014. *Apley and Solomon's Concise System of Orthopaedics and Trauma*. Fourth Edition. Liverpool; CRC Press.
- Tjokronegoro, A., Sudarsono, S. 1999. Metodologi Penelitian Bidang Kedokteran. Cetakan Ketiga. Jakarta : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. Hal: 22
- Universitas Jember. 2012. *Pedoman Penulisan Karya Ilmiah*. Jember : Badan Penerbit Universitas Jember
- World Health Organization (WHO), (2010). The Burden of Muskuloskeletal conditions at the start of the New Millenium.
- Winarno, FG., 1997. Kimia Pangan dan Gizi. Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Wiseman, H., 1996. Dietary Influence on Membrane Function Impertance in Protection AgaintOxidative Damage and Disease, *J. Nutr. Biochem*. 7:2-15

LAMPIRAN A. LEMBAR PERSETUJUAN ETIK

A.1a Halaman Pertama Lembar Persetujuan Etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN
Jalan Kalimantan 37 - Kampus Bumi Tegal Boto Jember 68121
Telepon (0331) 337877, 324446 *Faksimile (0331) 337877, 324446
E-mail : fk@unej.ac.id

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK

ETHICAL APPROVA

Nomor : 779 /H25.1.11/KE/2016

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

PENGARUH MINYAK IKAN LEMURU (*Sardinelle Longiceps*) TERHADAP EKSPRESI TUMOR NECROSIS FAKTOR (TNF- α) CARTILAGO YANG DIINDUKSI COMPLETE FREUND'S ADJUVANT

Nama Peneliti Utama : Kiki Andari (Nim: 122010101021)
Name of the principal investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 19 Februari 2016

dr. Rini Riyanti, Sp.PK

A.1b Halaman Keduan Lembar Persetujuan Etik

Tanggapan Anggota Komisi Etik

Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lain.

Saran Komisi Etik :

- Pemilihan, perawatan, perlakuan, pengorbanan dan pemusnahan hewan coba mengacu pada Pedoman Etik Penelitian Kesehatan.
- Mohon diperhatikan standarisasi pembuatan tikus model osteoarthritis.
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan minyak ikan lemuru
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan sediaan histopatologi organ agar didapatkan sediaan histopatologi yang memenuhi syarat pembacaan
- Pembacaan sediaan histopatologi dilakukan oleh seseorang yang kompeten serta dilakukan minimal oleh 2 orang.
- Pemeriksaan dan pembacaan sediaan histopatologi menggunakan metode blinding.

Jember, 19 Februari 2016



(dr. Rini Riyanti, Sp.PK)

LAMPIRAN B. DOKUMENTASI PENELITIAN



Gambar B.1 Ikan Lemuru yang telah dicuci.



Gambar B.2 Pembuatan minyak ikan.



Gambar B.3 Pembuatan minyak ikan menggunakan metode penguapan.



Gambar B.4 Pengambilan minyak ikan lemuru di permukaan.



Gambar B.5 Minyak ikan lemuru setelah disentrifuge, akan terpisah dari air dan lemak.



Gambar B.6 Induksi CFA secara intra-artikular pada sendi tibiofemoral kaki kanan tikus.



Gambar B.7 Hasil minyak ikan lemuru.



Gambar B.8 kaki kanan tikus mengalami pembengkakan 24 s/d 48 jam pasca induksi CFA.

LAMPIRAN C. DATA PENELITIAN

Nama Kelompok	Lapang pandang	Jumlah kondrosit yang mengekspresikan TNF- α			
		Skor 0/N	Skor 1/L	Skor 2/S	Skor 3/K
K-1.1	1	11.33	13.00	22.67	28.67
	2	11.00	14.33	10.00	34.33
	3	11.00	19.67	20.67	33.33
	4	10.67	18.33	23.33	21.67
	5	11.00	17.00	22.67	31.33
K-1.2	1	18.67	21.00	12.33	39.33
	2	6.00	21.00	22.00	20.00
	3	8.67	30.00	41.33	28.67
	4	22.33	25.67	31.00	21.33
	5	20.67	28.00	23.33	21.33
K-1.3	1	13.33	13.00	23.33	49.33
	2	9.00	18.67	19.67	22.33
	3	8.33	16.00	37.67	15.67
	4	12.67	16.00	35.67	18.67
	5	5.33	18.67	25.67	23.33
K-1.4	1	8.67	25.67	19.33	20.33
	2	9.67	29.67	21.33	24.00
	3	13.00	15.00	14.33	19.33
	4	13.67	21.67	20.67	30.33
	5	9.67	15.67	24.33	34.00
K-2.1	1	8.67	15.67	19.33	20.33
	2	6.33	26.33	24.67	27.33
	3	13.00	25.00	14.33	29.33
	4	7.00	15.00	17.33	30.33
	5	16.33	15.67	24.33	34.00
K-2.2	1	10.00	20.67	15.00	12.33
	2	7.33	6.67	22.33	40.00
	3	6.33	14.33	15.00	27.33
	4	6.00	17.67	23.33	38.33
	5	7.67	17.33	31.67	31.33
K-2.3	1	11.67	13.67	18.33	33.67
	2	16.33	18.00	19.00	30.67
	3	11.67	19.67	20.00	31.33
	4	7.33	12.33	22.00	22.67
	5	22.00	13.00	27.00	31.33

K-2.4	1	19.00	19.33	22.67	29.33
	2	12.00	20.00	16.67	23.33
	3	13.00	31.00	15.67	30.00
	4	17.33	23.67	25.67	22.33
	5	12.67	20.67	7.33	38.33
K-3.1	1	11.33	12.33	29.67	41.67
	2	11.33	20.00	17.33	27.67
	3	11.33	10.00	31.67	32.00
	4	8.33	19.33	13.67	30.33
	5	9.00	19.00	24.33	35.33
K-3.2	1	10.67	19.33	16.00	38.67
	2	8.67	9.00	14.33	13.33
	3	10.67	23.00	14.33	39.00
	4	8.33	16.67	18.00	15.67
	5	8.67	18.33	22.33	26.67
K-3.3	1	10.00	37.00	35.00	26.00
	2	14.33	24.00	25.67	24.33
	3	14.00	18.67	25.33	21.33
	4	9.33	15.00	18.67	26.33
	5	8.67	13.67	23.67	34.67
K-3.4	1	7.00	21.67	17.67	15.00
	2	14.67	25.33	12.00	52.67
	3	14.00	34.33	14.00	28.33
	4	11.33	33.67	17.00	55.00
	5	10.67	21.33	23.33	47.67
P1.1	1	10.33	8.67	14.33	13.67
	2	10.67	29.00	16.67	20.67
	3	10.00	17.00	16.00	21.33
	4	17.33	14.00	22.33	18.67
	5	15.67	28.33	23.00	16.67
P1.2	1	12.67	15.00	21.33	21.00
	2	11.00	14.00	18.67	24.33
	3	14.67	12.67	16.00	19.67
	4	15.00	8.67	16.33	22.33
	5	36.67	14.00	16.33	25.33
P1.3	1	14.33	13.67	17.67	18.33
	2	14.67	10.00	6.00	6.00
	3	6.67	9.33	3.33	20.00
	4	15.00	5.67	15.33	12.33
	5	13.67	8.67	16.33	26.00
P1.4	1	30.33	22.00	24.33	23.33

	2	20.67	13.33	29.33	28.67
	3	28.00	20.00	17.00	22.33
	4	22.00	16.00	17.33	32.67
	5	23.00	18.00	14.33	23.00
P2.1	1	18.00	9.67	17.33	23.33
	2	30.00	10.33	23.00	24.33
	3	29.67	14.67	13.67	10.00
	4	21.67	16.00	14.67	23.00
	5	21.00	16.00	19.00	32.67
P2.2	1	26.67	4.00	10.00	10.67
	2	21.67	11.00	14.33	18.67
	3	22.33	14.00	20.67	24.67
	4	23.00	6.33	9.33	14.33
	5	14.33	9.33	13.33	20.67
P2.3	1	31.00	24.33	19.67	19.33
	2	26.00	12.33	23.00	18.00
	3	17.33	15.00	26.67	22.67
	4	18.33	24.00	16.33	26.67
	5	10.00	21.00	9.33	8.00
P2.4	1	37.00	11.67	33.67	21.67
	2	21.67	16.33	20.67	26.00
	3	41.00	12.67	19.33	17.67
	4	40.67	14.33	22.00	33.00
	5	35.67	12.67	20.33	28.33
P3.1	1	10.67	12.00	14.33	22.33
	2	51.67	17.00	7.00	12.33
	3	9.00	16.33	16.33	20.33
	4	35.67	14.67	15.67	22.00
	5	34.33	9.67	19.00	14.00
P3.2	1	24.67	14.67	17.00	26.00
	2	14.67	15.67	15.67	12.00
	3	22.00	11.00	9.00	17.00
	4	29.33	13.00	7.33	15.00
	5	32.67	16.00	13.67	12.67
P3.3	1	21.67	14.33	18.00	10.67
	2	15.00	5.67	27.67	14.33
	3	38.33	21.33	20.67	9.00
	4	31.00	13.67	22.67	11.00
	5	13.33	17.67	18.33	19.33
P3.4	1	17.67	16.00	11.33	16.00
	2	36.67	10.33	10.00	11.33

	3	24.33	14.67	15.33	17.33
	4	30.67	15.00	16.33	15.00
	5	13.67	9.33	13.33	25.00



LAMPIRAN D. ANALISIS DATA

F.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Tests of Normality

	Ktota	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	l	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
TNFatotal	P1	.243	4	.	.952	4	.726
	P2	.188	4	.	.977	4	.886
	P3	.352	4	.	.836	4	.184
	K-1	.250	4	.	.927	4	.579
	K-2	.250	4	.	.952	4	.731
	K-3	.272	4	.	.932	4	.604

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

TNFatotal

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.279	5	18	.316

F.2 Uji One Way Anova

ANOVA

TNFatotal

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9950.567	5	1990.113	42.964	.000
Within Groups	833.770	18	46.321		
Total	10784.337	23			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TNFatotal

LSD

(I) Ktotal	(J) Ktotal	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
P1	P2	16.08750*	4.81251	.004	5.9768	26.1982
	P3	26.23000*	4.81251	.000	16.1193	36.3407
	K-1	-19.75000*	4.81251	.001	-29.8607	-9.6393
	K-2	-24.42000*	4.81251	.000	-34.5307	-14.3093
	K-3	-26.18000*	4.81251	.000	-36.2907	-16.0693
P2	P1	-16.08750*	4.81251	.004	-26.1982	-5.9768
	P3	10.14250*	4.81251	.049	.0318	20.2532
	K-1	-35.83750*	4.81251	.000	-45.9482	-25.7268
	K-2	-40.50750*	4.81251	.000	-50.6182	-30.3968
	K-3	-42.26750*	4.81251	.000	-52.3782	-32.1568

P3	P1	-26.23000 *	4.81251	.000	-36.3407	-16.1193
	P2	-10.14250 *	4.81251	.049	-20.2532	-.0318
	K-1	-45.98000 *	4.81251	.000	-56.0907	-35.8693
	K-2	-50.65000 *	4.81251	.000	-60.7607	-40.5393
	K-3	-52.41000 *	4.81251	.000	-62.5207	-42.2993
K-1	P1	19.75000 *	4.81251	.001	9.6393	29.8607
	P2	35.83750 *	4.81251	.000	25.7268	45.9482
	P3	45.98000 *	4.81251	.000	35.8693	56.0907
	K-2	-4.67000	4.81251	.345	-14.7807	5.4407
	K-3	-6.43000	4.81251	.198	-16.5407	3.6807
K-2	P1	24.42000 *	4.81251	.000	14.3093	34.5307
	P2	40.50750 *	4.81251	.000	30.3968	50.6182
	P3	50.65000 *	4.81251	.000	40.5393	60.7607
	K-1	4.67000	4.81251	.345	-5.4407	14.7807
	K-3	-1.76000	4.81251	.719	-11.8707	8.3507
K-3	P1	26.18000 *	4.81251	.000	16.0693	36.2907
	P2	42.26750 *	4.81251	.000	32.1568	52.3782
	P3	52.41000 *	4.81251	.000	42.2993	62.5207
	K-1	6.43000	4.81251	.198	-3.6807	16.5407
	K-2	1.76000	4.81251	.719	-8.3507	11.8707

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.