Digital Repository Universitas Jember

PENGARUH MINYAK IKAN LEMURU (*Sardinella longiceps)* TERHADAP EKSPRESI *IL-1β* KARTILAGO SENDI TIKUS YANG DIINJEKSI *CFA*

SKRIPSI

Oleh

Muhammad Nur Arifin
NIM 122010101023

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016

Digital Repository Universitas Jember

PENGARUH MINYAK IKAN LEMURU (*Sardinella longiceps)* TERHADAP EKSPRESI *IL-1β* KARTILAGO SENDI TIKUS YANG DIINJEKSI *CFA*

SKRIPSI

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

Oleh

Muhammad Nur Arifin
NIM 122010101023

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016

Digital Repository Universitas Jember

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Tuhan Yang Maha Esa atas limpahan rahmat-Nya dalam setiap langkah;
2. Orangtua saya Ayah Agus Zainul Arifin dan Mamah Supriyati yang senantiasa memberikan doa, dukungan, serta kasih sayang kepada saya;
3. Kakak Lutfiah Sari Gumelar, Adik Amalia Aulia Rahmah dan Rizki Maulana Muhammad;
4. Para pahlawan tanpa tanda jasa dari taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah memberikan ilmunya;
5. Sahabat-sahabat yang senantiasa saling mengingatkan dan menasihati dalam kebaikan dan kesabaran;
6. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Digital Repository Universitas Jember

MOTTO

Maka, sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan.*)

Sungguh, orang-orang yang beriman dan mengerjakan kebajikan , mereka itu adalah sebaik-baik makhluk. **)

Sebaik-baik manusia adalah yang paling bermanfaat bagi manusia lainnya. ***)

---

*) Qura'an Surat Al Insyirah ayat 6

**) Qur'an Surat Al Bayyinah ayat 7

***) Hadist Riwayat Athabarani, Al Mu'jam Al Awsath No. 5787

Digital Repository Universitas Jember

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama: Muhammad Nur Arifin

NIM: 122010101023

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul "Pengaruh Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps)* terhadap Ekspresi *IL-1β* Kartilago Sendi Tikus yang Diinjeksi *CFA*" 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, 30 Agustus 2016

Yang menyatakan,

Muhammad Nur Arifin

NIM 122010101023

Digital Repository Universitas Jember

SKRIPSI

PENGARUH MINYAK IKAN LEMURU (*Sardinella longiceps)* TERHADAP EKSPRESI *IL-1β* KARTILAGO SENDI TIKUS YANG DIINJEKSI *CFA*

Oleh

Muhammad Nur Arifin

NIM 122010101023

Pembimbing :

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

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. dr. Aris Prastyo, M. Kes.

Digital Repository Universitas Jember

PENGESAHAN

Skripsi berjudul "Pengaruh Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps)* terhadap Ekspresi *IL-1β* Kartilago Sendi Tikus yang Diinjeksi *CFA*" telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Selasa, 25 September 2016

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji,

Penguji I,	Penguji II,
dr. Al Munawir, M. Kes, Phd	dr. Muh. Hasan, M. Kes. Sp.OT
NIP. 19690901 199903 1 003	NIP 19690411 199903 1 001
Penguji III,	Penguji IV,
dr. Rena Normasari, M. Biomed	Dr. Dr. Aris Prasetyo, M. Kes
NIP 19830512 200812 2 002	NIP 19690203 199903 1 001

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember

dr. Enny Suswati, M. Kes

NIP 19700214 199903 2 001

Digital Repository Universitas Jember

RINGKASAN

Pengaruh Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps)* terhadap Ekspresi *IL-1β* Kartilago Sendi Tikus yang Diinjeksi *CFA*; Muhammad Nur Arifin; 122010101023; 2016; 62 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Osteoartritis merupakan suatu kelainan kronis sendi sinovial yang kompleks dimana terjadi destruksi dari kartilago, pembentukan kista dan sklerosis di tulang subkondral, sinofitis ringan, fibrosis kapsula sendi, disertai pembentukan osteofit. Kerusakan kartilago sendi lutut mengakibatnya terganggunya fungsi kartilago dalam meredam tekanan pada saat pembebanan sendi mengakibatkan terjadi perubahan morfologis sendi lutut. Di Indonesia terdapat sejumlah 34,3 kasus pada 2002 dan mencapai 36,5 juta kasus pada 2007. Prevalensi OA cenderung meningkat dengan bertambahnya usia. Secara khusus prevalensi OA di Indonesia juga cukup tinggi yaitu 5% pada usia <40 tahun, 30% pada usia 40-60 tahun dan 65% pada usia > 61 tahun, dengan jumlah penderita wanita lebih banyak dari laki-laki. *Intrleukin-1β* (*IL-1β)* serta beberapa sitokin proinflamasi lain memiliki peran dalam dalam proses kerusakan kartilago dan beberapa proses patologis lain. Sitokin ini memiliki efek yang merusak fungsi kondrosit dan integritas *matrix extracelullar*. Ketika sitokin ini berikatan dengan reseptor *IL-1* (*IL-1RI*) *IL-1β* dapat memicu tranduksi sinyal yang memicu peningkatan kadar Ca^{2+} *intracellular*, aktivasi Protein Kinase C, dan lain-lain yang dapat memicu peningkatan apoptosis dan nekrosis.

Terapi OA yang digunakan masih berfokus pada pengurangan rasa nyeri yaitu *NSAID*, sementara itu belum ada obat yang mengurangi progresivitas destruksi dari kartilago,. Selain itu, obat ini sering menyebabkan efek samping yang merugikan jika digunakan dalam jangka panjang. Efek yang paling ringan berupa mual, nyeri lambung, dispepsia sampai yang paling serius seperti timbul lesi, perdarahan bahkan perforasi pada saluran pencernaan. Salah satu terapi alternatif yang dapat digunakan adalah suplemen minyak ikan. Ikan laut mengandung asam omega 3 yaitu

Digital Repository Universitas Jember

eicosapentaenoid acid (*EPA*) dan *docohexaenoic acid* (*DHA*) yang sangat bermanfaat bagi kesehatan. Kandungan asam lemak tak jenuh pada ikan lemuru (*Sardinella longicep*) jika dibandingkan dengan jenis minyak ikan lainnya merupakan yang paling besar. *EPA* dan *DHA* ini mampu meminimalisasi agregasi platelet dan rangsangan monosit untuk menyintesis *IL-1β* dan mediator inflamasi lain sehingga destruksi dari kartilago menjadi lebih minimal. Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh minyak ikan lemuru terhadap ekspresi *IL-1β* pada kartilago sendi tikus yang diinjeksi *CFA*.

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian *True Experimental* dengan menggunakan *Randomized Post Test Only Control Group Design*, dilaksanakan pada Bulan Januari-Juli 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* putih jantan dengan berat 300-350 gram yang berumur 3-5 bulan. Jumlah sampel adalah 24 ekor tikus yang terbagi kedalam 2 kelompok, yaitu: kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan. Kemudian, masing-masing kelompok dibagi menjadi 3 sub kelompok, yaitu kelompok 7 hari, 14 hari, dan 21 hari. Masing-masing kelompok berisikan 4 ekor tikus. Pada semua kelompok diinjeksi *CFA* 0,08 ml secara intra-artikular pada sendi tibiofemoral untuk mendapatkan model tikus osteoartritis. Setelah 6 minggu pasca injeksi *CFA*, kelompok perlakuan di berikan minyak ikan lemuru selama 7, 14 dan 21 hari, sedangkan kelompok kontrol negatif tidak, lalu didekapitasi. Selanjutnya pengambilan dan pembuatan preparat jaringan sendi tibiofemoral serta pewarnaan *Imunohistokimia* dan pengamatan ekspresi *IL-1β* yang didapatkan dari skor histologi. Variabel bebas pada penelitian ini adalah lama pemberian minyak ikan lemuru dan variabel terikat adalah ekspresi *IL-1β*.

Pada penelitian ini didapatkan data skor ekspresi *IL-1β* pada kelompok kontrol negatif secara berturut-turut K-1, K-2, dan K-3 memiliki rata-rata skor *IL-1β* sebesar 179,85; 178,38; dan 169,30. Sedang pada kelompok perlakuan secara

Digital Repository Universitas Jember

berturut-turut P1, P2, dan P3 memiliki rata-rata skor *IL-1β* 153,91; 147,10; dan 141,07. Dari data tersebut kemudian dilakukan uji *kruskal-wallis* dan didapatkan perbedaan yang signifikan dengan nilai signifikansi p= 0,001. Kemudian dilakukan uji *post hoc Mann-Whitney* didapatkan hasil dengan nilai signifikansi p= 0,021 pada tiap kelompok, namun antara kelompok kontrol didapatkan hasil yang tidak signifikan. Hasil tersebut menunjukkan skor ekspresi *IL-1β* yang pada kelompok perlakuan lebih kecil dibandingkan kelompok kontrol negatif pada hari ke-7, 14, dan 21. Didapatkan pula skor ekspresi *IL-1β* yang paling kecil pada kelompok perlakuan di hari ke-21. Hal ini dikarenakan pemberian *EPA* dan *DHA* dalam jangka waktu lama mampu mempengaruhi struktur *AA* sehingga menurunkan induksi monosit dalam memproduksi *IL-1β.* Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data dapat disimpulkan bahwa minyak ikan lemuru dapat menurunkan ekspresi *intrleukin-1β* kartilago sendi tikus *Sprague dawley* jantan yang diinjeksi *Complete Freund's Adjuvant.*

Digital Repository Universitas Jember

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 *IL-1β* Kartilago Sendi Tikus yang Diinjeksi *CFA*". 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. Orangtua saya Ayah Agus Zainul Arifin dan Mamah Supriyati yang senantiasa memberikan doa, dukungan, serta kasih sayang, tanpa kenal lelah;
2. Kakak Lutfiah Sari Gumelar, Adik Amalia Aulia Rahmah dan Rizki Maulana Muhammad;
3. dr. Enny Suswati, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
4. dr. Irawan Fajar Kusuma M.Sc. dan dr. Roni Prasetyo, selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
5. dr. Rena Normasaris M. Biomed selaku dosen pembimbing utama dan Dr. dr. Aris Prasetyo selaku dosen pembimbing anggota yang telah banyak membantu penulisan skripsi ini sejak awal hingga akhir;
6. dr. Al Munawir, M. Kes, Phd dan dr. Muh. Hasan, M. Kes. Sp.OT sebagai dosen penguji yang berkenan memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
7. seluruh civitas akadmika Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
8. sahabat sekaligus rekan kerja terbaik, Kiki Andari, Erdito Muro Suyono, Raditya Rangga, Aditya Widya Permana, Gilang Vigorous, Bagus Indra Kusuma, Henggar Allest Pratama, dan Imam Adi Nugroho atas segala kerja

Digital Repository Universitas Jember

sama, bantuan, semangat, dan motivasi yang selalu diberikan dalam menyelesaikan penelitian dan skripsi ini;

9. analis Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Agus, A.Md., yang telah banyak membantu dalam penelitian ini;
10. keluarga besar PANACEA FK UNEJ 2012 yang telah menemani dan menjadi sahabat dalam perjuangan selama menjadi mahasiswa;
11. Saudara dan Saudari dalam IMSAC FK UNEJ yang telah menjadi inspirasi dan motivasi dalam kehidupan dan pembelajaran selama di Jember;
12. semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu

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, 30 Agustus 2016

Penulis

Digital Repository Universitas Jember

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN SAMPUL i
HALAMAN JUDUL ii
HALAMAN PERSEMBAHAN iii
HALAMAN MOTTO iv
HALAMAN PERNYATAAN v
HALAMAN PEMBIMBINGAN vi
HALAMAN PENGESAHAN vii
RINGKASAN viii
PRAKATA xi
DAFTAR ISI xiii
DAFTAR TABEL xvi
DAFTAR GAMBAR xvii
BAB 1. PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 3
1.3 Tujuan 4
1.4 Manfaat 4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA 5
2.1 Osteoartritis 5
2.1.1 Definisi 5
2.1.2 Klasifikasi 5
2.1.3 Patogenesis 6
2.1.4 Peran *IL-1β* 9
2.1.5 Tanda dan gejala 10
2.1.6 Faktor risiko 11
2.1.7 Diagnosis 14
2.1.8 Grading 15

Digital Repository Universitas Jember

2.1.9 Penatalaksanaan 16
2.2 Ikan Lemuru 18
2.3 Minyak Ikan Lemuru 19
2.4 *Complete Freund's Adjuvant* 21
2.5 Kerangka Konseptual Penelitian 22
2.6 Hipotesis Penelitian 23
BAB 3. METODE PENELITIAN 24
3.1 Jenis Penelitian 24
3.2 Rancangan Penelitian 24
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian 25
3.3.1 Populasi 25
3.3.2 Sampel 25
3.3.3 Besar sampel 25
3.3.4 Kriteria sampel 26
3.3.5 Pengelompokan sampel 26
3.4 Tempat dan Waktu penelitian 26
3.4.1 Tempat penelitian 26
3.4.2 Waktu penelitian 26
3.5 Variabel Penelitian 26
3.5.1 Variabel bebas 26
3.5.2 Variabel terikat 26
3.5.3 Variabel kontrol 27
3.6 Definisi Operasional 27
3.6.1 OA 27
3.6.2 Minyak ikan lemuru 27
3.6.3 *IL-1β* 28
3.7 Alat dan Bahan 28
3.7.1 Pembuatan minyak ikan 28
3.7.2 Perawatan hewan coba 28

Digital Repository Universitas Jember

3.7.3 Perlakuan hewan coba 28
3.7.4 Dekapitasi dan pengambilan sampel 28
3.7.5 Pembuatan dan pewarnaan preparat 29
3.8 Dosis 29
3.8.1 Dosis ketamin 29
3.8.2 Dosis minyak ikan lemuru 29
3.8.3 Dosis *CFA* 29
3.9 Prosedur Penelitian 29
3.9.1 Ethical clearance 29
3.9.2 Persiapn Sampel 30
3.9.3 Ekstraksi minyak ikan lemuru 30
3.9.4 Pengelompokan perlakuan hewan coba 31
3.9.5 Pembuatan sediaan histologis 31
3.9.6 Pewarnaan immunohistokimia 32
3.9.7 Pengamatan histopatologi 33
3.9.8 Analisis data 35
3.10 Alur Penelitian 36
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN 37
4.1 Hasil 37
4.2 Analisis 40
4.3 Pembahasan 40
BAB 5. Penutup 43
5.1 Kesimpulan 43
5.2 Saran 43
DAFTAR PUSTAKA 44
LAMPIRAN 50

Digital Repository Universitas Jember

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1	Diagnosis ostoarthritis dari ACR.....	15
Tabel 2.2	Terapi nonfarmakologis OA.....	16
Tabel 2.3	Terapi farmakologis OA.....	17
Tabel 2.4	Perbedaan persentase kandungan *EPA* dan *DHA* pada ikan	19
Tabel 4.1	Skor rata-rata *IL-1β*	39
Tabel 4.2	Hasil analisis *Mann-Whitney*.....	40

Digital Repository Universitas Jember

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Ikan lemuru *Sardinella longiceps*	19
Gambar 2.2	Struktur *AA*, *EPA*, dan *DHA*	20
Gambar 2.3	Kerangka konsep	22
Gambar 3.1	Rancangan penelitian	24
Gambar 3.2	Pengamatan histologi pewarnaan Imunohistokimia	34
Gambar 3.3	Skema alur perlakuan hewan coba	36
Gambar 4.1	Foto preparat kelompok hari ke-7, 14 dan 21	38
Gambar 4.2	Grafik skor rata-rata ekspresi *IL-1β*	39

Digital Repository Universitas Jember

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Osteoartritis (OA) merupakan penyakit reumatik yang paling umum ditemukan di seluruh dunia (Bethesda, 2002). Di Indonesia terdapat sejumlah 34,3 juta orang pada tahun 2002 dan mencapai 36,5 juta orang pada tahun 2007. Prevalensi OA cenderung meningkat dengan bertambahnya usia (Kertia *et al*, 2005). Secara khusus prevalensi OA di Indonesia juga cukup tinggi yaitu 5% pada usia <40 tahun, 30% pada usia 40-60 tahun dan 65% pada usia > 61 tahun, dimana jumlah penderita wanita lebih banyak dari laki-laki (Handayani, 2008).

OA merupakan suatu kelainan kronis sendi sinovial yang kompleks dimana terjadi destruksi dari kartilago, pembentukan kista dan sklerosis di tulang subcondral disertai pembentukan osteofit. Kerusakan kartilago sendi lutut mengakibatnya terganggunya fungsi kartilago dalam meredam tekanan pada saat pembebanan sendi mengakibatkan terjadi perubahan morfologis sendi lutut (Solomon and Warwick, 2010). Masalah utama yang ditimbulkan pada penderita OA adalah disabilitas. Di seluruh dunia, OA menempati urutan keempat penyebab disabilitas dan dari sekian banyak penyakit rematik, OA menempati urutan pertama penyebab disabilitas. Orang diatas usia 70 tahun, 40 % diantaranya menderita OA lutut, 80 % pasien dengan OA mempunyai keterbatasan gerak, dan 25 % tidak dapat melakukan aktivitas pokok harian (Soeroso, 2007).

Melalui penjabaran di atas kita dapat mengetahui bahwa OA memiliki pengaruh yang besar terhadap kehidupan penderitanya, namun terapi yang digunakan masih berfokus pada pengurangan rasa nyeri, sementara itu belum ada obat yang mengurangi progresivitas destruksi dari kartilago. Terapi nonfarmakologi menjadi upaya pertama dalam manajemen OA, dan jika diperlukan terapi obat bisa diberikan (Wright, 2008). Terapi farmakologi utama yang direkomendasikan oleh *Indonesia Rheumatologist Association* adalah pemberian acetaminophen untuk nyeri ringan hingga sedang. Untuk terapi sedang hingga berat atau apabila pemberian

Digital Repository Universitas Jember

asetaminofen gagal maka dapat diberikan NSAID untuk jangka waktu pendek (Katzung, 2004). Namun, obat ini sering menyebabkan efek samping yang merugikan jika digunakan dalam jangka panjang. Efek yang paling ringan berupa mual, nyeri lambung, dispepsia sampai yang paling serius seperti timbul lesi, perdarahan bahkan perforasi pada saluran pencernaan (Bachtiar, 2010). Oleh karena itu dibutuhkan adanya pengobatan alternatif yang aman dari efek samping.

Salah satu terapi alternatif yang dapat digunakan adalah suplemen minyak ikan. Ikan laut mengandung asam omega 3 yaitu *eicosapentaenoid acid* (*EPA*) dan *docohexaenoic acid* (*DHA*) yang sangat bermanfaat bagi kesehatan (Indahyani, 2003). Kandungan asam lemak tak jenuh pada ikan lemuru (*Sardinella longicep*) jika dibandingkan dengan jenis minyak ikan lainnya merupakan yang paling besar (Harmayani *et al*, 2000). Ikan lemuru mengandung *EPA* dan *DHA* sebesar 18% dan 13% (Dewi, 1996).

Dikarenakan memiliki kesamaan struktur, *EPA* dapat menjadi substrat kompetitor dari asam arakidonat, sehingga enzim siklooksigenase yang harusnya mengubah *AA* menjadi prostaglandin H_2 (PGH_2), bergeser mengubah *EPA* menjadi prostaglandin H_3 (PGH_3). PGH_2 dapat diubah menjadi prostaglandin E_2 (PGE_2) yang berperan dalam rangsangan nyeri pada OA. Selain itu PGH_2 juga dapat diubah menjadi tromboxan A_2 (TXA_2) yang berperan dalam agregasi platelet dan sintesis *Interleukin-1β* (*IL-1β*) oleh monosit serta mediator inflamasi lain yang mampu meningkatkan enzim proteolitik seperti *matrix metalloproteinase* (*MMP*), *collagenase*, dan stromelysin yang berperan dalam destruksi kartilago pada OA. Sedangkan *EPA*, oleh enzim siklooksigenase diubah menjadi PGE_3 dan TXA_3. PGE_3 memiliki efek yang lebih minimal dalam merangsang rasa nyeri begitu pula dengan TXA_3 yang memiliki efek minimal dalam agregasi platelet dan rangsangan monosit untuk menyintesis *IL-1β* dan mediator inflamasi lain sehingga destruksi dari kartilago menjadi lebih minimal (Cleland *et al*, 2003).

Digital Repository Universitas Jember

IL-1β serta beberapa sitokin proinflamasi lain memiliki peran dalam dalam proses kerusakan kartilago dan beberapa proses patologis lain. Sitokin ini memiliki efek yang merusak fungsi kondrosit dan integritas *matrix extracelullar*. Ketika sitokin ini berikatan dengan reseptor *IL-1* (*IL-1RI*) *IL-1β* dapat memicu tranduksi sinyal yang memicu peningkatan kadar Ca^{2+} *intracellular*, aktivasi Protein Kinase C, dan lain-lain yang dapat memicu peningkatan apoptosis dan nekrosis. Saha *et al* (1999) menyatakan adanya peningkatan *IL-1β* pada kartilago manusia yang mengidap OA , selain itu Smith (1997) menemukan adanya *IL-1β* pada membran sinovial dengan penurunan rasio signifikan *IL-1Ra/IL-1ß* seiring menigkatnya *grade* OA (Daheshia, 2008).

Dalam penelitian ini digunakan *Complete Freund's Adjuvant* (*CFA*) sebagai penginduksi OA. *CFA* adalah suspensi mineral minyak yang mengandung micobacterium mati dan diemulsifikasi bersama larutan antigen untuk kemudian dibentuk sebagai emulsi air dalam minyak (OACU, 2011). Pada hewan coba, induksi Complete Freund's Adjuvant (*CFA*) menyebabkan respons inflamasi (Prabowo, 2005). Selain itu, *CFA* juga telah terbukti meningkatkan *IL-1β* pada kartilago sebagai efek dari respon inflamasi (Wibowo *et al*, 2012).

Berdasarkan latar belakang di atas, penulis ingin meneliti pengaruh minyak ikan lemuru *(Sardinella longiceps)* terhadap ekspresi *IL-1β* kartilago sendi tikus *Sprague dawley* jantan yang diinduksi OA dengan menggunakan *Complete Freund's Adjuvant*.

1.1 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, permasalahan yang timbul adalah bagaimana pengaruh minyak ikan lemuru *(Sardinella longiceps)* terhadap ekspresi *IL-1β* kartilago sendi tikus *Sprague dawley* jantan yang diinjeksi *Complete Freund's Adjuvant*?

Digital Repository Universitas Jember

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian adalah untuk mengkaji pengaruh minyak ikan lemuru *(Sardinella longiceps)* terhadap ekspresi *IL-1β* kartilago sendi tikus *Sprague dawley* jantan yang diinjeksi *Complete Freund's Adjuvant*.

1.4 Manfaat

Bersarkan tujuan yang telah diuraikan, manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

a. Bagi penderita OA, karya tulis ini dapat dijadikan informasi ilmiah tentang pengaruh minyak ikan lemuru terhadap penyakit OA.
b. Bagi peneliti, karya tulis ini dapat menjadi tambahan wawasan dan pengetahuan serta mengaplikasikan teori yang telah diperoleh dan dapat menjadi wahana pengetahuan bagi peneliti selanjutnya yang tertarik untuk meneliti tentang pengaruh minyak ikan lemuru *(Sardinella longiceps)* terhadap OA.
c. Bagi Universitas Jember, karya tulis ini dapat digunakan sebagai sumber rujukan dan memperkaya kajian pustaka fakultas kedokteran.

Digital Repository Universitas Jember

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Osteoartritis

2.1.1 Definisi

Osteoartritis (OA) merupakan penyakit sendi degeneratif kronik dimana terjadi penipisan progresif dan disintegrasi dari kartilago artikular, pembentukan osteofit, pembentukan kista dan sklerosis pada tulang subkondral serta sinofitis ringan dan fibrosis kapsula sendi. Penyakit ini sering disamakan dengan *degenerative arthritis, hypertrophic arthritis,* dan *degenerative joint disease,* Namun hal ini merupakan suatu kesalahan, karena pada OA tidak hanya kerusakan sel, namun terdapat proses yang lebih kompleks, dimana bukan hanya terjadi destruksi tapi juga terjadi proses repair pada sendi (Solomon and Warwick, 2010). OA adalah bentuk artritis yang paling umum terjadi yang mengenai mereka di usia lanjut atau usia dewasa dan salah satu penyebab terbanyak kecacatan di negara berkembang (Price & Wilson, 2003)

2.1.2 Klasifikasi

OA diklasifikasikan menjadi 2 golongan, yaitu OA primer dan OA sekunder (Altman *et al*, 2001).

a. OA primer

Osteoartritis primer atau dapat disebut osteoartritis idiopatik, adalah osteoartrhritis yang tidak memiliki penyebab yang pasti dan tidak disebabkan oleh penyakit sistemik maupun proses perubahan lokal sendi (Soeroso, 2007).

b. OA sekunder

OA sekunder adalah OA yang disebabkan oleh penyakit atau kondisi lainnya seperti pada post-traumatik, kelainan kongenital dan pertumbuhan (baik lokal maupun generalisata), kelainan tulang dan sendi, penyakit akibat deposit kalsium, kelainan endokrin, metabolik, inflamasi, imobilitas yang terlalu lama, serta faktor

Digital Repository Universitas Jember

risiko lainnya seperti obesitas, operasi yang berulangkali pada struktur-struktur sendi, dan sebagainya (Sergent *et al*, 2009).

2.1.3 Patogenesis

OA selama ini dipandang sebagai akibat dari suatu proses ketuaan yang tidak dapat dihindari. Namun, saat ini penelitian para pakar menyatakan bahwa OA ternyata merupakan penyakit gangguan homeostasis dari metabolisme kartilago dengan kerusakan struktur proteoglikan kartilago yang penyebabnya belum diketahui. Jejas mekanis dan kimiawi diduga merupakan faktor penting yang merangsang terbentuknya molekul abnormal dan produk degradasi kartilago di dalam cairan sinovial sendi yang mengakibatkan terjadi inflamasi sendi, kerusakan kondrosit, dan nyeri. Jejas mekanik dan kimiawi pada sinovial sendi yang terjadi multifaktorial antara lain karena faktor umur, humoral, genetik, obesitas, stress mekanik atau penggunaan sendi yang berlebihan, dan defek anatomik (Setiati *et al*, 2006)

Kartilago sendi merupakan target utama perubahan degeneratif pada OA. Kartilago sendi ini secara umum berfungsi untuk membuat gerakan sendi bebas gesekan karena terendam dalam cairan sinovial dan sebagai *absorb shock*, penahan beban dari tulang. Pada OA, terjadi gangguan homeostasis dari metabolisme kartilago sehingga terjadi kerusakan struktur proteoglikan kartilago, erosi kartilago, dan penurunan cairan sendi (Yanuarty, 2014).

Kartilago sendi dibentuk oleh sel kondrosit dan matriks ekstraseluler, yang terutama terdiri dari air (65%-80%), proteoglikan, dan jaringan kolagen. Kondrosit berfungsi menyintesis jaringan lunak kolagen tipe II untuk penguat sendi dan proteoglikan untuk membuat jaringan tersebut elastis, serta memelihara matriks kartilago sehingga fungsi bantalan rawan sendi tetap terjaga dengan baik. Kartilago tidak memiliki pembuluh darah sehingga proses perbaikan pada kartilago berbeda dengan jaringan-jaringan lain. Di kartilago, tahap perbaikannya sangat terbatas mengingat kurangnya vaskularisasi dan respon inflamasi sebelumnya (Yanuarty, 2014).

Digital Repository Universitas Jember

Secara umum, kartilago akan mengalami replikasi dan memproduksi matriks baru untuk memperbaiki diri akibat jejas mekanis maupun kimiawi. Namun dalam hal ini, kondrosit gagal menyintesis matriks yang berkualitas dan memelihara keseimbangan antara degradasi dan sintesis matriks ekstraseluler, termasuk produksi kolagen tipe I, III, VI, dan X yang berlebihan dan sintesis proteoglikan yang pendek. Akibatnya, terjadi perubahan pada diameter dan orientasi serat kolagen yang mengubah biomekanik kartilago, sehingga kartilago sendi kehilangan sifat kompresibilitasnya (Price & Wilson, 2003).

Beberapa keadaan seperti trauma atau jejas mekanik akan menginduksi pelepasan enzim degradasi, seperti stromelysin dan *Matrix Metalloproteinases* (*MMPs*). *Stromelysin* mendegradasi proteoglikan, sedangkan *MMP* mendegradasi proteoglikan dan kolagen matriks ekstraseluler. *MMP* diproduksi oleh kondrosit, kemudian diaktifkan melalui kaskade yang melibatkan proteinase serin (aktivator plasminogen), radikal bebas, dan beberapa *MMP* tipe membran. Kaskade enzimatik ini dikontrol oleh berbagai inhibitor, termasuk *tissue inhibitor of metalloproteinases* (*TIMP*) dan inhibitor daaktivator plasminogen. *TIMP* yang umumnya berfungsi menghambat *MMP* tidak dapat bekerja optimal karena di dalam rongga sendi ini cenderung bersifat asam oleh karena *stromelysin* (pH 5,5), sementara *TIMP* dapat bekerja optimal pada pH 7,5 (Lampe *et al*, 2000)

Agrekanase akan memecah proteoglikan di dalam matriks rawan sendi yang disebut agrekan. Ada dua tipe agrekanase yaitu agrekanase 1 (*ADAMT-4*) dan agrekanase 2 (*ADAMT-11*). Enzim lain yang turut berperan merusak kolagen tipe II dan proteoglikan adalah katepsin, yang bekerja pada pH rendah, termasuk proteinase aspartat (katepsin D) dan proteinase sistein (katepsin B, H, K, L dan S) yang disimpan di dalam lisosom kondrosit. Hialuronidase tidak terdapat di dalam rawan sendi, tetapi glikosidase lain turut berperan merusak proteoglikan (Sergent *et al*, 2009).

Digital Repository Universitas Jember

Proses inflamasi yang terjadi pada sendi oleh karena rangsangan tertentu mengakibatkan terjadinya kerusakan sel yang akan melepaskan fosfolipid. Fosfolipid tersebut akan diubah menjadi asam arakhidonat (*AA*) oleh enzim fosfolipase. *AA* tersebut akan mengalami transformasi melalui dua jalur utama yaitu: siklooksigenase, yang menyintesis prostaglandin dan tromboksan, dan lipoksigenase yang menyintesis leukotrin (Robbins *et al*, 2007).

Siklooksigenase (*COX*) berfungsi sebagai katalis pada tahap pertama proses biosintesis prostaglandin, tromboksan dan prostasiklin. Ada dua bentuk enzim siklooksigenase, yaitu: *COX-1* adalah bentuk enzim utama yang ditemukan dibanyak jaringan dan bertanggung jawab dalam menjaga fungsi normal tubuh termasuk keutuhan mukosa lambung dan pengaturan aliran darah ginjal. Sebaliknya, *COX-2* tidak ditemukan di jaringan pada kondisi normal, tetapi diinduksi dalam respon inflamasi. Pada jalur ini *PGH2* diubah menjadi *prostaglandin E2* (*PGE2*), *PGD2*, *PGF2α*, *PGI2*, dan tromboksan A2 (*TXA2*). *PGE2* dapat memicu dilatasi pembuluh darah, meningkatkan permeabilitas kapiler dan merangsang reseptor nyeri. Selain itu, *PGE2* juga dapat menstimulasi terjadinya resorbsi tulang (Riccioti & Fitzgerald, 2011).

TXA2 berperan sebagai vasokonstriktor dan agregasi trombosit. Selain itu, *TXA2* juga dapat memicu aktivitas monosit untuk menghasilkan *IL-1*β dan *tumor necrotizing factor* (*TNFα*) yang berperan penting dalam proses inisiasi dan perkembangan destruksi kartilago. *IL-1β* dan *TNFα* dapat memicu terbentuknya *MMP* dan kolagenase (Cleland *et al*, 2003).

Lipoksigenase adalah enzim yang memetabolisme *AA* di dalam neutrofil. Enzim lipoksigenase mengubah *AA* menjadi hydroxyperoxide-eicosatetra-enoic acid (*HPETE*). *HPETE* sangat tidak stabil dan direduksi oleh enzim peroksidase menjadi hydroxy-eicosatetra-enoic acid (*HETE*) atau diubah menjadi kelompok senyawa yang secara kolektif disebut leukotrin. Leukotrin yang dihasilkan *HPETE* adalah Leukotrin B4 (*LTB4*) melalui hidrolisis enzimatik. *LTB4* merupakan agen kemotaksis poten dan menyebabkan agregasi neutrofil (Robbins *et al*., 2007).

Digital Repository Universitas Jember

Pada OA, 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* (*NO*), *IL-1β*, dan *TNF-α*. Sitokin-sitokin ini menginduksi kondrosit untuk memproduksi protease, kemokin, dan eikosanoid seperti prostaglandin dan leukotrin 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 (Sergent *et al*, 2009)

Sitokin yang terpenting adalah *IL-1*. *IL-1* berperan menurunkan sintesis kolagen tipe II dan IX dan meningkatkan sintesis kolagen tipe I dan III, sehingga menghasilkan matriks rawan sendi yang berkualitas buruk. Pada akhirnya tulang subkondral juga akan ikut berperan, dimana osteoblas akan terangsang dan menghasilkan enzim proteolitik (Maharani, 2007.)

2.1.4 Peran *IL-1*β

IL-1 β adalah sitokin proinflamasi yang memiliki peranan dalam OA. Pada tubuh, *IL-1β* terdapat dalam bentuk prekursornya yaitu *pro IL-1β* yang harus diaktifkan untuk menjadi sitokin yang aktif. Aktivasi *pro IL-1β* menjadi *IL-1β* ini merupakan tugas dari *capsase-1* atau yang juga sering disebut *IL-1*β *converting enzyme* (*ICE*). *IL-1β* dalam kondisi fisiologis berada dalam kondisi seimbang dengan inhibitornya yaitu *IL-1 receptor atagonist* (*IL-1Ra*) dan *IL-1 decoy receptor* (*IL-1RII*) yang dapat mengikat *IL-1β* tanpa adanya sinyal (Daheshia, 2008).

Pada OA, *IL-1β* terlokalisasi pada kondrosit di bagian permukaan kartilago dimana telah teridentifikasi terjadi perubahan degeneratif pada pemeriksaan histologi. Pada OA terjadi peningkatan *ICE* dan *IL-1β* di kartilago, khususnya di bagian permukaan dan bagian tengah atas dari lapisan kartilago artikular (Daheshia, 2008). Pada penelitian lain juga ditemukan adanya hubungan positif antara *nitrotyrosin* (indikator terjadinya kerusakan oksidatif) dan *IL-1β* pada kondrosit manusia (Loeser *et al*, 2002).

Digital Repository Universitas Jember

*IL-1*β diketahui menjadi mediator utama kerusakan kartilago pada OA dan matriks extracellular merupakan target dari aktivitas katabolik. IL-1β merusak kondrosit dengan cara meningkatkan enzim proteolitik seperti *MMPs*. Pada pasien OA terjadi peningkatan *MMP-1*, *MMP-3* dan *MMP-13* pada pemberian *IL-1β* yang nantinya akan menyebabkan terjadinya inflamasi secara lokal dan penipisan pada kartilago (Fan *et al*, 2007).

2.1.5 Tanda dan gejala

Keluhan OA yang paling sering dirasakan yaitu nyeri sendi, terutama saat sendi bergerak atau menanggung beban, dan akan berkurang saat istirahat. Seringkali penderita merasakan nyeri pada sendi asimetris yang meningkat secara bertahap selama beberapa tahun (Marsland & Kapoor, 2008). Nyeri pada pergerakan dapat timbul akibat iritasi kapsul sendi, periostitis dan spasme otot periartikular (Wahyuningsih, 2009). Pada tahap awal, nyeri hanya terlokalisasi pada bagian tertentu, tetapi bila berlanjut, nyeri akan dirasakan pada seluruh sendi yang terkena OA. Nyeri ini seringkali disertai bengkak, penurunan ruang gerak sendi, dan abnormalitas mekanis. Keterbatasan gerak biasanya berhubungan dengan pembentukan osteofit, permukaan sendi yang tidak rata akibat kehilangan rawan sendi yang berat atau spasme dan kontraktur otot periartikular.

Kekakuan sendi juga dapat ditemukan pada penderita OA setelah sendi tidak digerakkan beberapa lama (*gel phenomenon*), tetapi kekakuan ini akan hilang setelah sendi digerakkan. Kekakuan yang terjadi pada pagi hari biasanya berlangsung tidak lebih dari 30 menit. Selain itu, juga didapatkan pembesaran tulang di sekitar sendi, efusi sendi, dan krepitasi (Price & Wilson, 2003). Pada OA lutut, gejala spesifik yang dapat timbul adalah keluhan instabilitas pada waktu naik turun tangga (Maharani,2007).

Digital Repository Universitas Jember

2.1.6 Faktor risiko

Secara garis besar, faktor risiko timbulnya OA lutut meliputi usia, jenis kelamin, ras, genetik, nutrisi, obesitas, penyakit komorbiditas, menisektomi, kelainan anatomis, riwayat trauma lutut, aktivitas fisik, kebiasaan olah raga, dan jenis pekerjaan.

a. usia

Usia adalah faktor risiko utama timbulnya OA, dengan prevalensi dan beratnya OA yang semakin meningkat seiring dengan bertambahnya usia. Lebih dari 80% individu berusia lebih dari 75 tahun terkena OA. Bukti radiografi menunjukkan insidensi OA jarang pada usia di bawah 40 tahun. OA hampir tidak pernah terjadi pada anak-anak dan sering pada usia di atas 60 tahun. Meskipun OA berkaitan dengan usia, penyakit ini bukan merupakan akibat proses penuaan yang tak dapat dihindari (Sergent *et al*, 2009).

Perubahan morfologi dan struktur pada kartilago berkaitan dengan usia termasuk penghalusan dan penipisan permukaan artikuler, penurunan ukuran dan agregasi matriks proteoglikan, serta kehilangan kekuatan peregangan dan kekakuan matriks. Perubahan-perubahan ini paling sering disebabkan oleh penurunan kemampuan kondrosit untuk mempertahankan dan memperbaiki jaringan, seperti kondrosit itu sendiri sehingga terjadi penurunan aktivitas sintesis dan mitosis, penurunan respon terhadap anabolic growth factor, dan sintesis proteoglikan yang lebih kecil dan tidak seragam (Sergent *et al*, 2009).

b. jenis kelamin

Wanita berrisiko terkena OA dua kali lipat dibanding pria. Walaupun prevalensi OA sebelum usia 45 tahun kurang lebih sama pada pria dan wanita, tetapi di atas 50 tahun prevalensi OA lebih banyak pada wanita, terutama pada sendi lutut. Wanita memiliki lebih banyak sendi yang terlibat dan lebih menunjukkan gejala klinis seperti kekakuan di pagi hari, bengkak pada sendi, dan nyeri di malam hari (Sergent *et al*, 2009).

Digital Repository Universitas Jember

Meningkatnya kejadian OA pada wanita di atas 50 tahun diperkirakan karena turunnya kadar estrogen yang signifikan setelah menopause. Kondrosit memiliki reseptor estrogen fungsional, yang menunjukkan bahwa sel-sel ini dipengaruhi oleh estrogen. Penelitian yang dilakukan pada beberapa tikus menunjukkan bahwa estrogen menyebabkan peningkatan pengaturan reseptor estrogen pada kondrosit, dan peningkatan ini berhubungan dengan peningkatan sintesis proteoglikan pada hewan percobaan (Sergent *et al*, 2009).

c. ras

Prevalensi OA lutut pada penderita di negara Eropa dan Amerika tidak berbeda, sedangkan suatu penelitian membuktikan bahwa ras Afrika – Amerika memiliki risiko menderita OA lutut 2 kali lebih besar dibandingkan ras Kaukasia. Penduduk Asia juga memiliki risiko menderita OA lutut lebih tinggi dibandingkan Kaukasia. Suatu studi lain menyimpulkan bahwa populasi kulit berwarna lebih banyak terserang OA dibandingkan kulit putih (Marsland and Kapoor, 2008).

d. genetik

Faktor genetik juga berperan pada kejadian OA lutut. Hal tersebut berhubungan dengan abnormalitas kode genetik untuk sintesis kolagen yang bersifat diturunkan, seperti adanya mutasi pada gen prokolagen II atau gen-gen struktural lain untuk struktur-struktur kartilago sendi seperti kolagen tipe IX dan XII, protein pengikat, atau proteoglikan (Setiati *et al*, 2006).

Sebuah studi menunjukkan bahwa komponen yang diturunkan pada penderita OA sebesar 50% hingga 65%. Studi pada keluarga, saudara kembar, dan populasi menunjukkan perbedaan antar pengaruh genetik menentukan lokasi sendi yang terkena OA. Bukti lebih jauh yang mendukung faktor genetik sebagai predisposisi OA adalah adanya kesesuaian gen OA yang lebih tinggi pada kembar monozigot dibanding kembar dizigot (Sergent *et al*, 2009)

Digital Repository Universitas Jember

e. nutrisi

Orang yang jarang mengkonsumsi makanan bervitamin D memiliki peningkatan risiko 3 kali lipat menderita OA lutut.16 Penelitian faktor nutrisi sebagai etiopatologi OA membuktikan adanya peningkatan risiko kejadian OA lutut pada individu dengan defisiensi vitamin C dan E. Pada orang Asia, penyakit Kashin-Beck, salah satu jenis OA, dapat disebabkan oleh makanan yang terkontaminasi oleh jamur. Hipotiroidisme terjadi pada sebagian penderita OA karena defisiensi selenium (Altman *et al*, 2001).

f. obesitas

Kegemukan (obesitas) adalah faktor risiko terkuat untuk terjadinya OA lutut. Efek obesitas terhadap perkembangan dan progresifitas OA terutama melalui peningkatan beban pada sendi-sendi penopang berat badan. Tiga hingga enam kali berat badan dibebankan pada sendi lutut pada saat tubuh bertumpu pada satu kaki. Peningkatan berat badan akan melipatgandakan beban sendi lutut saat berjalan (Fauci *et al*, 2008)

Sebuah penelitian menunjukkan bahwa makin besar Indeks Massa Tubuh (IMT), risiko menderita OA lutut akan semakin meningkat. Penderita OA dengan obesitas memiliki gejala OA yang lebih berat. Obesitas tidak hanya mengawali timbulnya penyakit OA, tetapi juga merupakan akibat lanjut dari inaktivitas para penderita OA.Selain melalui peningkatan tekanan mekanik pada tulang yang menyebabkan kerusakan kartilago, obesitas berhubungan dengan kejadian OA secara tidak langsung melalui faktor-faktor sistemik (Sergent *et al*, 2009).

g. riwayat trauma lutut

Trauma lutut akut, terutama kerusakan pada ligamentum cruciatum dan robekan meniskus pada lutut merupakan faktor risiko timbulnya OA lutut, dan berhubungan dengan progresifitas penyakit. Perkembangan dan progresifitas OA pada individu yang pernah mengalami trauma lutut tidak dapat dicegah, bahkan setelah kerusakan ligamentum cruciatum anterior diperbaiki. Risiko berkembangnya OA pada kasus ini sebesar 10 kali lipat (Sergent *et al*, 2009).

Digital Repository Universitas Jember

h. aktivitas fisik

Aktivitas fisik yang berat / weight bearing seperti berdiri lama (2 jam atau lebih setiap hari), berjalan jarak jauh (2 jam atau lebih setiap hari), mengangkat benda berat (10 kg – 50 kg selama 10 kali atau lebih setiap minggu), mendorong objek yang berat (10 kg – 50 kg selama 10 kali atau lebih setiap minggu), naik turun tangga setiap hari merupakan faktor risiko terjadinya OA lutut (Altman *et al*, 2001).

Di sisi lain, seseorang dengan aktivitas minim sehari-hari juga berrisiko mengalami OA lutut. Kurangnya aktivitas sendi yang berlangsung lama akan menyebabkan disuse atrophy yang akan meningkatkan kerentanan terjadinya trauma pada kartilago. Pada penelitian terhadap hewan coba, kartilago sendi yang diimobilisasi menunjukkan sintesis agrekan proteoglikan pada kartilago yang mempengaruhi biomekanisnya, berhubungan dengan peningkatan *MMP* yang dapat menyebabkan kerusakan yang lebih parah (Fauci *et al*, 2008)

2.1.7 Diagnosis

Diagnosis OA lutut dapat dilihat dari tanda, gejala seta faktor risiko pada pasien. Penilaian tehadap penyakit ini dapat ditinjau dari segi klinis, laboratorik dan radiografis. Diagnosis OA untuk memudahkan dapat menggunakan kriteria klasifikasi dari *American College of Rheumatology* (*ACR*). Penilaian dari kriteria diagnosis ini dibagi menjadi 3, yaitu penilaian secara klinis, penilaian klinis dan laboratoris, dan penilaian klinis radiografis sebagaimana terdapat pada tabel 2.1 berikut.

Digital Repository Universitas Jember

Tabel 2.1 Diagnosis OA dari ACR

Klinis	Klinis dan Laboratorik	Klinis dan Radiografis
Nyeri lutut disertai minimal 3 dari 6 kriteria berikut : 1. umur lebih dari 50 tahun 2. lama kaku saat pagi kurang dari 30 menit 3. kripitus 4. nyeri tekan 5. pembesaran tulang tidak panas pada perabaan	Nyeri lutut disertai minimal 5 dari 9 kriteria berikut : 1. umur lebih dari 50 tahun 2. lama kaku saat pagi kurang dari 30 menit 3. kripitus 4. nyeri tekan 5. pembesaran tulang 6. tidak pansa pada perabaan 7. LED 40mm/jam 8. RF < 1:40 9. Analisis cairan sendi normal	Nyeri lutut, ditemukan osteofit, dan disertai minimal 1 dari 3 kriteria berikut : 1. umur lebih dari 50 tahun 2. lama kaku saat pagi kuranh dari 30 menit 3. kripitus

1. LED = Laju Endap Darah
2. RF = *Rheumatoid Factor*

Sumber: Hochberg *et al*. (2012)

2.1.8 Grading

Pada OA terdapat gambaran radiografi yang khas, yaitu osteofit. Selain osteofit, pada pemeriksaan X-ray penderita OA biasanya didapatkan penyempitan celah sendi, sklerosis, dan kista subkondral. Berdasarkan gambaran radiografi tersebut, Kellgren dan Lawrence (*KL Grade*) membagi OA menjadi 4 tingkatan. *Grade 0* atau nomal apabila tidak ditemukan gammbaran radiografi, *grade 1* apabila ditemukan adanya osteofit atau apabila terjadi penyempitan ruang sendi yang diragukan, *grade 2* apabila terdapat osteofit dan penyempitan ruang sendi yang nyata, *grade 3* apabila terdapat *multiple* osteofit dengan penyempitan yang nyata serta terjadi sklerosis, dan *grade 4* apabila telah terdapat osteofit yang besar, sklerosis, serta deformitas tulang (Braun & Gold, 2011).

Digital Repository Universitas Jember

2.1.9 Penatalaksanaan

Penatalaksanaan pada OA bertujuan untuk mengontrol nyeri, memperbaiki fungsi sendi yang terserang, menghambat progresifitas penyakit, serta edukasi pasien.

a. terapi non farmakologis

Terdapat beberapa hal yang direkomendasikan oleh ACR 2012 dalam manajemen terapi non farmakologis OA. Modalitas ini bersifat kondisional, direkomendasikan hanya jika pasien memiliki OA lutut dengan nyeri kronis sedang sampai berat dan merupakan indikasi untuk artroplasti total lutut tetapi tidak mau menjalani prosedur, memiliki komorbiditas medis lain, atau sedang mengonsumsi obat yang mengarah kepada kontraindikasi mutlak atau relatif untuk operasi atau dokter bedah tidak merekomendasikan prosedur. terapi non farmakologis OA dapat dilihat pada tabel 2.2.

Tabel 2.2 Terapi nonfarmakologi OA

Sangat direkomendasikan	Direkomendasikan pada kondisi tertentu	Tidak Direkomendasikan
1. Berpartisipasi dalam olah raga aeobik dan/atau latihan resistensi 2. Berpartisipasi dalam olah raga air 3. Menurunkan berat badan (untuk individu dengan berat badan berlebih)	1. Berpartisipasi dalm program manajemen diri 2. Menerima terapi manual dikombinasi dengan latihan yang diawasi 3. Menerima intervensi psikososial 4. Diinstruksikan penggunaan agen termal 5. Menerima alat bantu jalan sesuai kebutuhan 6. Berpartisispasi dalam program tai chi 7. Diobati dengan akupuntur tradisional 8. Diinstruksikan penggunaan stimulasi listrik transkutan	1. Berpartisipasi dalam latihan keseimbangan dengan latihan penguatan 2. Mengenakan sol lateral terjepit 3. Menerima terapi manual saja 4. Memakai penyangga lutut

Sumber: Hochberg *et al*. (2012)

Digital Repository Universitas Jember

b. terapi farmakologis

Secara garis besar, ACR 2012 merekomendasikan terapi farmakologis untuk OA lutut sebagaimana tercantum pada tabel 2.3.

Tabel 2.3 Terapi Farmakologi OA

Direkomendasikan pada kondisi tertentu	Tidak direkomendasikan pada kondisi tertentu	Tidak Direkomendasikan
- Asetaminofen - OAINS oral - OAINS topikal - Tramadol - Injeksi kortikesteoid intraartikuler	- Chondroitin sulfat - Glucosamin - Capsaicin topikal	- hyaluronat Intraartikuler - Duloxetine - Analgesik Opioid

Sumber: Hochberg *et al*. (2012)

Asetaminofen, atau yang lebih dikenal dengan nama parasetamol merupakan analgesik pertama yang diberikan pada penderita OA karena cenderung aman dan dapat ditoleransi dengan baik, terutama pada pasien usia tua. Dengan dosis maksimal 4 gram/hari, pasien perlu diberi penjelasan untuk tidak mengonsumsi obat-obat lain yang mengandung asetaminofen, termasuk obat flu serta produk kombinasi dengan analgesik opioid (IRA, 2014).

Untuk pasien berusia >75 tahun, penggunaan OAINS topikal lebih dianjurkan dibanding OAINS oral. Pada kasus ini, penggunaan tramadol atau injeksi kortikosteroid intraartikuler dapat dianjurkan. Tramadol sama efektif dengan morfin atau meperidin untuk nyeri ringan sampai sedang, tetapi untuk nyeri berat atau kronik lebih lemah. Dosis maksimum per hari yang dianjurkan untuk tramadol adalah 400 mg. Injeksi kortikosteroid intraartikuler dapat diberikan bila terdapat infeksi lokal atau efusi sendi (IRA, 2014).

Digital Repository Universitas Jember

c. Operasi

Tindakan operasi seperti arthroscopic debridement, joint debridement, dekompresi tulang, osteotomi, dan artroplasti merupakan tindakan yang efektif pada penderita dengan OA yang sudah parah. Tindakan operatif ini dapat menghilangkan nyeri pada sendi OA (IRA, 2014).

2.2 Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*)

Terapi farmakologis yang dapat diberikan pada penyakit OA berfokus pada pengurangan rasa nyeri dan inflamasi. Namun penggunaan obat-obatan, sebagaimana yang telah disebutkan, dapat menimbulkan adanya efek samping apabila digaunakan dalm waktu panjang. Efek yang paling ringan berupa mual, nyeri lambung, dispepsia sampai yang paling serius seperti timbul lesi, perdarahan bahkan perforasi pada saluran pencernaan (Bachtiar, 2010). Oleh karena itu diperlukan adanya alternatif pengobatan yang lebih aman, diantaranya adalah minyak ikan lemuru.

Terdapat banyak jenis ikan lemuru yang ada di Indonesia, di antaranya *Sardinella sirm*, *Sardinella lemuru*, dan *Sardinella longiceps*. *Sardinella longiceps* sendiri merupakan ikan yang banyak ditemukan di Selat Bali diantaranya di Puger Jember dan Muncar Banyuwangi (Rasyid, 2003). Ikan lemuru memiliki taksonomi sebagai berikut.

Kingdom	: Animalia	Suborder	: Clupeidoi
Phylum	: Chordata	Family	: Clupeidae
Subphylum	: Vertebrata	Subfamily	: Clupeinae
Klas	: Actinopterygii	Genus	: Sardinella
Order	: Clupeiformes	Species	: Sardinella longiceps

Ikan lemuru merupakan ikan pelagik kecil dengan ciri bersirip punggung tambahan yang seperti kulit, berbecak-becak yang bercahaya dan tidak bertulang dahi belakang (Fitrianingsih, 2015). Ikan lemuru memiliki bentuk seperti pada gambar 2.1

Digital Repository Universitas Jember

Gambar 2.1 Ikan lemuru *Sardinella longiceps*

2.3 Minyak Ikan Lemuru

Minyak ikan lemuru mengandung 10,38-14,58% *eicosapentaenoic acid* (*EPA*) dan 5,73-8,99% *docosahexaenoic* (*DHA*) dari keseluruhan komponen minyak (Wildan, 2000). Diantara banyak jenis minyak ikan, kandungan omega-3 pada ikan lemuru adalah yang paling besar. Perbandingan kadar *EPA* dan *DHA* minyak ikan lemuru dengan jenis minyak ikan yang lainnya, dapat dilihat dalam tabel 2.4.

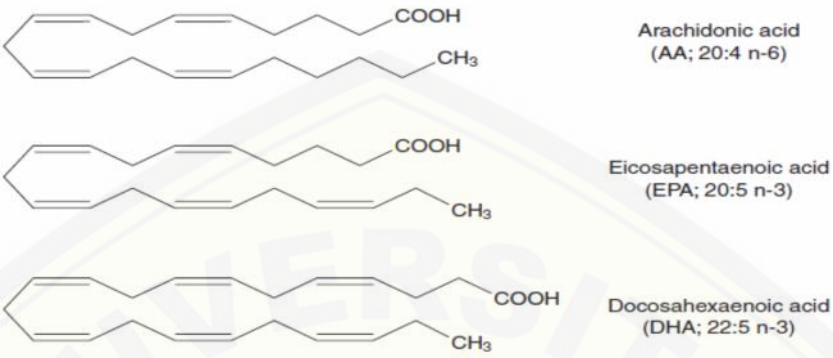
Tabel 2.4 Perbedaan persentase kandungan *EPA* dan *DHA* pada ikan

Jenis Minyak Ikan	*EPA* (%)	*DHA* (%)
Tuna	7	20
Salmon	6	10
Cod	11	21
Herring	9	6
Lemuru	18	13

Sumber : Harmayani *et al.* (2000),

Beberapa penelitian menyatakan bahwa *n-3 PUFA* ini memiliki efek antiinflamasi. *EPA* dan *DHA* berfungsi sebagai substrat kompetitor oksidasi asam arakhidonat oleh siklooksigenase yang merupakan mediator inflamasi. *EPA* dan *DHA* sendiri memiliki struktur yang hampir sama dengan asam arakhidonat (AA) sebagaimana terdapat pada gambar 2.2.

Digital Repository Universitas Jember



Sumber : Cleland *et al.* (2003).

Gambar 2.2 Struktur AA, EPA, dan DHA

Penghambatan metabolisme *AA* sendiri berpengaruh terhadap mineralisasi tulang, dimana hasil metabolisme *AA* berupa prostaglandin (PGE_2) yang menginisiasi resorbsi kalsium tulang dengan cara meningkatkan jumlah prekursor osteoklas, juga di hambat oleh adanya *EPA* dan *DHA* (Indahyani, 2001). Selain PGE_2, Omega-3 juga menurunkan ekspresi osteopontin yang emiliki fungsi dalam pergerakan osteoklas di daerah resorpsi dan *Bonesialo Protein* (*BSP*) (indahyani, 2008). Ekspresi *BSP* ditemukan tinggi dalam jaringan yang mengalami proses mineralisasi diantaranya mineralisasi tulang dan kartilago (Mandal *et al*, 2012).

EPA dapat menjadi inhibitor aktif dari asam arakidonat. *EPA* akan diubah oleh enzim siklooksigenase menjadi PGH_3. PGH_3 dapat diubah menjadi PGE_3 dan TXA_3. PGE_3 memiliki efek yang lebih minimal dibandingkan PGE_2, yang merupakan hasil pembentukan *AA* oleh siklooksigenase, dalam merangsang nyeri. Begitu juga dengan TXA_3 yang memiliki efek agregasi platelet dan peningkatan sekresi *IL-1*β oleh monosit dibandingkan dengan TXA_2, yang merupakan hasil pembentukan *AA* oleh siklooksigenase (Cleland *et al*, 2003).

Digital Repository Universitas Jember

2.4 *Complete Freund's Adjuvant*

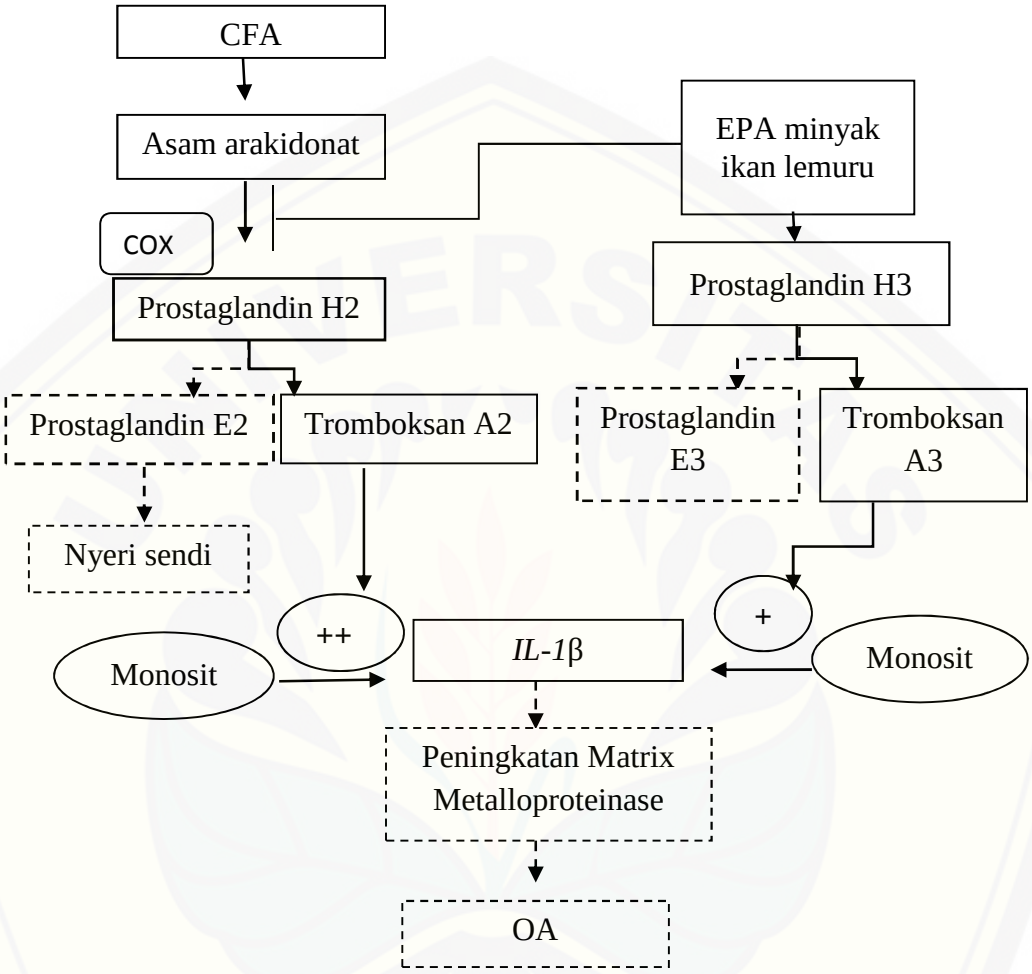
Pada OA terjadi inflamasi yang disebabkan oleh degradasi dari kartilago. Hal tersebut terjadi oleh karena adanya jejas mekanik dan kimiawi (Setiati, 2006). Salah satu yang dapat digunakan sebagai penginduksi OA adalah *Complete Freund's Adjuvant* (*CFA*) yaitu dengan memberikan jejas mekanik pada kartilago sendi (Wibowo *et al*, 2012).

CFA merupakan suspensi mineral minyak yang mengandung *mycobacterium* mati dan diemulsifikasi bersama larutan antigen untuk kemudian dibentuk sebagai emulsi air dalam minyak. *CFA* dapat meningkatkan aktivitas imun selular ataupun humoral terhadap imunogen. Reaksi yang timbul adalah reaksi inflamasi kuat pada lokasi deposisi antigen akibat pembentukan influks leukosit dan interaksinya dengan antigen. *CFA* yang digunakan secara tidak tepat atau berlebihan dapat menyebabkan efek samping signifikan seperti inflamasi kronik, ulserasi kulit, abses lokal atau peluruhan jaringan, oleh karena itu direkomendasikan penggunaan dosis *CFA* dibawah 0,1 mg/ml agar efek samping minimal (Margaretha, 2011).

Preparasi antigen harus steril dan idealnya isotonis, pH netral, dan bebas urea, asam asetat, dan pelarut toksik lainnya. *Mycobacterium* dalam CFA di suspensi kembali dengan vortex atau mengocok ampul atau vial. CFA kemudian dipindahkan dari ampul atau vial secara steril. Perhatian harus diberikan pada pencegahan terbentuknya gelembung udara ketika mencampur emulsi CFA antigen. Respon inflamasi berupa lesi terdiri dari lesi primer dan sekunder. Lesi primer terjadi dalam 3-5 hari dan lesi sekunder terjadi setelah 11-12 hari terhitung sejak hari ke-0 disuntik CFA (Parmar & Prakash, 2006).

Digital Repository Universitas Jember

2.5 Kerangka Konsep



Gambar 2.3 Kerangka konsep

CFA yang diinjeksikan secara intra artikular akan menyebabkan terjadinya kerusakan kartilago dan membran synovial. Kerusakan ini akan menyebabkan dilepaskannya fosfolipid yang kemudian akan diubah oleh enzim fosfolipase menjadi asam arakidonat. Asam arakhidonat oleh siklooksigenase akan diubah menjadi prostaglandin H2 kemudian menjadi prostaglandin E2 yang berperan dalam peningkatan rasa nyeri pada sendi dan Tromboksan A2 yang akan memicu monosit untuk memproduksi Interleukin 1-β. Peningkatan Interleukin 1-β dapat memicu

Digital Repository Universitas Jember

pelepasan enzim matrix metalloproteinase yang dapat mendestruksi kartilago sendi dan terjadilah OA. Kandungan minyak ikan berupa EPA yang memiliki kemiripan struktur dengan asam arakidonat akan menjadi substrat kompetitif dari asam arakidonat. EPA yang bersaing dengan AA, oleh siklooksigenase akan diubah menjadi prostaglandin H3 yang kemudian menjadi prostaglandin E3 dan tromboksan A3. PGE3 dan TXA3 memiliki efek rangsangan nyeri dan rangsangan monosit dalam memproduksi IL-1β dan mediator inflamasi lain yang lebih sedikit. Keseluruhan dapat dilihat pada gambar 2.3.

2.6 Hipotesis

Minyak ikan lemuru dapat menurunkan ekspresi *IL-1* beta kartilago sendi.

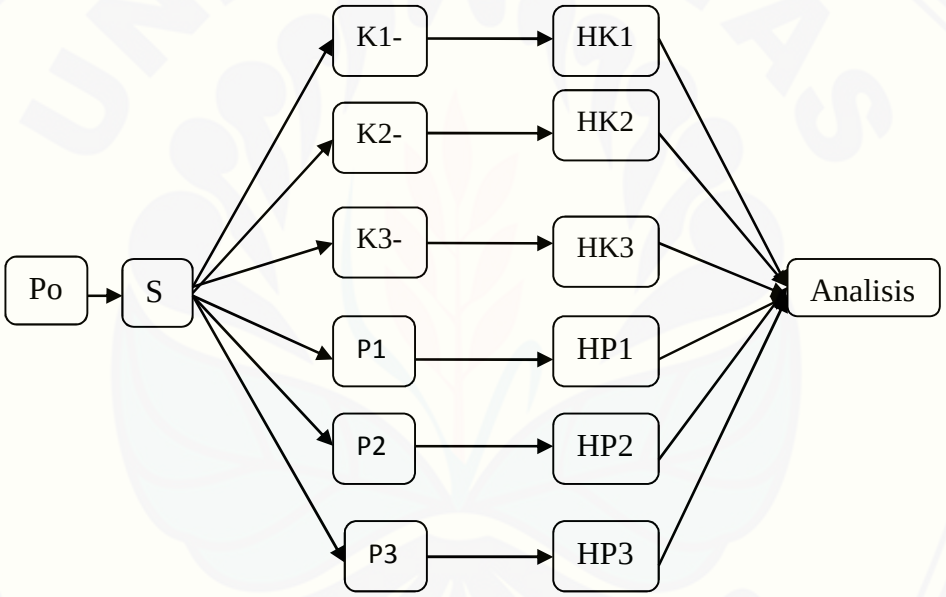
Digital Repository Universitas Jember

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan adalah *true experimental* dengan rancangan penelitian yang digunakan adalah *post test only control group design* (Notoadmodjo, 2010).

3.2 Rancangan Penelitian



Gambar 3.1 Rancangan Penelitian

Keterangan

Po : Populasi Tikus *Sprague dawley* Jantan

S : Sampel yang diambil dari populasi yang memenuhi kriteria sampel

K1 - : Kontrol negatif, diinjeksi *CFA* dengan pemberian salin sebagai plasebo dan didekapitasi pada hari ke 7

K2 - : Kontrol negatif, diinjeksi *CFA* dengan pemberian salin sebagai plasebo dan didekapitasi pada hari ke 14

Digital Repository Universitas Jember

K3 - : Kontrol negatif, diinjeksi *CFA* dengan pemberian salin sebagai plasebo dan didekapitasi pada hari ke 21

P1 : Perlakuan 1, diinjeksi *CFA* dan diberikan minyak ikan 1 ml/hari dan didekapitasi pada hari ke 7

P2 : Perlakuan 2, diinjeksi *CFA* dan diberikan minyak ikan 1 ml/hari dan didekapitasi pada hari ke 14

P3 : Perlakuan 3, diinjeksi *CFA* dan diberikan minyak ikan 1 ml/hari dan didekapitasi pada hari ke 21

H : Hasil

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah hewan coba tikus jenis *Sprague dawley* jantan.

3.3.2 Sampel

Sampel Populasi penelitian adalah hewan coba tikus jenis *Sprague dawley* jantan yang memenuhi kriteria sampel.

3.3.3 Besar sampel

Pada penelitian ini penghitungan sampel menggunakan Rumus Federer :

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

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

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

$$n-1 \geq 3$$

$$n \geq 4$$

n = besar sampel

t = jumlah perlakuan

Digital Repository Universitas Jember

3.3.4 Kriteria sampel penelitian

Kriteria sampel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

a. Jenis tikus *Sprague dawley*.
b. Kondisi fisik sehat dan tidak mengalami kelainan.
c. Jenis kelamin jantan.
d. Umur 3-4 bulan dan berat badan 300-350 gram.

3.3.5 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 and Sudarsono, 2004).

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

3.4.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium biomolekular FK UNEJ, laboratorium biomedik FKG UNEJ, laboratorium patologi anatomi dan fisiologi FK UB.

3.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada Bulan Januari-Juli 2016.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah lama pemberian minyak ikan.

3.5.2 Variable terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah ekspresi *IL-1 β* kartilago.

Digital Repository Universitas Jember

3.5.3 Variabel kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

a. Jenis hewan coba : Tikus galur *Sprague dawley*.
b. Jenis tikus : Jantan.
c. Berat badan tikus : 300-350 gram.
d. Makanan tikus (Pakan standar tikus merk Turbo 521-CP, *Indonesia*) dan minuman tikus.
e. Tempat dan cara pemeliharaan tikus.

   Hewan percobaan ditempatkan dalam kandang dengan ukuran 30 cm x 40 cm, dengan pemberian makan 1 hari 1 kali, dan penggantian sekam sekaligus pembersihan kandang 3 hari 1 kali.
f. Pemberian minyak ikan lemuru secara sondasi lambung.
g. Dosis *Complete Freund's Adjuvant (CFA).*
h. Prosedur pengambilan preparat.
i. Metode pewarnaan dengan menggunakan Immunohistokimia

3.6 Definisi Operasional

3.6.1 Osteoartritis

Ostoartritis yang dimaksud pada penlitian ini adalah artritis pada tikus *Sprague dawley* jantan yang diinduksi dengan dosis tunggal injeksi intraartikular *CFA* dalam salin dengan dosis 0,08 ml dengan perbandingan 1:1 yang kemudian ditunggu selama 6 minggu hingga mucul tanda-tanda terjadinya artritis.

3.6.2 Minyak ikan lemuru

Minyak ikan lemuru yang dimaksud pada penelitian ini adalah minyak ikan yang didapat dari ekstraksi daging ikan lemuru dengan metode rebus.

Digital Repository Universitas Jember

3.6.3 Ekspresi *IL-1β*

Ekspresi *IL-1β* yang dimaksud pada penelitian ini adalah warna coklat kemerahan dengan intensitas yang berbeda-beda yang terdapat pada sitoplasma sel kondrosit dari hasil pewarnaan imunohistokimia dan kemudian di hitung dengan metode skoring histologi.

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Pembuatan Minyak Ikan Lemuru

Alat yang digunakan adalah bak plastik, *sentrifuge*, tabung *sentriguse*, corong pisah, kompor, panci, gelas ukur, pipet, dan pipet mikrometer. Bahan yang digunakan adalah ikan lemuru, aquades, dan tabung tempat minyak ikan.

3.7.2 Perawatan Hewan Coba

Alat yang digunakan adalah kandang tikus terbuat dari plastik yang ditutupi dengan penyekat,tempat makan dan minum tikus. Bahan yang digunakan adalah makanan tikus *turbo,* air bersih, sekam / serbuk kayu.

3.7.3 Perlakuan Hewan Coba

Alat yang digunakan adalah 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, dan silet. Bahan yang digunakan adalah minyak ikan lemuru, *complete freunds adjuvant* (*CFA*), ketamin, dan normal saline.

3.7.4 Dekapitasi dan Pengambilan Sampel

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

Digital Repository Universitas Jember

3.7.5 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, spiritus, sarung tangan *latex*, dan masker. Bahan yang digunakan adalah buffer formalin10%, antibodi *IL-1*β dan kit, etanol 100%, etanol 95%, etanol 70%, dan larutan *xylol.*

3.8 Dosis Ketamin, Minyak Ikan Lemuru dan *Complete Freunds Adjuvant*

3.8.1 Dosis Ketamin

Dosis ketamin yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0,2 ml/ ekor (Dewi *et al*, 2013).

3.8.2 Dosis minyak ikan lemuru

Dosis minyak ikan lemuru yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1 ml/300-350 gram berat badan tikus (Indahyani *et al*, 2007).

3.8.3 Dosis Complete Freunds Adjuvant

Dosis *CFA* yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0,08 ml dengan pengenceran menggunakan normal saline 1:1. (Robin, 2006).

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.

Digital Repository Universitas Jember

3.9.2 Persiapan sampel penelitan

a. Memilih tikus putih *Sprague dawley* jantan sebanyak 24 ekor.
b. Melakukan penimbangan berat badan tikus dengan neraca Ohauss (berat badan tikus 300-350 gram).
c. Menyiapkan kandang tikus dengan ukuran 30 cm x 40 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 Ekstraksi 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 10 L aquades sehingga ikan lemuru tenggelam dalam aquades dengan suhu kira-kira 80-90^{o}C sambil diaduk-aduk terus. Proses merebus dihentikan sampai didapatkan minyak ikan dibagian permukaan.
d. Seteah proses merebus ikan lemuru, ikan lemuru diangkat dan diperas dengan kain saring untuk mendapatkan minyak ikan.
e. Kemudian mencampur hasil saringan dengan NaCl 5%.
f. Mengambil minyak ikan dengan menggunakan corong pisah sekaligus memisahkannya dengan air.
g. Menuang minyak ikan dalam corong pisah ke dalam tabung sentrifuse untuk mendapatkan minyak ikan murni yang telah terpisah dari molekul lemak dan air. Tabung disentrifuse dengan kecepatan 8.000 rpm selama 3 menit.
h. Setelah disentrifuge, pada tabung *sentrifuge* 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 tabung reaksi.

Digital Repository Universitas Jember

3.9.4 Pengelompokan dan perlakuan hewan coba

Hewan coba tikus galur *Sprague dawley* jantan sebanyak 24 ekor dibagi menjadi 6 kelompok, berikut pembagian kelompok :

a. Kelompok I, merupakan kelompok kontrol negatif 1 yang terdiri dari 4 ekor hewan coba. Pada kelompok ini dilakukan injeksi *CFA* secara intra-artikular sendi.
b. Kelompok II, merupakan kelompok kontrol negatif 1 yang terdiri dari 4 ekor hewan coba. Pada kelompok ini dilakukan injeksi *CFA* secara intra-artikular sendi.
c. Kelompok III, merupakan kelompok kontrol negatif 1 yang terdiri dari 4 ekor hewan coba. Pada kelompok ini dilakukan injeksi *CFA* secara intra-artikular sendi.
d. Kelompok IV, merupakan kelompok perlakuan yang terdiri dari 4 ekor hewan coba. Pada kelompok ini dilakukan injeksi *CFA* secara intra-artikular pada sendi serta dilakukan pemberian minyak ikan lemuru sebesar 1 ml/sonde sebanyak dua kali perhari selama 7 hari.
e. Kelompok V, merupakan kelompok perlakuan yang terdiri dari 4 ekor hewan coba. Pada kelompok ini dilakukan injeksi *CFA* secara intra-artikular pada sendi serta dilakukan pemberian minyak ikan lemuru sebesar 1 ml/sonde sebanyak dua kali perhari selama 14 hari.
f. Kelompok VI, merupakan kelompok perlakuan yang terdiri dari 4 ekor hewan coba. Pada kelompok ini dilakukan injeksi *CFA* secara intra-artikular pada sendi serta dilakukan pemberian minyak ikan lemuru sebesar 1 ml/sonde sebanyak dua kali perhari selama 21 hari.

3.9.5 Pembuatan sediaan histologis

Pembuatan preparat histopatologi dilakukan di laboratorium patologi anatomi fakultas kedokteran universitas brawijaya.Berikut prosedur pembuatan preparat histopatologi.

Digital Repository Universitas Jember

a. Proses Pemotongan Jaringan Berupa Makros
   1) Gross hasil bedah dimasukan ke larutan buffer formalin 10 % (fiksasi) semalam.
   2) Jaringan dilakukan dekalsifikasi (Pengembukan tulang sendi) 15 s/d 20 Hari menggunakan EDTA.
   3) Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan yang akan di teliti.
   4) Jaringan di potong kurang lebih ketebalan 2-3 mili meter.
   5) Di masukan kekaset dan di beri kode sesuai dengan kode gross peneliti.
   6) Dicuci dengan air mengalir sebelum di lakukan proses jaringan / dimasukan ke alat *Tissue Tex Processor.*
   7) Di proses menggunakan alat mesin Automatis *Tissue Tex Processor.*
   8) Alarm bunyi tanda selesai.

b. Proses Pengeblokan & Pemotongan Jaringan
   1) Jaringan di angkat dari mesin *Tissue Tex Prosesor.*
   2) Jaringan di blok dengan paraffin sesuai kode jaringan.
   3) Jaringan di potong dengan alat mikrotom ketebalan 3-5 mikron.

c. Proses Deparafinisasi

Setelah di sayat atau di potong dengan ketebalan 3-5 mikron, di letakkan dalamoven selama 30 Menit dengan suhu panas 70-80 ^{0}C, kemudian dimasukan kedalam 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 dimasukan air mengalir selama 15 menit.

3.9.6 Pewarnaan Immunohistokimia

Pewarnaan Imunohistokimia (IHC) dilakukan di laboratorium fisiologi fakultas kedokteran universitas brawijaya.Pewarnaan IHC untuk melihat ekspresi *IL-1*β menggunakan antibody *IL-1*β Berikut langkah-langkah pewarnaan IHC :

a. Sediaan dilakukan deparafinisasi preparat (blok parafin) dengan larutan *xylene* sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit.

Digital Repository Universitas Jember

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 *peroxidase blocking solution* pada suhu kamar selama 10 menit.
d. Inkubasi preparat dalam *prediluted blocking serum* 25 ^{0}C selama 10 menit.
e. Rendam preparat di dalam antibody monoclonal *IL-1*β pada suhu 25 ^{0}C selama 10 menit.
f. Cuci preparat dengan *Phospate Buffer Saline* (PBS) selama 5 menit.
g. Inkubasi preparat dengan antibody sekunder pada suhu 25 ^{0}C selama 10 menit.
h. Cuci preparat dengan PBS selama 5 menit
i. Inkubasi preparat dengan *peroxidase* pada suhu 25 ^{0}C selama 10 menit
j. Cuci preparat dengan PBS selama 5 menit
k. Inkubasi preparat dengan kromogen DAB (*Diaminobenzinidase)* pada suhu 25 ^{0}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 *IL-1*β pada jaringan kartilago menggunakan
q. Dokumentasi setiap pengamatan

3.9.7 Pengamatan Histopatologi

Pengamatan dilakukan pada bagian kartilago dengan pewarnaan Imunohistokimia untuk mengetahui ekspresi *IL-1*β. Gambaran kartilago diamati secara kualitatif menggunakan mikroskop Olympus BX51 dengan perbesaran 400x.

Perhitungan ekspresi IL-1β menggunakan skor histologi yaitu (Setiabudi, 2005) :

Digital Repository Universitas Jember

Skor = (IK x PK) + (IS x PS) + (IL x PL) + (IN x PN)

P = persentase

I = intensitas

K = kuat

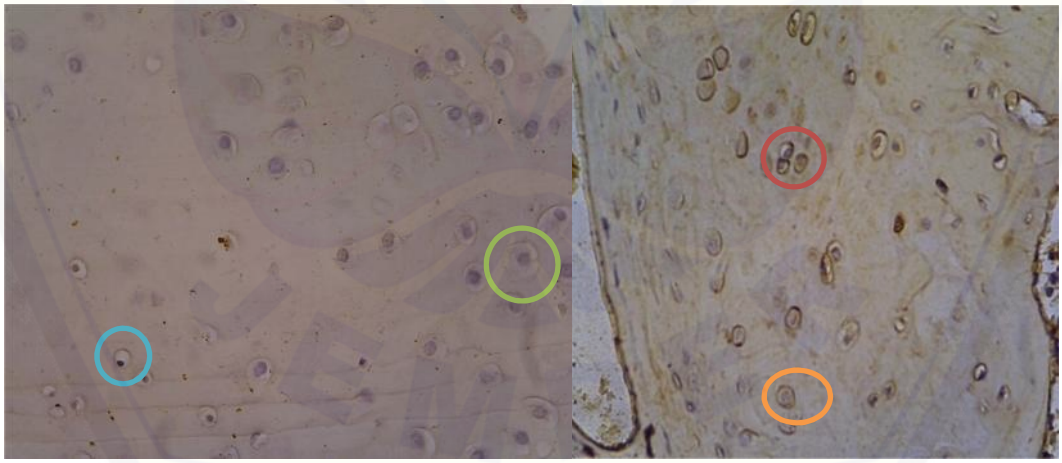
S = sedang

L = lemah

N = negatif

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

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



Skoring ekspresi IL-1β, skor 0 ditunjukkan pada lingkaran berwarna hijau, skor 1:warna biru, skor 2:warna orange dan skor 3:warna merah.

Gambar 3.2 Pengamatan histologi pewarnaan Imunohistokimia.

Digital Repository Universitas Jember

Berdasarkan paparan diatas, dalam penelitian ini ekpresi IL-1 terekspresi pada sitoplasma sel kondrosit. Nilai persentase *IL-1β* sebagai berikut (Herawati, 2014) :

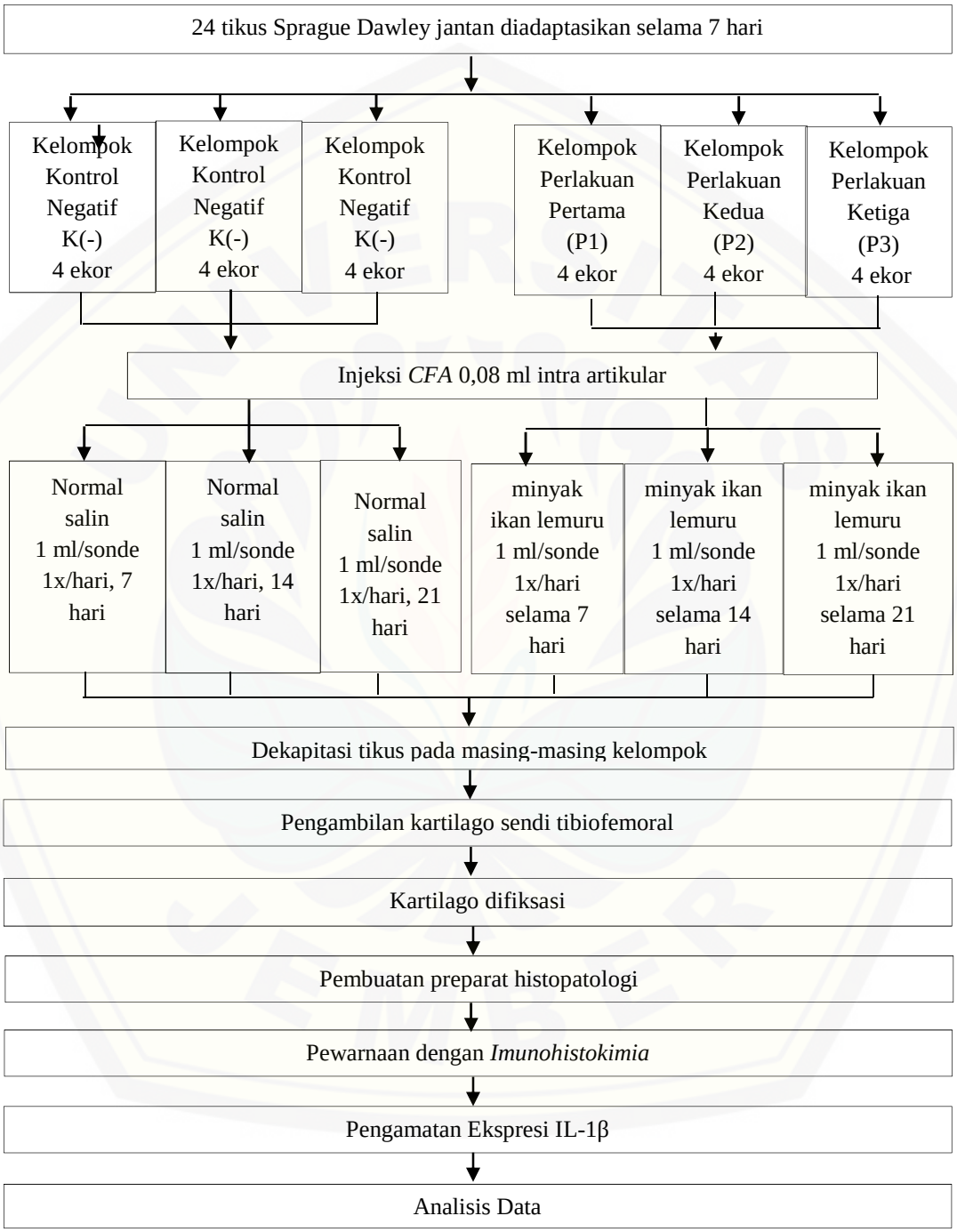
$$\text{persentase } IL\text{-}1\beta\ (\%) = \frac{\text{kondrosit yang mengekspresikan } IL\text{-}1\beta}{\text{total kondrosit pada lapang pandang}} \times 100\%$$

3.9.8 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak uji statistic SPSS vers. 18. 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.

Digital Repository Universitas Jember

3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.3 Skema alur perlakuan hewan coba

Digital Repository Universitas Jember

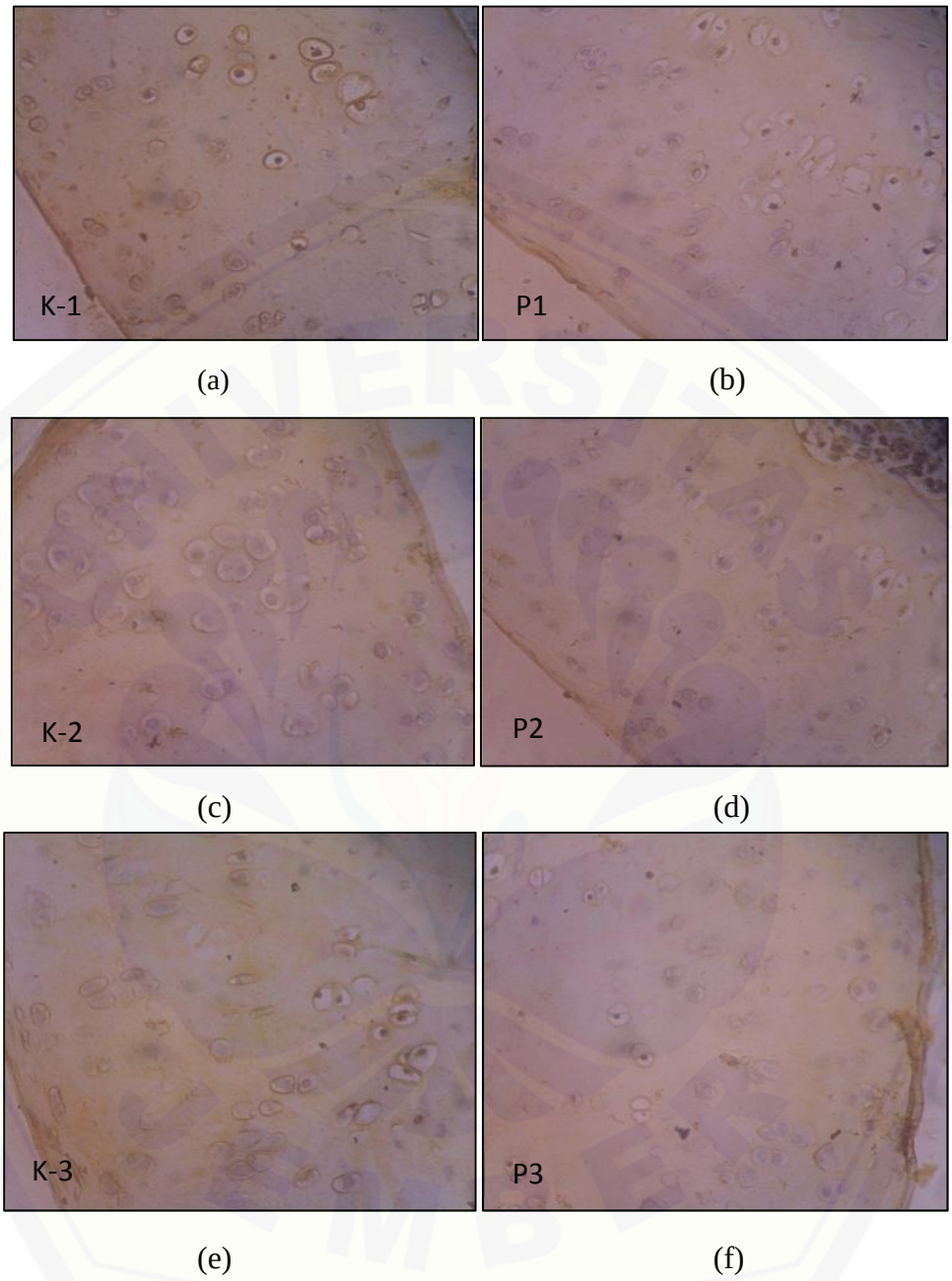
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

Pada penelitian ini digunakan 24 ekor tikus *Sprague dawley* yang diambil secara random dari 30 ekor tikus. 24 ekor tikus kemudian dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol negatif. Pada kedua kelompok diinjeksikan *CFA*, kemudian pada kelompok perlakuan diberikan minyak ikan lemuru dengan dosis 1 ml/ hari, sedangkan pada kelompok kontrol negatif tidak diberikan minyak ikan. Masing-masing kelompok dibagi lagi menjadi subkelompok yaitu kelompok hari ke 7, 14, dan 21 yang pada tiap sub kelompok berisikan 4 ekor tikus.

Pada penelitian ini dilakukan pengkajian pengaruh pemberian minyak ikan lemuru terhadap ekpresi *IL-1β* pada kartilago yang diinduksi *CFA*. Pengamatan dilakukan pada bagian kartilago dengan pewarnaan Imunohistokimia. Gambaran kartilago diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x dalam 5 lapang pandang. *IL-1β* dapat diekspresikan dengan warna coklat sampai kemerahan pada sitoplasma sel kondrosit di kartilago sendi tibiofemoral. Pada gambar tersebut didapatkan sitoplasma sel kondrosit yang terpulas coklat pada kontrol negatif lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan baik pada pemberian minyak ikan selama 7 hari, 14 hari dan 21 hari sebagaimana didapati pada gambar 4.1.

Digital Repository Universitas Jember



Gambar 4.1 pengamatan histologi Imunohistokimia dengan perbesaran 400x pada kelompok kontrol negatif (a) dan perlakuan (b) pada hari ke-7 ; kontrol negatif (c) dan perlakuan (d) pada hari ke-14 ; kontrol negatif (e) dan perlakuan (f) pada hari ke-21

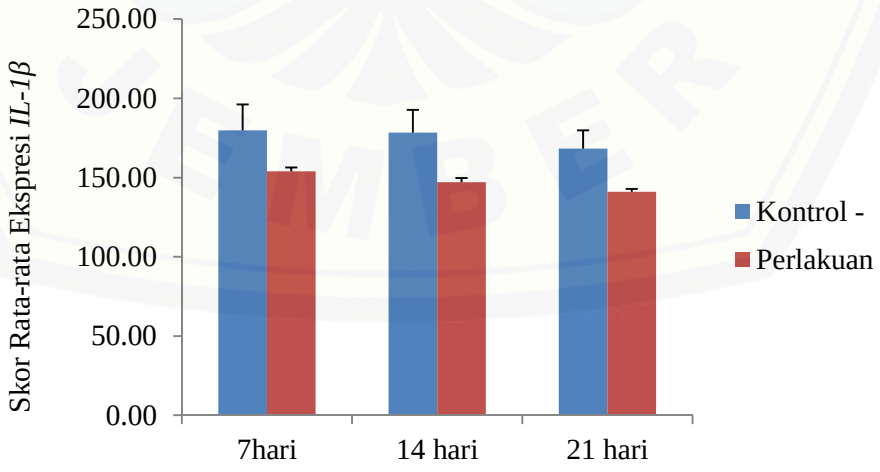
Digital Repository Universitas Jember

Dari hasil pengamatan seperti diatas kemudian dilakukan penghitungan menggunakan skor histologi ekspresi *IL-1β*, dan ditemukan skor ekspresi *IL-1β* sebagaiman terdapat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Skor Rata-rata Ekspresi *IL-1β*

Kelompok	Skor Rata-rata Ekspresi *IL-1β*
K-1	179,85 ± 16,29
K-2	178,38 ± 14,44
K-3	169,30 ± 11,49
P1	153,91 ± 2,51
P2	147,10 ± 2,68
P3	141,07 ± 1,87

Pada kelompok kontrol negatif secara berturut-turut K-1, K-2, dan K-3 memiliki rata-rata skor *IL-1β* sebesar 179,85; 178,38; dan 169,30. Sedang pada kelompok perlakuan secara berturut-turut P1, P2, dan P3 memiliki rata-rata skor *IL-1β* 153,91; 147,10; dan 141,07. Berdasarkan data tersebut, didapatkan grafik skor rata-rata *IL-1β* seperti pada gambar 4.3 berikut.



Gambar 4.2 Grafik skor rata-rata *IL-1β*

Digital Repository Universitas Jember

4.2 Analisis data

Data hasil penelitian ini dilakukan uji *one-way ANOVA*. Pada uji ini sebelumnya dilakukan terlebih dahulu uji normalitas *shapiro-wilk* dan uji distribusi dengan *lavene statistic* didapatkan hasil tidak normal dan tidak homogen. Data kemudian ditransformasi, namun hasilnya tetap, sehingga uji *one-way ANOVA* tidak memenuhi syarat, dan kemudian dilakukanlah uji *kruskal-wallis*.

Pada uji *kruskal-wallis* didapatkan perbedaan yang signifikan dengan nilai signifikansi p= 0,001. Dari hasi hasil ini, kemudian dilakukan uji *post hoc Mann-whitney* dan didapatkan hasil signifikansi sebagaimana tabel 4.2 berikut.

Tabel 4.2 Hasil analisis *Mann-Whitney*

Kelompok	K-1	K-2	K-3	P1	P2	P3
K-1		0.773	0,386	0,021*	0,021*	0,021*
K-2	0,773		0,386	0,021*	0,021*	0,021*
K-3	0,386	0,386		0,02*	0,021*	0,021*
P1	0,021*	0,021*	0,021*		0,021*	0,021*
P2	0,021*	0,021*	0,021*	0,021*		0,021*
P3	0,021*	0,021*	0,021*	0,021*	0,021*	

* : beda signifikan

Hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif. Perbedaan signifikan juga didapat antar kelompok perlakuan P1, P2 dan P3.

4.3 Pembahasan

Osteoartritis (OA) merupakan penyakit sendi degeneratif kronik dimana terjadi penipisan progresif dan disintegrasi dari kartilago artikular, pembentukan osteofit, pembentukan kista dan sklerosis pada tulang subkondral serta sinofitis ringan dan fibrosis kapsula sendi (Solomon & Warwick, 2010). OA adalah bentuk artritis yang paling umum terjadi yang mengenai mereka di usia lanjut atau usia dewasa dan salah satu penyebab terbanyak kecacatan di negara berkembang (Price & Wilson, 2003). Pada OA, target utama perusakan adalah kartilago sendi oleh karena adanya proses inflamasi (Yanuarty, 2014).

Digital Repository Universitas Jember

Proses inflamasi yang terjadi pada sendi oleh karena rangsangan tertentu mengakibatkan terjadinya kerusakan sel yang akan melepaskan fosfolipid. Fosfolipid tersebut akan diubah menjadi asam arakhidonat (*AA*) oleh enzim fosfolipase. *AA* tersebut akan mengalami transformasi melalui dua jalur utama yaitu: siklooksigenase, yang menyintesis prostaglandin dan tromboksan, dan lipoksigenase yang menyintesis leukotrin (Robbins *et al*, 2007). Fosfolipid dirubah menjadi *AA* dengan bantuan enzim fosfolipase A_2 sehingga kadar *AA* jaringan akan meningkat. *AA* merupakan substrat mayor enzim siklooksigenase dan lipooksigenase yang dapat menyintesis produk eikosanoid dari *AA* berupa prostaglandin E_2 (PGE_2), tromboksan A_2 (TXA_2) dan leukotrin B_4 (LTB_4) yang bersifat inflamasi (Cleland *et al*, 2003). Rangsangan yang diberikan pada penelitian ini menggunakan *CFA* yang telah terbukti mampu memberikan respon inflamasi baik lokal maupun sistemik (Margaretha, 2011). Respon inflamasi ini dibuktikan dengan munculnya sitokin proinflamasi semisal *IL-1β*. Sitokin ini dapat menjadi pertanda adanya inflamasi, yang pada OA dapat terekspresikan pada sitoplasma kondrosit di permukaan sendi (Daheshia, 2008).

Hasil analisis uji *Mann-Whitney* menunjukkan perbedaan signifikan ($p<0,05$) antara kelompok kontrol ngatif (K-1, K-2, dan K-3) dengan kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3) dimana ekspresi *IL-1β* perlakuan lebih sedikit dibandingkan dengan kontrol negatif baik di hari ke-7, 14, maupun 21. Hal ini sesuai dengan penelitian Simopoulus (2002) dimana diungkapkan bahwa *EPA* sendiri berpengaruh terhadap penurunan *IL-1β* sedang penggunaan *EPA* dengan *DHA* berpengaruh sinergis terhadap penurunan kadar *IL-1β* pada penyakit-penyakit *autoimmune*. Menurut Cleland *et al* (2003) yang meneliti pengaruh minyak ikan terhadap rheumatoid arthritis, dan Indahyani *et al* (2008) yang meneliti tentang pengaruh minyak ikan lemuru pada infeksi periodontal, *EPA* dan *DHA* mampu menurunkan sitokin proinflamatori, diantaranya *IL-1β*, dengan menjadi inhibitor kompetitif *AA* melalui jalur siklooksigenase *(COX*). *EPA* dan *DHA* akan diubah oleh enzim siklooksigenase menjadi PGH_3. PGH_3 dapat diubah menjadi PGE_3 dan TXA_3. PGE_3 memiliki efek yang lebih minimal dibandingkan PGE_2, yang merupakan hasil pembentukan *AA* oleh

Digital Repository Universitas Jember

siklooksigenase, dalam merangsang nyeri. Begitu juga dengan TXA_3 yang memiliki efek agregasi platelet dan peningkatan sekresi *IL-1*β oleh monosit dibandingkan dengan TXA_2, yang merupakan hasil pembentukan *AA* oleh siklooksigenase (Cleland *et al*, 2003).

Pada kelompok perlakuan didapati penurunan skor rata-rata ekspresi *IL-1β* pada hari ke-7, 14, dan 21 mengalami penurunan dengan perbedaan signifikan. Hal ini sesuai dengan penelitian Indahyani *et al* (2003) bahwa pemberian minyak ikan dengan jangka waktu lama mampu mempengaruhi struktur *AA* jaringan dengan *EPA* dan *DHA*. Perubahan ini menjadikan tubuh lebih banyak memproduksi TXA_3 yang memiliki efek induksi monosit dalam memproduksi *IL-1β* lebih lemah dibandingkan TXA_2.

Meski mendapatkan hasil yang signifikan namun pada penelitian ini masih terdapat kekurangan, diantaranya yaitu peneletiaan ini masih menggunakan 1 dosis minyak ikan lemuru, sehingga tidak diketahui dosis yang optimal dalam pemanfaatan minyak ikan lemuru. Dalam penelitiaan ini juga tidak digunakan kontrol positif dan kontrol normal sebagai pembanding, sehingga tidak diketahui profil ekspresi *IL-1β* pada kartilago normal dan kartilago terinduksi OA yang diberikan obat.

Digital Repository Universitas Jember

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa minyak ikan lemuru dapat menurunkan ekspresi *intrleukin-1β* kartilago sendi tikus yang diinjeksi *Complete Freund's Adjuvant.*

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan oleh peneliti adalah sebagai berikut.

1. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai dosis optimal dari minyak ikan lemuru.
2. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai penggunaan minyak ikan lemuru dengan kontrol normal dan/atau dengan kontrol positif menggunakan obat yang sudah lazim digunakan.

Digital Repository Universitas Jember

DAFTAR PUSTAKA

Altman, R. D. 1987. "Criteria for the Classification of OA of the Knee and Hip". *Scand Journal of Rheumatology*. Vol 65: 31-39.

Altman, R.D., Moskowitz, R. W., Howell, D. S., Buckwalter, J. A., and Goldberg, V. M. 2001. *OA 3rd edition diagnosis and medical / surgical management.* Philadelphia: W.B. Saunders Company.

Bachtiar, Arief. 2010. "Pengaruh Ekstrak Jahe (*Zingiber oficinale*) terhadap Tanda dan Gejala OA pada Pasien Rawat Jalan di Puskesmas Pandanwangi Kota Malang". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jakarta : Universitas Indonesia.

Bethesda, M. D. 2002. *Handout on Health : OA*.USA : NIAMS.

Calnek, B. W. 1997. *Imunohistokimia.* Ames: Iowa State University Press.

Cleland, J., Proudman, and Susanna. 2003. "The Role of Fish Oils in the Treatment of Rheumatoid Arthritis". *J. Drugs*. Vol. 63 (9): 845-853.

Daheshia, M. 2008. *The Interleukin 1ß Pathway in the Pathogenesis of OA.* Texas : Department of Cartilage and Soft Tissue Biologics R&D, Zimmer Orthobiologics Inc.

Dewi, I. A. L. P., Damriyasa, I. M., and Dada, I. K. A. 2013. "Bioaktivitas Ekstrak Daun Tapak Dara (*Catharanthus roseus)* Terhadap Periode Epitelisasi Proses Penyembuhan Luka Pada Tikus Wistar". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Bali : Universitas Udayana.

Dewi, U.N. 1996. "Isolasi Asam Lemak Omega-3 Dari Minyak Hasil Limbah Penepungan dan Pengalengan Ikan Lemuru (Sardinella Longiceps)". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Bogor: FTP IPB.

Fan, Z., Soder, S., Oehler, S., Fundel, K., and Aigner, T. 2002. "Activation of *IL-1* Signaling Cascades in Normal and Osteoarthritic Articular Cartilage". *The American journal of pathology*. Vol. 171 (3): 938-946.

Fauci, A. S., Kasper, D. L., Longo, D. L., Braunwald, E., Hauser, S. L., and Jameson, J. L. 2008. *Harrison's Principles of General Medicine 17th edition*. New Jersey : Ciba-Geigy.

Digital Repository Universitas Jember

Federer, W. T. 1991. *Statistics and society: data collection and interpretation 2nd ed.* New York: Marcel Dekker.

Fitrianingsih, L. D. 2015. "Perumbuhan dan Laju Eksploitasi Ikan Tamban (*Sardinella albella valenciennes, 1847*) di Perairan Selat Malaka Tanjung Beringin Serdang Bedagai Sumatera Utara". Tidak Ditrbitkan. Skripsi. Sumatera Utara : Fakultas Peertanian Sumatera Utara

Handayani, R. D. 2008. "Faktor Risiko yang Mempengaruhi Terjadinya OA pada Lansia di Instalasi Rehabilitasi Medik RSU Haji Surabaya Tahun 2008". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Surabaya : Universitas Airlangga

Harmayani, U., and Hastuti, J. 2000. "Hidrolisis Minyak Ikan Lemuru oleh Lipase Amobil dari Mucor miehei pada Berbagai Rasio Minyak dan Air". Seminar Nasional Industri Pangan Tahun 2000. Yogyakarta: FATETA UGM.

Herawati, Y. 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". Tidak Diterbitkan. Tesis. Bali : Universitas Udayana

Hochberg, M. C., Altman, R. D., April, K.T, Benkhalti, M., Guyatt, G., McGowwan, J., Towheed, T., Welch, V., Wells, G., and Tigwell, P. 2015. "Recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic in OA of the hand, hip, and knee". *Arthritis Care & Research*.Vol. 64 (4): 465-474.

Indahyani, D. E. 2001. "Pengaruh Minyak Ikan terhadap Jumlah dan Aktivitas Osteoklas Tulang Periapikal Tikus yang Terinduksi Infeksi pada Pulpa". Tidak Diterbitkan. Tesis. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.

Indahyani, D.E. 2003. "Potensi Minyak Ikan dalam Mencegah dan Mengobati Reumatoid Artritis". *Stomatognati*. Vol. 1 (1): 1-4.

Indahyani, D. E., Pudyani, P. S., Alsupartinah, and Jonarta, A. L. 2003. "Pengaruh diet minyak jagung dan minyak ikan terhadap ekspresi osteoklas periapikal gigi pada tikus". *Jurnal Kedokteran Gigi Indonesia*. Vol. 10 (3): 31-36

Digital Repository Universitas Jember

Indahyani, D. E., Santoso, A. L. S., Utoro, T., and Soesatyo, M. H.. 2007. "Lipopolysacharide (LPS) introduction during growth and development period of rat's tooth toward the occurrence of enamel hypoplasia". *Dent J* (Maj Ked Gigi) FKGUnair. Vol. 40 (2): 85-88.

Indahyani, D. E. 2008. Minyak Ikan Lemuru *(Sardinella longiceps)* Meregulasi Survival Osteoblas dan Osteoklas, Ekspresi Integrin Avβ3 Tulang Alveolaris serta Struktur Gigi pada Tikus yang Mengalami Infeksi Periodontal Selama Masa Odontogenesis. Dipublikasikan. *Laporan Hasil Penelitian*. Jember: Universitas Jember.

Isbagio, H. 2014. *Rekomendasi IRA untuk Diagnosis dan Penatalaksanaan OA.* Jakarta : IRA

Katzung, Bertram G. 2004. *Basic & Clinical Pharmacology 9TH Edition.*

Kertia, N. And Nurdjanah, S. 2006. "Pengaruh Fisioterapi Terhadap Perbaikan Nyeri Pada Penderita OA Lutut Yang Mendapat Terapiu Parasetamol". *Berkala Ilmu Kedokteran*. Vol. 38 (2): 79-88.

Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Yogyakarta : Gajah Mada University Press.

Lampe, B. V., Barthel, B., Coupland, S. E., Riecken, E. O., Rosewicz, S. 2000. "Differential Expression of Matrix Metalloproteinase and Their Tissue Inhibitors in Colon Mucosa of Patients With Inflamatory Bowel Disease". *Gut.* Vol. 47 : 63-73

Loeser, R. F., Carlson, C. S., Carlo D. M., and Cole, A. 2002. "Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of *IL-1*ß and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1". *Arthritis & Rheumatism*. Vol. 46 (9): 2349-2357.

Maharani, E. P. 2007. *Faktor-faktor risiko OA lutut*. Semarang: Universitas Diponegoro

Mandal, B. B., Grinberg, A., Gil, E. S., Panialitis, B., and Kaplan, D. L. 2012. "High-strength Silk Protein Scaffolds for Bone Repair". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 109 (20): 7699-7704

Digital Repository Universitas Jember

Margaretha, S. M. U. 2012. "Efek Ekstrak Etanol 70% Rumput Mutiara (Hedyotis *corymbosa (L.) Lamk.*) terhadap Penurunan Jumlah Osteoklas Tulang Calcaneus Tikus Model Arthritis Rheumatoid". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jakarta : Universitas Indonesia.

Marsland, D., and Kapoor, S. 2008. *Crash course rheumatology and orthopaedics 2nd edition*. Philadelphia: Elsevier.

Notoatmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan Cetakan Ketiga*. Jakarta: Rineka Pustaka.

Parmar, N. S. and Prakash, S. 2006. *Screning Methos in Pharmacology*. Oxford : Alpha Science Intrnational.

Prabowo, S. 2005. "Pengaruh Stresor Dingin Terhadap Proses Keradangan Pada Arthritis Ajuvan: Penelitian Eksperimental Pada Arthritis Ajuvan (Model Hewan Untuk Arthritis Rematoid)". Tidak Diterbitkan. Tesis. Surabaya : Iptunair.

Price, S. A, and Wilson, M. L. 2003. *Patofisiologi konsep klinis proses-proses penyakit edisi 6*. Jakarta: EGC.

Qian, K.K., LaBreck, J.C., Gruber, H.E., and Yuehuei, H.A. Histological Techniques for Decalcified Bone and Cartilage. Dalam: Yuehuei, H.A., & Martin, Kylie L. 2003. *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. New Jersey: Humana Press.

Rasyid, A. 2003. "Isolasi asam lemak tak jenuh omega 3 dari ikan lemuru". *Prosiding Seminar Riptek Kelautan Nasional*: 8.

Riccioti, E. and Fitzgerald, G. A. 2011. "Prostaglandins and inflammation". *ATVB in Focus Inflammation.* Vol 31: 986-1000

Robbins, S. L., Cotran, R.S., and Kumar, V. 2007. *Buku Ajar Patolog, Edisi ke –7*. Jakarta: EGC.

Robin, Dwi Merry C. 2006. "The Effect of Curcuminoid to The Collagen Fibers Density of OA of Temporomandibular Joint". *The Indonesian Journal of Dental Research.* Vol 13: 197-201

Digital Repository Universitas Jember

Saha, Natalie, F., Moldovan, G., Tardif, P., Pelletier, J. M., dan Cloutier, J. 1999. "*IL-1*-ß-converting enzyme/caspase-1 in human osteoarthritic tissues: localization and role in the maturation of *IL-1*ß and *IL-1*8". *Arthritis Rheum*. Vol 42: 1577-1587.

Sayer, S. 2011. *Guidelines for the Research Use of Adjuvant.* Washington : National Institute of Health.

Sergent, J. S., Budd, R .C., Harris, E. D. J., McInnes, I. B., and Ruddy, S. 2009. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Saunders : Elsevier

Setiati, S., Sudoyo, A. W., Setyohadi, B., Alwi, I., dan Simadibrata, M. 2006. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Jakarta : Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FKUI

Simopoulus, A. P. 2002. "Omega-3 Fatty Acid in Inflammation and Autoimmune Diisease". *Journal of the American College of Nutrition*. Vol. 21 (6): 495–505

Skinner, R. 2003. Decalcification of Bone Tissue. Dalam: An, Yuehuei H. dan Martin, Kylie L. *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. New Jersey: Humana Press.

Smith, M. D., Triantafillou, S., Parker, A., Youssef, P., dan Coleman, M. 1997. "Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early OA". *J Rheumatol*. Vol. 24: 365-371.

Soeroso, J. 2007. *Osteoarthritis,* Dalam Sudoyo, A. W., Setyohadi, B., and Alwi, I., Simadibrata, M., dan Setiati, S. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Jakarta : Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FKUI

Solomon, L., and Warwick, N. 2010. *System of Orthopaedic and Fractures 9th edition.* Bristol, United Kingdom : Hodder Arnold.

Tjokronegoro, A. and Sudarsono, S. 2004, *Metologi Penelitian Bidang Kedokteran*. Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Wahyuningsih, N. A. S. 2009. "Hubungan Obesitas dengan Osteoartritis Lutut pada Lansia di Kelurahan Puncangsawit Kecamatan Jebres Surakarta". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Surakarta : Universitas Sebelas Maret

Wardhono, A. 2012. *Pedoman Penulisan Karya Ilmiah.* Jember : Badan Penerbit Universitas Jember

Digital Repository Universitas Jember

Wibowo, A., Aulanni'am, P., and Masdiana, C. 2012. "Pengaruh Pemberian Ekstrak Air Buah Kesemek Junggo (Diospyros kaki L.f.) terhadap Ekspresi *IL-1* Beta (IL-1β) dan Gambaran Histopatologi Jaringan Sendi Tikus (Rattus norvegicus) Artritis". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Malang : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

Wildan, F. 2000. "Perbandingan Kandungan Omega-3 dan Omega-6 Dalam Minyak Ikan Lemuru dengan Teknik Kromatografi". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Bogor : Balai Penelitian Ternak

Woessner, J.F., and Gunja-Smith, Z. 1991.: Role of metalloproteinases in human OA". *J Rheumatol*. Vol. 27: 99-101.

Wright, WL., 2008. "Management of mild-to-moderate OA : Effective intervention by the nurse practitioner". *The Journal for Nurse Practitioners*. PudMed Database.

Yanuarty, M. 2014. "Hubungan Antara Faktor Resiko OA dengan Neri, Disabilitas, dan Berat Ringannya OA di RSUD Kota Semarang". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Sumatera Utara : Universitas Sumatera Utara.

Digital Repository Universitas Jember

LAMPIRAN

LAMPIRAN A. SURAT KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK

A.1a Halaman Pertama Surat Keterangan Persetujuan Etik

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
KOMISI ETIK PENELITIAN
Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email : fk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK
ETHICAL APPROVA
Nomor : 830 /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 *(Sardinella longiceps)* TERHADAP EKSPRESI INTERLEUKIN-1 BETA KARTILAGO SENDI TIKUS *Sprague dawley* YANG DIINJEKSI CFA (COMPLETE FREUND'S ADJUVANT)

Nama Peneliti Utama : Muhammad Nur Arifin (NIM.122010101023)
Name of the principal investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

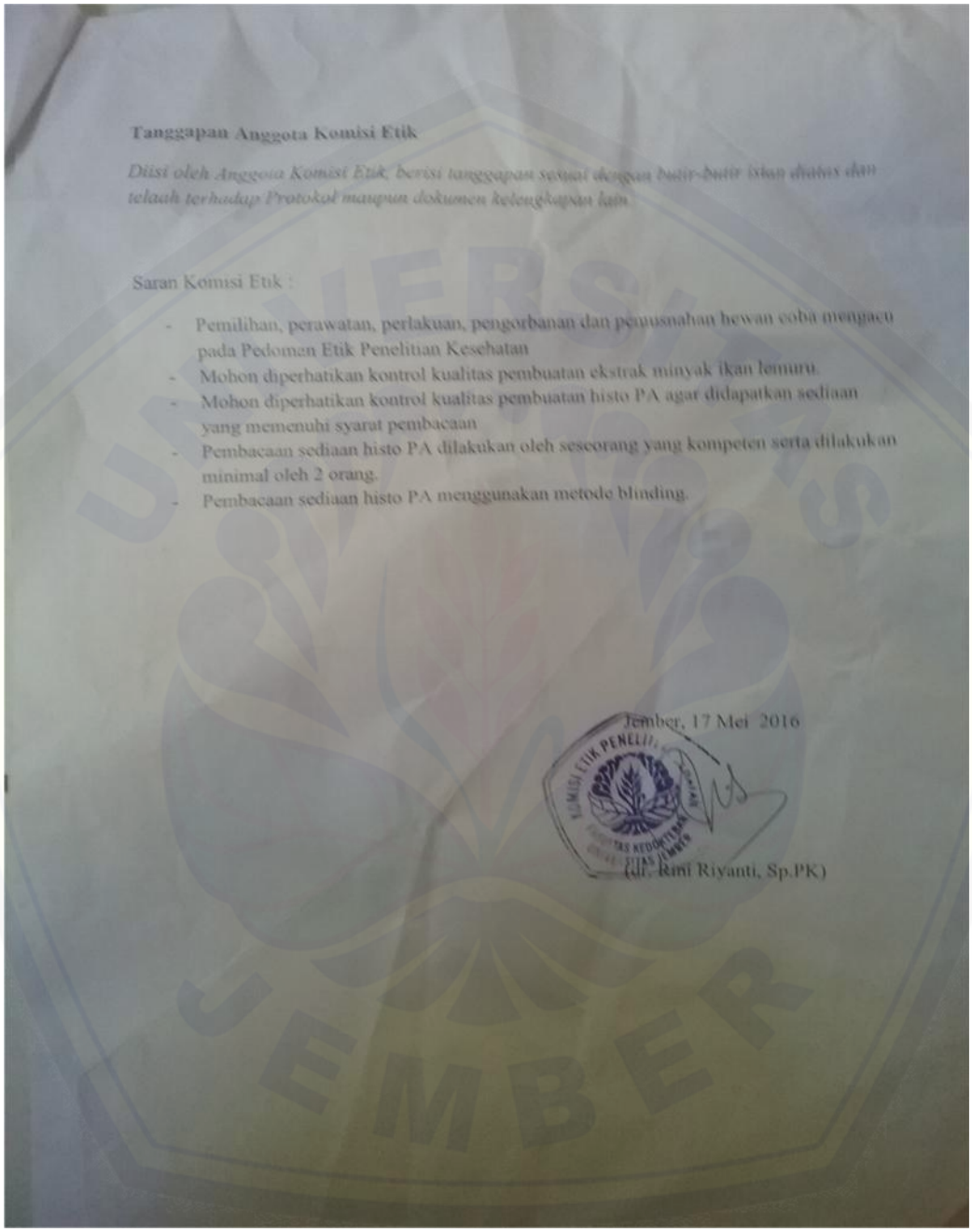
Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

12 Mei 2016

dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Digital Repository Universitas Jember

A.1b Halaman Keduan Surat Keterangan 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 kontrol kualitas pembuatan ekstrak minyak ikan lemuru.
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan histo PA agar didapatkan sediaan yang memenuhi syarat pembacaan
- Pembacaan sediaan histo PA dilakukan oleh seseorang yang kompeten serta dilakukan minimal oleh 2 orang.
- Pembacaan sediaan histo PA menggunakan metode blinding.

Jember, 17 Mei 2016

(dr. Rini Riyanti, Sp.PK)

Digital Repository Universitas Jember

LAMPIRAN B. ANALISIS DATA

B1. Hasil Uji *Kruskal-Wallis*

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Group	N	Mean Rank
SkorILb	k-1	4	19.50
	k-2	4	19.00
	k-3	4	17.00
	p1	4	10.50
	p2	4	6.50
	p3	4	2.50
	Total	24	

Test Statistics[a,b]

	SkorILb
Chi-Square	20.120
df	5
Asymp. Sig.	.001

Digital Repository Universitas Jember

B2. Hasil Uji *Mann-Whitney*

B.2a Uji Mann-Whitney K-1 dengan K-2

Ranks

	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorILb	k-1	4	4,75	19,00
	k-2	4	4,25	17,00
	Total	8		

Test Statistics[a]

	SkorILb
Mann-Whitney U	7,000
Wilcoxon W	17,000
Z	-,289
Asymp. Sig. (2-tailed)	,773
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,886[b]

B.2b Uji Mann-Whitney K-1 dengan K-3

Ranks

	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorILb	k-1	4	5,25	21,00
	k-3	4	3,75	15,00
	Total	8		

Test Statistics[a]

	SkorILb
Mann-Whitney U	5,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-,866
Asymp. Sig. (2-tailed)	,386
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,486[b]

Digital Repository Universitas Jember

B.2c Uji Mann-Whitney K-1 dengan P1

Ranks

	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorILb	k-1	4	6,50	26,00
	p1	4	2,50	10,00
	Total	8		

Test Statistics[a]

	SkorILb
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029[b]

B.2d Uji Mann-Whitney K-1 dengan P2

Ranks

	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorILb	k-1	4	6,50	26,00
	p2	4	2,50	10,00
	Total	8		

Test Statistics[a]

	SkorILb
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029[b]

Digital Repository Universitas Jember

B.2e Uji Mann-Whitney K-1 dengan P3

Ranks

	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorILb	k-1	4	6,50	26,00
	p3	4	2,50	10,00
	Total	8		

Test Statistics[a]

	SkorILb
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029[b]

B.2f Uji Mann-Whitney K-2 dengan K-3

Ranks

	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorILb	k-2	4	5,25	21,00
	k-3	4	3,75	15,00
	Total	8		

Test Statistics[a]

	SkorILb
Mann-Whitney U	5,000
Wilcoxon W	15,000
Z	-,866
Asymp. Sig. (2-tailed)	,386
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,486[b]

Digital Repository Universitas Jember

B.2g Uji Mann-Whitney K-2 dengan P1

Ranks

	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorILb	k-2	4	6,50	26,00
	p1	4	2,50	10,00
	Total	8		

Test Statistics[a]

	SkorILb
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029[b]

B.2h Uji Mann-Whitney K-2 dengan P2

Ranks

	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorILb	k-2	4	6,50	26,00
	p2	4	2,50	10,00
	Total	8		

Test Statistics[a]

	SkorILb
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029[b]

Digital Repository Universitas Jember

B.2i Uji Mann-Whitney K-2 dengan P3

Ranks

	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorILb	k-2	4	6,50	26,00
	p3	4	2,50	10,00
	Total	8		

Test Statistics[a]

	SkorILb
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029[b]

B.2j Uji Mann-Whitney K-3 dengan P1

Ranks

	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorILb	k-3	4	6,50	26,00
	p1	4	2,50	10,00
	Total	8		

Test Statistics[a]

	SkorILb
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029[b]

Digital Repository Universitas Jember

B.2k Uji Mann-Whitney K-3 dengan P2

Ranks

	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorILb	k-3	4	6,50	26,00
	p2	4	2,50	10,00
	Total	8		

Test Statistics[a]

	SkorILb
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029[b]

B.2l Uji Mann-Whitney K-3 dengan P3

Ranks

	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorILb	k-3	4	6,50	26,00
	p3	4	2,50	10,00
	Total	8		

Test Statistics[a]

	SkorILb
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029[b]

Digital Repository Universitas Jember

B.2m Uji Mann-Whitney P1 dengan P2

Ranks

	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorILb	p1	4	6,50	26,00
	p2	4	2,50	10,00
	Total	8		

Test Statistics[a]

	SkorILb
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029[b]

B.2n Uji Mann-Whitney P1 dengan P3

Ranks

	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorILb	p1	4	6,50	26,00
	p3	4	2,50	10,00
	Total	8		

Test Statistics[a]

	SkorILb
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029[b]

Digital Repository Universitas Jember

B.2o Uji Mann-Whitney P2 dengan P3

Ranks

	Group	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SkorILb	p2	4	6,50	26,00
	p3	4	2,50	10,00
	Total	8		

Test Statistics[a]

	SkorILb
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029[b]

LAMPIRAN C. DATA HASIL *IL-1β* TIAP SAMPEL

Hari Ke-	Nomor Sampel	Kontrol -	Perlakuan
7 hari	1	173,97	154,13
	2	160,26	155,30
	3	187,39	150,31
	4	197,78	155,91
14 hari	1	184,24	144,91
	2	189,88	144,67
	3	157,29	149,24
	4	182,10	149,60
21 hari	1	158,66	142,24
	2	182,94	138,28
	3	174,60	141,94
	4	161,01	141,80

Digital Repository Universitas Jember

LAMPIRAN D. GAMBAR PENELITIAN

D.1 Ekstraksi Minyak Ikan

Ikan lemuru

Ekstraksi minyak ikan

Proses sentrifuge Minyak Ikan Lemuru

Hasil ekstraksi minyak ikan

Digital Repository Universitas Jember

D.2 Perlakuan Hewan Coba

Injeksi intraartikular CFA

Pengambilan sampel sendi tikus