

Pengaruh Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) terhadap Ekspresi *Tumor Necrosis Factor (TNF- α)* Kartilago yang Diinduksi *Complete Freund's Adjuvant*

(*Effect of Lemuru (*Sardinella longiceps*) Fish Oil on Tumor Necrosis Factor (TNF- α) Expression of Cartilage that Induced by Complete Freund's Adjuvant*)

Kiki Andari, Rena Normasari, Muhammad Hasan
Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail: kikiandari@gmail.com

Abstract

*Osteoarthritis is a chronic joint disorder with weakening and disintegration of the joint cartilage followed by the growth of new bone and cartilage. TNF- α is one of the inflammatory mediator that plays an important role in the progression of osteoarthritis. In the others hands, lemuru (*Sardinella longiceps*) fish oils that contain EPA and DHA has an anti-inflammatory effect. The purpose of this study was to investigate the effect of lemuru fish oil on decreasing the expression of TNF- α in cartilage that induced by Complete Friends Adjuvant. This was a experimental design study with randomized post test only control group design. The sample was divided into 2 groups: the negative control group (K-) and the treatment group (P), each group was divided into three subgroups based on duration of lemuru fish oils treatment, 7th, 14th and 21st days. TNF- α expression data was obtained from immunohistochemical observations on tibiofemoral articular cartilage. The result showed that the expression of TNF- α in the treatment group is lower than the negative control group and One Way Anova test showed that there is significant difference between groups ($p = 0.000$). We can conclude that lemuru (*Sardinella longiceps*) fish oil decreased the expression of TNF- α .*

Keywords: *Osteoarthritis, TNF- α , lemuru (*Sardinella longiceps*) fish oil, cartilage*

Abstrak

Osteoartritis adalah suatu kelainan sendi kronis dimana terjadi proses pelemahan dan disintegrasi dari tulang rawan sendi yang disertai dengan pertumbuhan tulang dan tulang rawan baru pada sendi. Salah satu mediator inflamasi yang ikut berperan penting dalam progresifitas osteoartritis adalah TNF- α . Minyak ikan lemuru yang memiliki kandungan EPA dan DHA dapat berfungsi sebagai anti-inflamasi. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan adanya pengaruh minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) terhadap penurunan ekspresi TNF- α pada kartilago yang diinduksi *Complete Friends Adjuvant*. Jenis penelitian yang digunakan adalah *true experimental* dengan rancangan penelitian *the randomized post test only control group design*. Kelompok penelitian terbagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (K-) dan kelompok perlakuan (P), masing-masing kelompok terbagi menjadi 3 sub kelompok berdasarkan lama pemberian minyak ikan lemuru yaitu 7, 14 dan 21 hari. Data ekspresi TNF- α didapat dari skor histologi hasil pengamatan imunohistokimia kartilago sendi tibiofemoral pada perbesaran 400x dalam lima lapang pandang. Hasil penelitian didapatkan ekspresi TNF- α pada kelompok perlakuan lebih rendah dari pada kelompok kontrol negatif dan Uji *One Way Anova* menunjukkan perbedaan secara signifikan antarkelompok ($p = 0,000$). Sehingga, dapat disimpulkan bahwa minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) dapat menurunkan ekspresi TNF- α .

Kata kunci: *Osteoartritis, TNF- α , minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*), kartilago*

Pendahuluan

Osteoarthritis merupakan bentuk arthritis yang sering ditemukan di masyarakat, bersifat kronis dan memiliki progresifitas yang lambat. Dalam perjalanan penyakitnya, osteoarthritis tidak hanya mengenai kartilago sendi tetapi juga mengenai seluruh bagian sendi, termasuk tulang subkondral, ligamentum, kapsul dan *sinovial junction* serta jaringan ikat periartikular. Pada stadium lanjut, kartilago sendi mengalami kerusakan yang ditandai dengan adanya fibrilasi, fissura dan ulserasi yang dalam pada permukaan sendi [1].

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

Pada kebanyakan kasus, penyebab tercepat terjadinya osteoarthritis adalah stress mekanik yang menimpa beberapa bagian dari permukaan sendi [2]. Pada penyakit ini, mediator-mediator inflamasi ikut berperan dalam progresifitas penyakit seperti *Nitric Oxide*, IL-1 β , dan TNF- α . Sitokin-sitokin ini menginduksi kondrosit untuk memproduksi protease, kemokin, dan eikosanoid seperti prostaglandin PGE2 dan leukotrien Ltb4 dengan cara menempel pada reseptor di permukaan kondrosit dan menyebabkan transkripsi gen MMP sehingga produksi enzim meningkat. Akibatnya sintesis matriks terhambat dan apoptosis sel meningkat.

Minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) merupakan salah satu jenis minyak ikan yang memiliki kandungan asam lemak tak jenuh paling tinggi dibandingkan dengan jenis minyak ikan lainnya [3]. Ikan lemuru mengandung EPA (*Eicosapentaenoic Acid*) dan DHA (*Docosahexaenoic Acid*) sebesar 18 % dan 13% [4]. EPA dan DHA dapat berfungsi dalam menurunkan mediator resorpsi tulang prostaglandin (PGE2) dan sitokin proinflamasi (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α). Apabila terjadi penurunan PGE2, IL-1 dan TNF- α , maka akan meningkatkan aktivitas osteoblas dan menghambat pembentukan osteoklas pada tulang alveolar [5].

Salah satu sitokin yang berperan penting dalam proses terjadinya osteoarthritis adalah TNF- α . TNF- α merupakan sitokin yang

disekresikan oleh makrofag sehingga memiliki peranan penting dalam terjadinya inflamasi. Pada penelitian ini, adanya TNF- α disebabkan karena induksi CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) secara intra-artikular pada sendi tibiofemoral. CFA dapat memicu kerusakan *synovial membrane* yang menyebabkan vaskularisasi dan infiltrasi sel-sel meningkat pada sel T CD4+ (sel inflamatori). Selanjutnya mengaktifasi makrofag sehingga memproduksi sitokin pro-inflamasi TNF- α yang mengakibatkan terjadinya inflamasi [6]. Menurut penelitian sebelumnya diduga tikus yang diinduksi CFA akan mengalami osteoarthritis pasca 6 minggu pemberian [7].

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) terhadap ekspresi TNF- α pada kartilago tikus yang diinduksi oleh CFA dan mengetahui pada hari keberapa pemberian minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) yang paling efektif dalam menurunkan ekspresi TNF- α pada kartilago tikus yang diinduksi oleh CFA.

Metode Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *true experimental* dengan rancangan penelitian *the randomized post test only control group design*. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah waktu/lama pemberian minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) yaitu 7, 14 dan 21 hari. Variabel terikat yaitu Ekspresi TNF- α .

Sampel yang digunakan adalah 24 ekor tikus *Sprague dawley* jantan dengan berat 200–300 gram dan berusia 3–5 bulan. Pengambilan sampel penelitian menggunakan *simple random sampling* yang terbagi dalam 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (K-) dan kelompok perlakuan (P), masing-masing kelompok terbagi menjadi 3 sub kelompok berdasarkan lama pemberian minyak ikan lemuru yaitu 7, 14 dan 21 hari. Sampel yang telah diadaptasikan selama 7 hari, kemudian diinduksi CFA dengan dosis 0.08 ml dan ditunggu selama 6 minggu untuk mendapatkan model tikus osteoarthritis. Selanjutnya pada kelompok perlakuan diberikan minyak ikan lemuru dengan dosis 1ml/150-200gram BB selama 7, 14 dan 21 hari, serta kelompok kontrol negatif didekapitasi bersamaan dengan kelompok perlakuan. Setelah itu, dilakukan proses pembuatan preparat, pewarnaan *imunohistokimia* dan pengamatan histopatologi. Untuk mengetahui ekspresi TNF- α , dapat dilakukan perhitungan skor histologi sebagai berikut :

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

Keterangan :

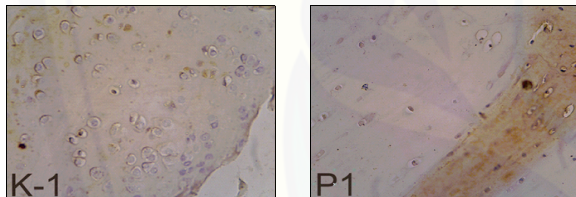
- I = Intensitas
- P = Persentase
- K = Kuat
- S = Sedang
- L = Lemah
- N = Normal

Persentase didapat dari jumlah kondrosit yang mengekspresikan TNF- α per jumlah kondrosit total dikali 100%.

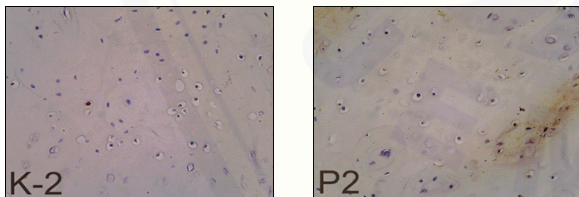
Penelitian ini menggunakan uji analisis statistik *One Way Anova* dengan *post hoc* uji beda *LSD*.

Hasil Penelitian

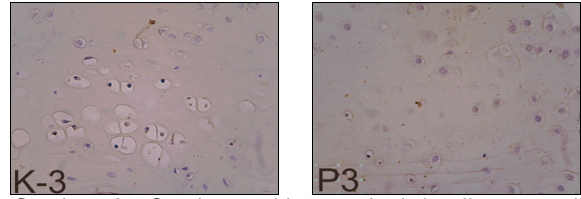
Gambaran histopatologi sendi tibiofemoral pada tiap kelompok yang dibuat dengan pewarnaan *imunohistokimia* (IHC) dengan perbesaran 400x dapat dilihat pada gambar 1 hingga 3 dan gambar 4 untuk melihat grafik rerata skor histologi pada tiap kelompok.



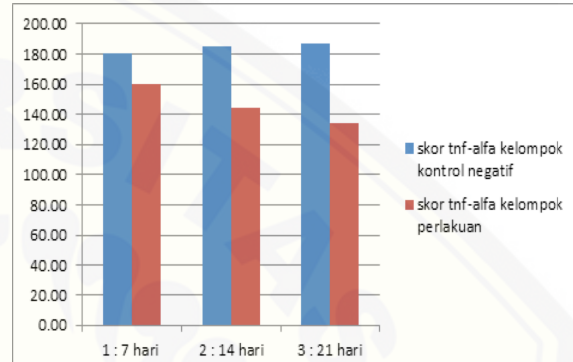
Gambar 1. Gambaran histopatologi kartilago sendi tibiofemoral pada kelompok kontrol negatif (K-1) yang didekapitasi pada hari ke-7 dan kelompok perlakuan (P1) yang diberikan minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) selama 7 hari.



Gambar 2. Gambaran histopatologi kartilago sendi tibiofemoral pada kelompok kontrol negatif (K-2) yang didekapitasi pada hari ke-14 dan kelompok perlakuan (P2) yang diberikan minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) selama 14 hari.



Gambar 3. Gambaran histopatologi kartilago sendi tibiofemoral pada kelompok kontrol negatif (K-3) yang didekapitasi pada hari ke-21 dan kelompok perlakuan (P3) yang diberikan minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) selama 21 hari.



Gambar 4. Rerata skor histologi ekspresi TNF- α pada tiap kelompok.

Hasil penelitian yang telah didapatkan selanjutnya dilakukan analisis data statistik dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Analisa data statistik yang digunakan yaitu uji *Shapiro-Wilk* untuk uji normalitas data dan uji *Homogenitas* dan *Levene's Test* untuk mengetahui normalitas dan homogenitas antar kelompok. Bila data berdistribusi normal dan varians data homogeny maka dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*. Hasil uji *Shapiro-Wilk* dan *Levene's Test* dapat dilihat pada tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Hasil Uji *Shapiro-Wilk*

Kelompok kontrol negatif (K-)	Sig.	Kelompok perlakuan (P)	Sig.
K-1	0,579*	P1	0,726*
K-2	0,731*	P2	0,886*
K-3	0,604*	P3	0,184*

Keterangan : * = Data berdistribusi normal ($p > 0,05$)

Tabel 2. Hasil Uji Levene's Test

Variabel	p
Ekspresi TNF- α	0,316*

Keterangan : * = Data berdistribusi normal
($p > 0,05$)

Setelah diketahui bahwa data berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan antara keempat kelompok penelitian. Hasil uji *One Way Anova* dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji *One Way Anova*

ANOVA					
trn_Sel_Nekrosis					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9950,567	5	1990,113	42,964	0,000
Within Groups	833,770	18	46,321		
Total	10784,337	23			

Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan signifikansi (p) 0,000 ($p < 0,05$) sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok penelitian. Selanjutnya pada uji post hoc LSD menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol negatif (K-1), (K-2), (K-3) dengan kelompok perlakuan (P1), (P2), (P3) dan antara masing-masing sub kelompok perlakuan. Sedangkan antara sub kelompok kontrol negatif tidak ada perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$).

Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif memiliki skor TNF- α lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Hal ini dikarenakan pada kelompok kontrol terjadi proses inflamasi pada persendian yang terus-menerus dan menghasilkan kerusakan sendi yang progresif. Proses inflamasi yang terjadi pada sendi karena rangsangan mekanik, kimiawi atau fisik sehingga mengakibatkan kerusakan sel dan memicu pelepasan fosfolipid. Fosfolipid dirubah menjadi asam arakidonat (AA) dengan bantuan enzim fosfolipase A2 sehingga kadar AA jaringan akan meningkat. AA merupakan suatu

asam lemak tak jenuh ganda dengan 20 atom karbon yang berasal dari asam linoleat makanan dan terdapat di dalam tubuh, terutama dalam bentuk ester sebagai suatu komponen fosfolipid membrane sel. Proses metabolisme AA terjadi melalui jalur siklooksigenase yang menyintesis prostaglandin PGE2 dan tromboksan TXA2, dan lipooksigenase yang menyintesis leukotrien LtB4 dan lipoksin [8]. TXA2 dapat mengaktifasi makrofag, dan kondrosit untuk menghasilkan IL-1 β dan TNF- α yang berperan penting dalam proses inisiasi dan perkembangan kerusakan kartilago [9]. Pembentukan IL-1 β dan TNF- α tersebut dapat memicu terbentuknya enzim matrik metalloproteinase (MMPs) dan kolagenase yang berperan dalam proses kerusakan kolagen kartilago sendi. Pembentukan sitokin proinflamasi juga dapat memicu terjadinya apoptosis sel kondrosit [10].

Pemberian minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) ternyata berpengaruh terhadap skor ekspresi TNF- α pada kartilago sendi tikus yang mengalami osteoarthritis. Pada hasil penelitian menunjukkan kelompok dengan pemberian minyak ikan lemuru selama 7 hari (P1), 14 hari (P2) dan 21 hari (P3) menunjukkan skor TNF- α lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol negatif (K-1), (K-2) dan (K-3). Hal ini dikarenakan minyak ikan lemuru banyak mengandung asam lemak omega 3 yang berpotensi sebagai penghambat proses inflamasi sendi. Asam lemak omega 3 yang terkandung dalam minyak ikan diubah menjadi *eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *docosahexaenoic acid* (DHA). EPA dan DHA tersebut akan bersaing langsung dengan asam arakidonat (AA) untuk proses oksigenase (siklooksigenase dan lipooksigenase) dan mensintesis eikosanoid dari EPA dan DHA. Eikosanoid yang dihasilkan dari EPA dan DHA berupa prostaglandin PGE3, tromboksan TXA3 dan leukotrin LtB5 yang bersifat antiinflamasi [11]. Diet minyak ikan juga berpotensi menurunkan produksi eikosanoid yang berasal dari AA sehingga dapat menurunkan pembentukan mediator-mediator proinflamasi yang memicu kerusakan kartilago sendi [12].

Selain itu, perbandingan ekspresi TNF- α antara tiap kelompok perlakuan makin hari makin menurun yang artinya pada hari ke 21 merupakan hari yang paling efektif dibandingkan hari-hari sebelumnya. Hal ini dikarenakan semakin lama pemberian minyak ikan Lemuru maka akan semakin meningkat kadar EPA dan DHA dalam jaringan sehingga daya hambat proses inflamasi minyak ikan semakin baik bagi

persendian. Hal ini diduga kadar EPA dan DHA semakin meningkat seiring dengan bertambahnya hari. Meningkatnya kadar EPA dan DHA dalam jaringan tersebut berpotensi menghambat sintesis mediator proinflamasi yang dapat memicu diferensiasi osteoklas [12]. Kadar EPA dan DHA yang meningkat tersebut akan bersaing langsung dengan AA untuk dimetabolisme oleh enzim siklooksigenase dan lipooksigenase sehingga dapat menurunkan proses inflamasi yang terjadi pada persendian [11].

Simpulan dan Saran

Kesimpulan pada penelitian ini adalah Minyak ikan lemuru dapat berpengaruh dalam menurunkan ekspresi TNF- α pada kartilago sendi yang diinduksi CFA dan waktu yang paling efektif dalam menurunkan TNF- α adalah 21 hari.

Berdasarkan dari hasil penelitian ini, diperlukan penelitian lebih lanjut tentang ekstrak minyak ikan lemuru sebagai anti-inflamasi, tentang dosis optimal dari minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*), tentang perbandingan kelompok kontrol positif dan perlakuan, serta penelitian lebih lanjut menggunakan perbedaan dosis minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*).

Daftar Pustaka

- [1] Indonesian Rheumatology Association . Diagnosis dan penatalaksanaan osteoarthritis; 2014
- [2] Solomon L, Warwick D, Nayagam S. Apley and Solomon's Concise System of Orthopaedics and Trauma. Fourth Edition. Liverpool; CRC Press. 2014.
- [3] Irianto J, Martins RP, Lee DA. The effect of osmotic challenge on levels of chromatin condensation and histone expressions in chondrocyte. In Orthopedic Research Society Annual Meeting. San Antonio, TX. 2013
- [4] Dewi EN. Isolasi Asam Lemak Omega-3 Dari minyak hasil limbah penepungan dan pengalengan ikan lemuru. Skripsi, Fateta, IPB-Bogor. 1996
- [5] Indahyani DE, Barid I, Handayani, Ari W. Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) Meregulasi Survival Osteoblas dan Osteoklas, Ekspresi Integrin Av β 3 Tulang Alveolaris serta Struktur Gigi pada Tikus yang Mengalami Infeksi Periodontal Selama Masa Odontogenesis. Dipublikasikan. Laporan Hasil Penelitian. Jember: Universitas Jember. 2008.
- [6] Green EA, Flavell RA. The temporal importance of TNF-a expression in the development of arthritis rheumatoid. J Immun. 2000 ;12: 459-469
- [7] Robin Dwi Merry C. The Effect of Curcuninoid to The Collagen Fibers Density of Osteoarthritis of Temporomandibular Joint. The Indonesian Journal of Dental Research. 2006: 197-201
- [8] Robbins SL, Cotran RS, dan Kumar V. Buku Ajar Patologi, Edisi ke 7. Jakarta: EGC. 2007.
- [9] Ogura N, Kondoh T. Molercular Aspects In Inflammatory Events of Temporomandibular Joint: Microarray-Based Identification of Mediators. J Dent Sci Rev. 2015; 51: 10-24
- [10] Pansulaia I, Kalichman L, Konyliansky E. Association Between Radiographic Hand Osteoarthritis and RANKL, OPG, and Inflammatory Markers. Osteoarthr cartilage. 2010; 18: 1448-1463.
- [11] Calder PC. n-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Inflammation, and Inflammatory Disease. Am J Clin Nutr. 2006; 83: 1505S-19S.
- [12] Indahyani DE. Potensi Minyak Ikan dalam Mencegah dan Mengobati Reumatoid Arthritis. Stomatognatic. 2003 ;1(1): 1-4.