



**PERBEDAAN LAMA PEMBERIAN MINYAK IKAN LEMURU  
TERHADAP JUMLAH SEL FIBROBLAS JARINGAN IKAT  
PADA TIKUS MODEL REUMATOID ARTRITIS**

**SKRIPSI**

Oleh

**Asyirah Mujahidah Fillah  
NIM 122010101047**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2017**



**PERBEDAAN LAMA PEMBERIAN MINYAK IKAN LEMURU  
TERHADAP JUMLAH SEL FIBROBLAS PADA TIKUS  
MODEL REUMATOID ARTRITIS**

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Asyirah Mujahidah Fillah  
NIM 122010101047**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2017**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas pertolongan yang telah diberikan dalam setiap langkah pendidikan yang saya ambil;
2. Kedua orang tuaku tercinta, Ummi Sri Rukmini Budarti dan Abi Muhammad Ma'shum yang tak pernah lelah memberikan doa, dukungan, dan pengorbanan yang tiada terhingga;
3. Guru-guruku yang telah memberikan ilmu dan mendidiku dengan penuh kesabaran untuk menjadikanku sebagai manusia yang berilmu dan bermanfaat;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas seluruh kesempatan menimba ilmu yang berharga ini.

**MOTO**

Dan berjuanglah di jalan Allah dengan sebenar-benar perjuangan.\*)



---

\*Surat Al-Hajj ayat 78. Al-Qur'anul Karim

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Asyirah Mujahidah Fillah

NIM : 122010101047

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Perbedaan Lama Pemberian Minyak Ikan Lemuru terhadap Jumlah Sel Fibroblas Jaringan Ikat pada Tikus Model Reumatoid Arthritis” 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, 7 Februari 2017

Yang menyatakan,

Asyirah Mujahidah Fillah  
122010101047

**SKRIPSI**

**PERBEDAAN LAMA PEMBERIAN MINYAK IKAN LEMURU  
TERHADAP JUMLAH SEL FIBROBLAS JARINGAN IKAT  
PADA TIKUS MODEL REUMATOID ARTRITIS**

Oleh

Asyirah Mujahidah Fillah  
NIM 122010101047

Pembimbing:

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

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Dwita Aryadina R., M.Kes

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Perbedaan Lama Pemberian Minyak Ikan Lemuru terhadap Jumlah Sel Fibroblas Jaringan Ikat pada Tikus Model Reumatoid Arthritis” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Selasa, 7 Februari 2017

Tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji

Penguji I,

Penguji II,

Dr. rer. biol. hum. dr. Erma S., M.Si  
NIP 19770222 200212 2 001

Dr. dr. Yunita Armiyanti, M.Kes  
NIP 19740604 200112 2 002

Penguji III,

Penguji IV,

dr. Rena Normasari, M.Biomed  
NIP 19830512 200812 2 002

dr. Dwita Aryadina, M.Kes  
NIP 19801027 200812 2 002

Mengesahkan,  
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember

dr. Enny Suswati, M.Kes  
NIP 19700214 199903 2 001

## RINGKASAN

**Perbedaan Lama Pemberian Minyak Ikan Lemuru terhadap Jumlah Sel Fibroblas Jaringan Ikat pada Tikus Model Reumatoid Arthritis;** Asyirah Mujahidah Fillah; 122010101047; 2017; 64 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Reumatoid arthritis adalah penyakit dengan prevalensi tertinggi kedua di Indonesia yang merupakan proses inflamasi kronis. Penyakit ini termasuk penyakit nyeri sendi yang sangat progresif dan paling sering menimbulkan kecacatan. Manifestasi utama dari reumatoid arthritis yaitu inflamasi, menyebabkan pelepasan berbagai sitokin yang memicu peningkatan jumlah sel fibroblas dan aktivasi pro MMP sehingga sekresi MMP (*matrix metallo proteinase*) meningkat pada jaringan ikat. Pembuatan model reumatoid arthritis pada penelitian ini dengan menginjeksikan CFA (*complete freund's adjuvant*) secara intra artikular. Obat anti inflamasi non steroid (OAINS) merupakan penanganan yang diberikan untuk mengurangi gejala inflamasi pada reumatoid arthritis yang memiliki berbagai efek samping terutama jika dikonsumsi oleh penderita lanjut usia. Alternatif anti inflamasi lain diperlukan untuk menangani masalah tersebut dengan cara memanfaatkan potensi antiinflamasi dari sumber daya kelautan salah satunya adalah ikan lemuru. Ikan lemuru yang diekstrak menjadi minyak ikan telah diteliti memiliki kandungan omega 3 PUFA (*polyunsaturated fatty acids*) berupa EPA (*eicosapentaenoic acid*) dan DHA (*docohexaenoic acid*) yang berpotensi mensubstitusi sitokin PGE2 (prostaglandin E2) dengan eikosanoid yang disintesisnya yaitu PGE3 (prostaglandin E3). Minyak ikan lemuru telah diketahui efektifitasnya terhadap penurunan efek inflamasi, akan tetapi efektifitas minyak ikan lemuru terhadap penurunan jumlah sel fibroblas jaringan ikat ditinjau dari lama pemberian belum pernah diteliti sebelumnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan lama pemberian minyak ikan lemuru terhadap jumlah sel fibroblas jaringan ikat pada tikus model rheumatoid arthritis. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi wahana pengetahuan bagi peneliti selanjutnya yang tertarik untuk meneliti tentang aktivitas anti inflamasi minyak ikan lemuru secara lebih dalam.

Penelitian ini menggunakan metode *true experimental* dengan rancangan penelitian *randomized post test only control group design*. Hewan coba yang digunakan berupa tikus galur sebanyak 24 ekor, dibagi menjadi 6 kelompok yakni 3 kelompok kontrol negatif yang dibedakan berdasarkan hari dekapitasi dan 3 kelompok perlakuan yang dibedakan berdasarkan lama pemberian minyak ikan lemuru. Uji normalitas yang dipilih adalah *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel yang digunakan  $\leq 50$ . Secara keseluruhan, hasil uji *Shapiro-Wilk* didapatkan nilai signifikansi  $p > 0,05$  sehingga data tersebut dinyatakan terdistribusi dengan normal. Hasil uji statistik parametrik *One Way Anova* didapatkan signifikansi 0,004 yang berarti minimal terdapat sepasang kelompok yang memiliki perbedaan

jumlah sel fibroblas yang signifikan. Lalu dilanjutkan dengan uji LSD dan didapatkan perbedaan signifikan pada kelompok perlakuan yang diberi minyak ikan lemuru selama 7 hari dengan pemberian 21 hari. Kesimpulan penelitian ini adalah terdapat perbedaan jumlah sel fibroblas pada jaringan ikat model reumatoid arthritis akibat perbedaan lama pemberian minyak ikan lemuru.



## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Perbedaan Lama Pemberian Minyak Ikan Lemuru terhadap Jumlah Sel Fibroblas Jaringan Ikat pada Tikus Model Reumatoid Arthritis”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

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

1. dr. Enny Suswati, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Rena Normasari, M.Biomed. selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Dwita Aryadina Rachmawati, M.Kes. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah banyak membimbing dalam pengerjaan dan penulisan skripsi;
3. Dr. rer. biol. hum. dr. Erma Sulistyaningsih, M.Si. selaku Dosen Penguji I dan dr. Yunita Armiyanti, M.Kes. selaku Dosen Penguji II atas bimbingan dan masukannya;
4. Abi Muhammad Ma'shum dan Ummi Sri Rukmini atas segala kasih sayang, pengorbanan dan doa restu yang selalu tercurah;
5. Rekan-rekan kerja terbaik (Kiki Andari, Hans Kristian Owen, Erdito Muro Suyono) atas bantuan dan kerjasamanya;
6. Teman-teman seperjuangan (Aditya Widya Pramana, Gilang Vigorous, Raditya Rangga, Sanggam Atmajaya Nugraha, Imam Adi Nugroho, Dzurrotul Athiyat) atas bantuan, dukungan dan semangat selama proses pengerjaan skripsi;
7. Sahabatku Andika Gayuh Prasetyo dan teman-teman UKM TS Unmuh Jember atas bantuan, semangat dan doanya;
8. Analis dan civitas akademika Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

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, 7 Februari 2017

Penulis

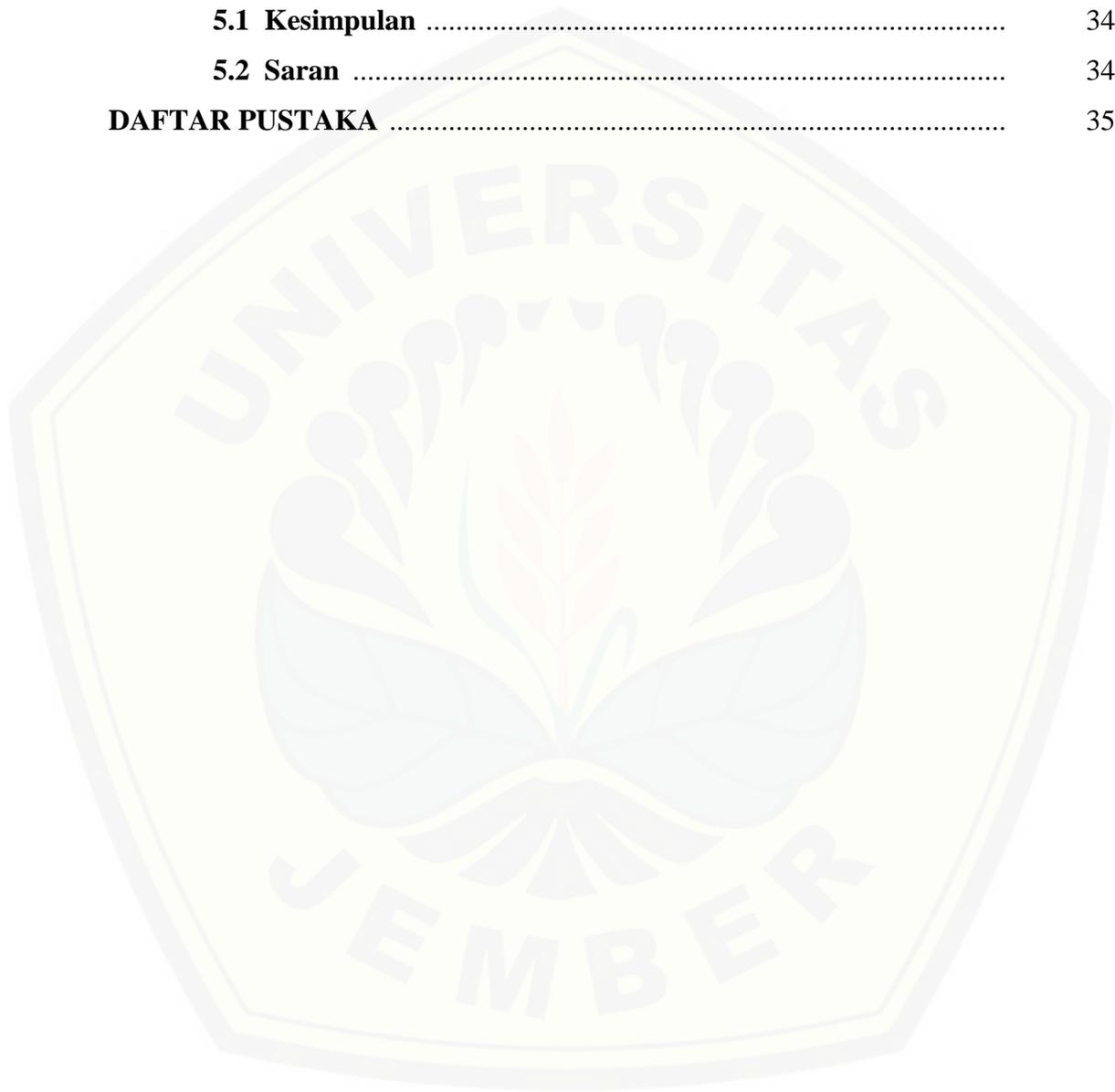


DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL .....	i
HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
HALAMAN MOTO .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN BIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN .....	viii
PRAKATA .....	x
DAFTAR ISI .....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xv
DAFTAR TABEL .....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Manfaat .....</b>	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Rheumatoid Arthritis .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Sel Fibroblas .....</b>	<b>8</b>
<b>2.3 Ikan Lemuru (<i>Sardinella longiceps</i>) .....</b>	<b>11</b>
2.3.1 Morfologi.....	11
2.3.1 Kandungan Gizi .....	12
<b>2.4 Complete Freund's Adjuvant .....</b>	<b>13</b>
<b>2.5 Kerangka Konsep .....</b>	<b>14</b>
<b>2.6 Hipotesis .....</b>	<b>16</b>
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>17</b>

<b>3.1 Jenis Penelitian</b> .....	17
<b>3.2 Rancangan Penelitian</b> .....	17
<b>3.3 Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	18
<b>3.4 Populasi, Sampel dan Besar Sampel Penelitian</b> .....	18
3.4.1 Populasi Penelitian.....	18
3.4.2 Sampel Penelitian.....	18
3.4.3 Besar Sampel Penelitian.....	19
<b>3.5 Variabel Penelitian</b> .....	19
3.5.1 Variabel Bebas.....	19
3.5.2 Variabel Terikat.....	19
3.5.3 Variabel Terkendali.....	19
<b>3.6 Definisi Operasional</b> .....	20
3.6.1 Minyak Ikan Lemuru.....	20
3.6.2 Jumlah Sel Fibroblas.....	20
<b>3.7 Alat dan Bahan Penelitian</b> .....	20
3.7.1 Pembuatan Minyak Ikan Lemuru.....	20
3.7.2 Perawatan Hewan Coba.....	21
3.7.3 Perlakuan Hewan Coba.....	21
3.7.4 Dekapitasi Dan Pengambilan Sampel.....	21
3.7.5 Pembuatan dan Pewarnaan Preparat.....	21
<b>3.8 Prosedur Penelitian</b> .....	22
3.8.1 <i>Ethical Clearance</i> .....	22
3.8.2 Persiapan Sampel Penelitian.....	22
3.8.3 Pembuatan Minyak Ikan Lemuru.....	22
3.8.4 Perlakuan pada Hewan Coba Selama Penelitian.....	23
3.8.5 Pembuatan Preparat Histopatologi.....	24
3.8.6 Pewarnaan HE ( <i>Hematoxilin Eosin</i> ).....	25
3.8.7 Pengamatan Histopatologi.....	25
<b>3.9 Analisis Data</b> .....	26
<b>3.10 Alur Penelitian</b> .....	26
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	28

<b>4.1 Hasil Penelitian</b> .....	28
<b>4.2 Analisis Data</b> .....	30
<b>4.3 Pembahasan</b> .....	31
<b>BAB 5. PENUTUP</b> .....	34
<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	34
<b>5.2 Saran</b> .....	34
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	35



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Sel Fibroblas .....	9
2.2 Ikan Lemuru ( <i>Sardinella longiceps</i> ) .....	12
2.3 Mekanisme inflamasi karena induksi CFA.....	14
2.4 Skema Kerangka Konsep Penelitian.....	15
3.1 Skema rancangan penelitian .....	16
3.2 Lapang pandang yang digunakan untuk menghitung .....	25
3.3 Skema alur penelitian.....	27
4.1 Grafik rata-rata jumlah sel fibroblas .....	28
4.2 Gambaran histopatologi sel fibroblas dengan pembesaran 400x pada contoh tiap kelompok sampel.....	29

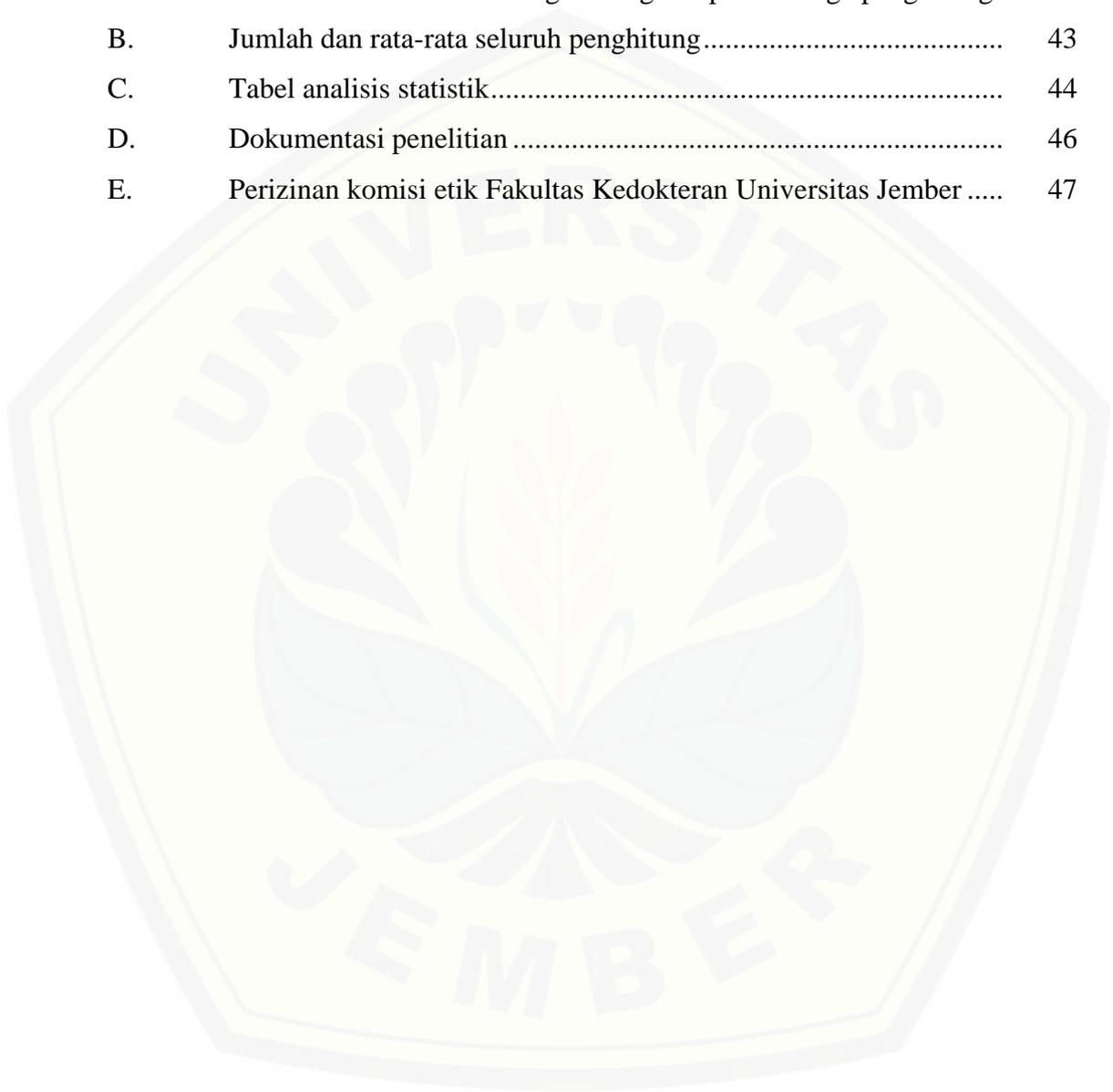
**DAFTAR TABEL**

		Halaman
2.1	Kriteria klasifikasi RA (algoritme berdasarkan skor).....	6
4.1	Hasil uji LSD .....	30



**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
A. Jumlah dan rata-rata masing-masing sampel oleh tiga penghitung.	40
B. Jumlah dan rata-rata seluruh penghitung.....	43
C. Tabel analisis statistik.....	44
D. Dokumentasi penelitian .....	46
E. Perizinan komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember .....	47



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2013 mencatat lima penyakit dengan prevalensi tertinggi di Indonesia berurutan dari peringkat pertama yaitu hipertensi, disusul penyakit sendi, hepatitis B, balita kekurangan gizi dan serangan stroke. Lain halnya dengan hipertensi, penyakit dengan prevalensi tertinggi kedua yaitu penyakit sendi masih belum mendapatkan perhatian khusus dalam upaya penanggulangannya. Penyakit yang mendapat perhatian khusus dalam program penanggulangan penyakit kronis oleh pemerintah masih terbatas pada hipertensi dan diabetes mellitus tipe 2. Padahal penyakit sendi banyak menyebabkan cacat pada penderitanya. Penyakit ini menimbulkan penderitaan yang begitu lama dan berat sehingga penyakit ini tergolong penyakit kronik terberat dipandang dari kepentingan sosial dan ekonomi (Deslinda, 2011).

Penyakit sendi yang dalam bahasa medis disebut artritis merupakan proses peradangan (inflamasi) kronis pada persendian yang ditandai dengan pembengkakan dan nyeri sendi serta destruksi sendi sinovial yang mengakibatkan disabilitas parah (Aletaha *et al.*, 2010). Terdapat banyak jenis artritis, salah satunya reumatoid artritis (RA) yang sangat progresif dan paling sering menimbulkan kecacatan (Price dan Wilson, 2006). Untuk keperluan penelitian, kondisi inflamasi seperti pada RA ini dapat diinduksi dengan *Complete Freund's Adjuvant* yang merupakan salah satu ajuvan yang paling umum digunakan. *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) menghasilkan reaksi inflamasi kuat pada lokasi deposisi antigen akibat pembentukan influks leukosit dan interaksinya dengan antigen (Billiau dan Mathis, 2001). Sesuai dengan prosesnya yaitu peradangan, maka RA dapat menunjukkan gejala nyeri, bengkak, kemerahan, rasa hangat pada sendi dan yang membedakan RA dengan jenis artritis lainnya adalah destruksi sendi progresif. Pelepasan mediator inflamasi dari leukosit, kondrosit, dan sinoviosit menyebabkan kehilangan proteoglikan dan matriks ekstraselular kartilago sehingga terjadi kerusakan tulang. Kerusakan dan hilangnya kolagen dan kondrosit dapat menyebabkan perubahan yang tidak dapat

kembali (*irreversible*). Perubahan histopatologi yang dapat diperhatikan adalah degradasi matriks dan peningkatan jumlah sel fibroblas.

Sel fibroblas adalah sel aktif utama jaringan ikat yang bertanggung jawab untuk menyusun matriks ekstraselular dan kolagen. Sel ini akan menjadi sangat aktif dan bertambah jumlahnya bila ada kebutuhan akan serat kolagen (Pap *et al.*, 2000). Proses inflamasi dalam kondisi RA yang berupa degradasi matriks merupakan contoh keadaan yang akan meningkatkan jumlah fibroblas dan menjadikannya sangat aktif. Tata laksana RA pada dasarnya bertujuan untuk meringankan gejala dari inflamasi yang terjadi dan mencegah kerusakan sendi lebih lanjut, dengan kata lain hanya akan mengurangi dampak dan progresivitas penyakit, tidak dapat memulihkan sepenuhnya. Pengobatan penyakit ini selalu melibatkan keterkaitan antara terapi farmakologis dan non-farmakologis seperti pengaturan asupan makanan, aktivitas fisik, dan lain sebagainya (Arthritis Foundation, 2008). Salah satu komponen terapi farmakologis untuk RA adalah obat anti inflamasi golongan non steroid (OAINS). Sayangnya, OAINS dapat menimbulkan efek samping gastrointestinal seperti dispepsia, ulserasi, perdarahan atau perforasi (Lelo *et al.*, 2004). Oleh karena itu, semakin banyak penelitian dilakukan untuk menemukan terapi anti inflamasi dari bahan alam yang dinilai memiliki efek samping minimal.

Indonesia adalah negara maritim yang luas wilayah perairannya mencapai 5,8 juta km<sup>2</sup> atau sama dengan 2/3 luas wilayah negara. Negara ini menyimpan potensi kekayaan sumber daya kelautan yang belum dieksplorasi dan dieksploitasi secara optimal, bahkan sebagian belum diketahui potensi yang sebenarnya (Ramdhan dan Arifin, 2013). Dewasa ini semakin banyak penelitian yang mengangkat sumber daya kelautan sebagai obat bahan alam, salah satunya yaitu untuk menemukan formula penyembuhan penyakit tulang dan gigi dengan bahan minyak ikan.

Salah satu jenis ikan yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia adalah ikan pelagik kecil (Irianto, 2007). Ikan lemuru (*Sardinella longiceps*)

adalah salah satu jenis ikan pelagik kecil yang banyak terdapat di Indonesia. Meskipun jumlahnya banyak dan sering dikonsumsi masyarakat, rupanya pemanfaatan ikan lemuru masih kurang optimal. Minyak ikan lemuru yang merupakan hasil ekstraksi limbah industri pengalengan misalnya, masih lebih banyak dimanfaatkan untuk bahan kosmetik dan industri penyamakan kulit (Cahyanto *et al.*, 1997). Padahal, minyak ikan lemuru kaya akan asam lemak tak jenuh ganda berupa *eicosa pentaenoic acid* (EPA) dan *docosa pentaenoic acid* (DHA) yang berperan dalam mengganti prostaglandin E2 (PGE2) pada asam arakhidonat (AA) yang bersifat inflamasi dan menyebabkan nyeri sendi menjadi prostaglandin E3 (PGE3) yang memiliki efek anti inflamasi (Indahyani *et al.*, 2008). Oleh karena itu, peneliti ingin mengkaji tentang perbedaan lama pemberian minyak ikan lemuru terhadap jumlah sel fibroblas jaringan ikat tikus model artritis.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat perbedaan jumlah sel fibroblas jaringan ikat tikus model reumatoid artritis akibat perbedaan lama pemberian minyak ikan lemuru?

## 1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan jumlah sel fibroblas jaringan ikat tikus model reumatoid artritis akibat perbedaan lama pemberian minyak ikan lemuru

## 1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat kepada beberapa pihak, antara lain sebagai berikut.

- a. Bagi akademisi, sebagai bahan perbandingan dan referensi untuk studi atau penelitian pada masa yang akan datang.
- b. Bagi peneliti, sebagai bahan pengembangan wawasan keilmuan dan wacana pengembangan penulisan mengenai pengobatan tradisional RA dengan minyak ikan lemuru.

- c. Bagi praktisi kedokteran, sebagai pengetahuan dan bahan pertimbangan strategi pencegahan progresivitas RA.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Reumatoid Arthritis

Reumatoid Arthritis (RA) adalah penyakit peradangan (inflamasi) kronik yang menyebabkan degenerasi jaringan ikat. Inflamasi pada RA terjadi secara terus-menerus terutama pada organ sinovium dan menyebar ke struktur sendi sekitarnya. Etiologinya tidak diketahui namun banyak kasus yang menyebutkan kelainan ini merupakan hasil dari interaksi faktor genetik, usia, infeksi, dan paparan lingkungan (Schun, 2005; Suarjana, 2009; Pradana *et al.*, 2012). Saat ini, RA diduga disebabkan oleh faktor autoimun dan infeksi. Autoimun bereaksi terhadap kolagen tipe II sedangkan faktor infeksi menghasilkan antigen tipe II kolagen (Alamanos dan Drosos, 2005; Rindfleisch dan Muller, 2005).

Pada kasus RA autoimun, sistem imun tidak mampu lagi membedakan komponen *self* dan *non-self* sehingga menyerang jaringan sinovial serta jaringan penokong lain. Inflamasi berlebihan merupakan manifestasi utama yang tampak pada kasus ini. Inflamasi terjadi karena paparan antigen yang dapat berupa antigen eksogen atau protein antigen endogen. Paparan antigen tersebut akan memicu pembentukan antibodi yang pada RA dikenal dengan *rheumatoid factor* (RF). *Rheumatoid factor* mengaktifkan komplemen kemudian memicu kemotaksis, fagositosis dan pelepasan sitokin (TNF- $\alpha$ , IL-1, dan IL-6) oleh sel mononuklear sehingga dapat mempresentasikan antigen kepada sel T CD4+. Aktivasi sel T CD4+ tersebut memicu sel-sel inflamasi datang ke area inflamasi lalu makrofag akan melepaskan prostaglandin dan sitotoksin. Aktivasi makrofag, limfosit, dan fibroblas juga dapat menstimulasi angiogenesis pada sinovial RA. Inflamasi kronis pada RA akan menyebabkan proliferasi berlebih membran sinovial (*pannus*) yang akan menginvasi kartilago dan permukaan tulang sehingga mengerosi tulang dan mengakibatkan kerusakan sendi (Schuna, 2005).

Inflamasi menyebabkan pelepasan berbagai protein sitokin. Sitokin memiliki fungsi antara lain memelihara keseimbangan tubuh selama terjadi respon imun, infeksi, kerusakan, perbaikan jaringan, membersihkan jaringan mati, darah yang membeku dan proses penyembuhan. Jika produksi sitokin meningkat,

kelebihan sitokin dapat menyebabkan kerusakan sendi yang serius saat inflamasi pada RA . Sitokin yang berperan penting pada RA antara lain TNF-  $\alpha$ , IL-1, dan IL-6. Saat inflamasi, leukosit berfungsi menstimulasi produksi molekul yang memiliki peran kunci salah satunya prostaglandin yang membuka pembuluh darah dan meningkatkan aliran darah (Wiralis, 2008).

Kriteria klasifikasi RA menurut *American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism* 2010 ditampilkan dalam Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Kriteria Klasifikasi RA (algoritme berdasarkan skor)

A. Kriteria keterlibatan sendi	Skor
1 sendi besar	0
2-10 sendi besar	1
1-3 sendi kecil	2
4-10 sendi kecil	3
>10 sendi	5
<b>B. Serologis</b>	
RF negatif dan anti-CCP negatif	0
RF positif rendah atau anti-CCP positif rendah	2
RF positif tinggi atau anti-CCP positif tinggi	3
<b>C. Acute phase reactant</b>	
CRP normal dan laju endap darah (LED) normal	0
CRP abnormal atau laju endap darah (LED) abnormal	1
<b>D. Durasi gejala</b>	
< 6 minggu	0
$\geq$ 6 minggu	1

(Sumber : Smolen *et al.*, 2010)

Jika jumlah skor kategori A-D  $\geq$  6/10 maka dapat dikategorikan menderita RA.

Hasil pemeriksaan laboratorium menunjukkan RF yang positif hingga 70%. Titer yang tinggi menunjukkan tingkat keparahan, erosi, dan penyebarannya ke ekstra-artikular. Kadar *anticyclic citrullinated peptide antibodies* (ACPA/anti-CCP) yang tinggi hingga 98% spesifik menunjukkan RA. Seringkali terjadi anemia pada kondisi RA kronis. Sedangkan kondisi inflamasi menyebabkan peningkatan jumlah platelet, ESR (*erithrocyte sedimentation rate*) dan CRP (*C-Reactive Protein*). Pemeriksaan radiologi menunjukkan pembengkakan jaringan ikat, osteopenia juxta artikular dan penyempitan ruang sendi. Kondisi lebih lanjut dapat menyebabkan erosi tulang, subluksasi atau destruksi komplis pada karpal (Longmore *et al.*, 2013). Destruksi kartilago dan tulang merupakan tahapan akhir RA. Destruksi dapat terjadi oleh serangan *pannus* pada kartilago dan tulang rawan sehingga menyebabkan erosi, kehilangan cairan sinovial dan terbentuk deformitas (Wiralis, 2008).

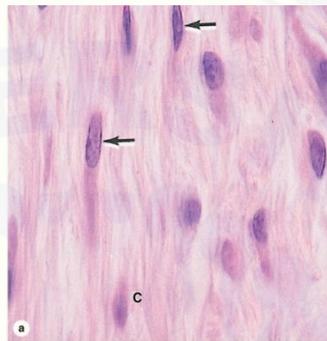
Tata laksana farmakologis pada manifestasi utama RA yang berupa inflamasi salah satunya adalah dengan obat anti inflamasi golongan non steroid (OAINS) (Jones *et al.*, 2010). Di sisi lain, OAINS berefek samping pada berbagai organ tubuh terpenting terutama saluran cerna. Seiring dengan perkembangan sediaan OAINS, para ahli mengupayakan penyediaan obat ini dengan efek samping yang seminimal mungkin, diantaranya mengubah formulasi dan penemuan sediaan OAINS baru. Akan tetapi sediaan terkinipun tidak mampu memberikan solusi yang terbaik sebab di satu sisi memberikan efek samping minimal terhadap suatu organ tubuh tertentu, tetapi memberi efek samping yang lebih besar terhadap organ tubuh yang lain. Obat ini bekerja dengan menghambat enzim *cyclooxygenase* (COX) sehingga konversi asam arakhidonat (AA) menjadi prostaglandin E2 (PGE2) terganggu. *Cyclooxygenase-1* (COX-1) selalu ada di berbagai jaringan tubuh dan berfungsi dalam mempertahankan fisiologi tubuh seperti produksi mukus di lambung sedangkan COX-2 merupakan enzim inducibel yang umumnya tidak terpantau di kebanyakan jaringan tapi akan meningkat pada keadaan inflamasi atau patologik. Obat anti inflamasi golongan non steroid (OAINS) yang bekerja sebagai *blocker* COX akan berikatan pada bagian aktif enzim pada COX-1 dan atau COX-2 sehingga enzim ini menjadi

tidak berfungsi dan tidak mampu merubah AA menjadi mediator inflamasi PG. Obat anti inflamasi golongan non steroid (OAINS) yang termasuk dalam penghambat selektif COX-1 seperti ketoprofen, piroxicam, indometasin dan aspirin memberikan efek analgesik yang cukup baik dan nyata akan tetapi sayangnya memberi resiko toksisitas saluran cerna yang besar, dapat mengakibatkan gangguan fungsi ginjal dan perdarahan pasca bedah. Ibuprofen, naproksen dan indometason diduga dapat memicu reaksi hipersensitivitas terutama ruam kulit dan bronkospasme. Adanya sediaan penghambat selektif COX-2 menunjukkan efek samping yang minimal pada saluran cerna. Akan tetapi hanya bermakna pada penggunaan jangka pendek karena COX-2 yang merupakan *cardioprotective protein* sangat dibutuhkan dalam menjaga kesehatan jantung. Jika aktifitas COX-2 dihambat akan berakibat semakin meningkatnya kejadian penyakit kardiovaskular (Fajriani, 2008). Penderita RA membutuhkan pengobatan untuk mengatasi nyeri yang terus dialaminya. Akibatnya banyak penderita RA yang beralih ke pengobatan alternatif yang dinilai lebih alami dan berefek samping minimal (Mulyaningsih dan Darmawan, 2006).

## 2.2 Sel Fibroblas

Reumatoid Arthritis (RA) merupakan kelainan sendi kronik dengan destruksi progresif yang menjadi pembeda dengan penyakit arthritis lainnya. Pap *et al.* (2000) mengemukakan bahwa inflamasi dan autoimun adalah ciri khas RA namun bukan merupakan satu-satunya mekanisme terjadinya. Bahkan ada bukti yang mengatakan bahwa selain makrofag dan sel T, fibroblas berperan dalam inisiasi dan perjalanan penyakit RA. Fibroblas (Gambar 2.1) adalah sel aktif utama pada jaringan ikat berbentuk besar, pipih, *spindle-shaped* dan nukleusnya oval pipih. Fibroblas akan menunjukkan perbedaan pada gambaran mikroskopis berupa bentuk sel yang tampak lebih bulat serta nukleus yang lebih besar dan lebih pucat. Fibroblas berperan dalam produksi serat kolagen dan serat retikulin yang dibutuhkan untuk menyusun matriks ekstraselular. Matriks ekstraselular dan kolagen akan bersama-sama membentuk jaringan struktural dan berperan penting dalam perbaikan jaringan (Pap *et al.*, 2000). Fibroblas juga dapat menghilangkan

serat-serat tersebut dengan mengekskresikan enzim seperti *collagenase* (MMP-1) dan elastase sehingga dapat dikatakan bahwa fungsi utama fibroblas adalah menjaga integritas struktur jaringan ikat dan mengatur *turnover* jaringan ikat dengan memproduksi enzim yang dapat mendegradasi kolagen (*collagenase*), elastin (*elastase*), proteoglikan dan glikosaminoglikan (*stromelysin* dan *lysosomal hydrolase*) (Lindner, 2012) (Anom, 2011).



Gambar 2.1 Sel Fibroblas (Sumber: Mescher, 2009)

Petunjuk pengamatan terkait fibroblas pada kondisi RA adalah gambaran morfologi dan biologi yang berbeda. Fibroblas menampilkan sifat aktivasi seluler yang akhirnya menghasilkan perilaku agresif dan infasif. Dari segi morfologik, bentuk sel tampak lebih bulat, nukleus besar dan pucat. Pap *et al.* (2000) menyatakan fibroblas pada RA berkontribusi nyata terhadap degradasi matriks melalui ekspresi enzim degradasi matriks seperti MMP (*matrix metallo-proteinase*). Menurut Anom (2011) MMP adalah suatu *zinc-independent endopeptidase* yang berhubungan dengan proses fisiologis dan patologis yang berkaitan dengan *turnover* matriks ekstraseluler, penyembuhan luka, angiogenesis, dan kanker. MMP mampu menimbulkan degradasi terhadap kolagen sehingga disebut enzim yang bertanggung jawab terhadap degradasi matriks ekstraseluler. Aktivitas MMP salah satunya diregulasi oleh mekanisme post translasional yang terjadi melalui aktivasi pro-MMP yang dipicu berbagai faktor, salah satunya prostaglandin E2 (PGE2). Inflamasi berdampak pada komponen membran sel yaitu fosfatidilkolin dan fosfatidil inositol yang diubah menjadi asam arakhidonat (AA). Selanjutnya, AA akan bercabang menjadi dua

jalur, siklooksigenase (COX) dan lipooksigenase (LOX). Pada jalur COX terbentuk PGE2 dan thromboxane (TXA2), sedangkan pada jalur LOX akan terbentuk leukotrin (LT4) (Siwik *et al.*, 2000). Banyak penelitian yang membuktikan keterlibatan MMP dalam destruksi sendi artritis. Fibroblas pada lapisan tepi atau pada lokasi kartilago yang terinvansi diidentifikasi sebagai sumber terbesar dari MMP. Disebutkan juga bahwa level ekspresi beberapa MMP berhubungan dengan level elevasi marker inflamasi sistemik. Sebuah studi menyatakan *membran type* (MT)-MMP juga ditemukan dalam lapisan fibroblas sinovial RA. Selain sinar UV dan stres oksidatif (Kim *et al.*, 2006), sitokin – sitokin inflamasi juga dapat mengaktifkan dan meningkatkan kadar MMP (Siwik *et al.*, 2000). Penelitian yang dilakukannya terhadap fibroblas membuktikan bahwa sitokin inflamasi seperti IL-1, TNF- $\alpha$ , dan IL-6 menurunkan sintesis kolagen masing-masing sebesar 32%, 12%, dan 11%. IL-1 dan TNF- $\alpha$  juga terbukti mampu meningkatkan aktivitas MMP. IL-1 juga diketahui menstimulasi fibroblas untuk menghasilkan kolagenase. TNF- $\alpha$  juga sebagai mediator proses destruksi jaringan dengan menstimulasi kolagenase dan degradasi kolagen tipe I oleh fibroblas. IL-1 sinergis dengan TNF- $\alpha$  dikenal paling berpotensi dalam menstimulasi resorpsi tulang terutama dalam memicu destruksi matriks jaringan ikat. IL-6 juga berperan dalam resorpsi tulang dan terbukti berhubungan langsung dengan destruksi jaringan ikat dan tulang. (Triskayani, 2010).

Fibroblas pada RA tidak hanya bereaksi pada stimulus pra-inflamasi namun juga berkontribusi aktif terhadap patogenesis RA didukung oleh penelitian yang menunjukkan efek signifikan fibroblas sinovial terhadap makrofag dan limfosit di sinovium yang menderita RA. Fibroblas sinovial berkontribusi terhadap degradasi matriks ekstraselular tidak hanya secara direk melalui pelepasan enzim degradator matriks namun juga indirek dengan cara mempengaruhi diferensiasi dan aktivasi osteoklas. Pap *et al.* (2000) berpendapat bahwa interaksi fibroblas dan makrofag menjadi mediator destruksi progresif pada kartilago dan tulang. Data lain mengindikasikan bahwa fibroblas juga menyebabkan akumulasi dan bertahannya limfosit pada sinovium RA. Maka pada

penelitian ini diasumsikan bahwa meningkatnya jumlah fibroblas menunjukkan adanya level MMP dan degradasi jaringan ikat yang relatif tinggi.

### 2.3 Ikan Lemuru (*Sardinella Longiceps*)

Ikan lemuru adalah kelompok ikan air laut yang termasuk kedalam jenis ikan pelagis kecil. Jenis ikan yang banyak dikonsumsi masyarakat Indonesia ini memiliki potensi yang cukup baik untuk pemenuhan gizi masyarakat karena nilai gizi dari jenis ikan tersebut tidak kalah dibandingkan dengan nilai gizi jenis ikan yang sering diekspor (Irianto, 2007).

Sistematika taksonomi ikan lemuru menurut Prasetyo (2010) diklasifikasikan sebagai berikut:

Filum	: Chordata
Sub Filum	: Vertebrata
Kelas	: Pisces
Sub Kelas	: Teleostei
Ordo	: Clupeiformes
Famili	: Clupeidae
Genus	: <i>Sardinella</i>
Spesies	: <i>Sardinella longiceps</i>

#### 2.3.1 Morfologi

Seperti jenis ikan lemuru pada umumnya, ikan ini berbentuk memanjang dengan jari-jari lunak sirip punggung sebanyak 13 – 21 buah dan jari-jari sirip anal sebanyak 12 – 23 buah. Ikan ini merupakan jenis lemuru yang dapat mencapai panjang maksimal 23 cm. Memiliki bintik hitam di belakang pembatas tutup insang dan warna kuning keemasan pada linea lateralisnya, kepalanya sangat panjang, kurang lebih 1/3 dari panjang tubuhnya, berwarna biru kehijauan pada bagian dorsal dan mengkilap pada bagian ventral. Ikan lemuru (Gambar 2.2) termasuk jenis ikan pemakan penyaring (*filter feeder*) dengan makanan utama berupa fitoplankton dan zooplankton (Susilo, 2015). Dia menyatakan bahwa sumberdaya ikan lemuru sangat khas dan mendominasi hasil tangkapan di Selat

Bali. Penyebaran dan kelimpahannya diduga sangat dipengaruhi kondisi lingkungan perairan maupun oseanografi. Bagi penjual ikan segar, ikan lemuru tergolong ikan yang tidak disukai karena mudah busuk sehingga penjualan ikan lemuru segar hanya terbatas di daerah pendaratan ikan seperti Muncar (Banyuwangi), Puger (Jember) dan Pengambengan (Bali). Di luar daerah itu, ikan lemuru dijual dalam bentuk olahan tradisional seperti ikan asin atau tepung ikan maupun non tradisional seperti sarden kaleng. Kandungan gizi ikan lemuru seperti omega-3 dapat diperoleh dari hasil ekstraksi limbah industri pengalengan (Cahyanto *et al.*, 1997).



Gambar 2.2 Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) (Sumber : Fadli, 2011)

### 2.3.2 Kandungan Gizi

Ikan, selain dikenal protein yang dikandungnya memiliki komposisi asam amino yang lengkap, juga diketahui mengandung lemak yang kaya akan asam lemak tak jenuh jamak atau *polyunsaturated fatty acids* (PUFA) yang berkhasiat bagi kesehatan. Minyak ikan lebih banyak mengandung PUFA. Pada umumnya komposisi minyak ikan dari ikan laut lebih kompleks dan mengandung asam lemak tak jenuh rantai panjang yang relatif lebih banyak dibandingkan dengan ikan air tawar (Irianto *et al.*, 1995). Rusmana (2008) menyatakan bahwa minyak ikan lemuru kaya akan asam lemak tak jenuh ganda berupa EPA dan DHA dan memiliki lebih dari 20 rantai karbon. Satu gram minyak ikan mengandung 180 mg EPA dan 120 mg DHA (Indahyani, 2008). PUFA yang banyak terdapat pada ikan adalah asam lemak omega-3.  $\omega$ -3 PUFA diubah menjadi *eicosapentaenoic acid*/EPA (C20:5,  $\omega$ -3) dan *docohexaenoic acid*/DHA (C22:6,  $\omega$ -3). *Eicosapentaenoic acid* (EPA) dikatakan mempunyai efek anti inflamasi karena kemampuannya merubah komposisi membran fosfolipid yang mengakibatkan

terjadinya perubahan fluiditas membran, ikatan sitokin dan reseptornya, aktivitas protein (Grimble dan Tappia, 1998). *Eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *docohexaenoic acid* (DHA) bersaing dengan asam arakidonat (AA) yang merupakan substrat *cyclooxygenase-2* (COX-2) untuk menembus membran fosfolipid dengan cara mensintesis eikosanoid yang struktur molekulnya mirip dengan eikosanoid dari AA (PGE<sub>2</sub>, bersifat inflamasi) tetapi mempunyai efek biologi yang berbeda yaitu prostaglandin E<sub>3</sub> (PGE<sub>3</sub>), tromboksan A<sub>3</sub> (TXA<sub>3</sub>) dan leukotrin B<sub>5</sub> (LTB<sub>5</sub>) yang bersifat anti inflamasi (Simopoulos, 2002) (Kim *et al.*, 2005) (Indahyani *et al.*, 2008) (Calder, 2006). Penelitian yang dilakukan Kim *et al.* (2005) menunjukkan bahwa EPA juga menghambat ekspresi MMP yang disekresikan oleh fibroblas. Penelitian yang dilakukan oleh Indahyani *et al.* (2011) juga menyimpulkan bahwa minyak ikan lemuru terbukti menurunkan ekspresi MMP.

#### **2.4 Complete Freund's Adjuvant**

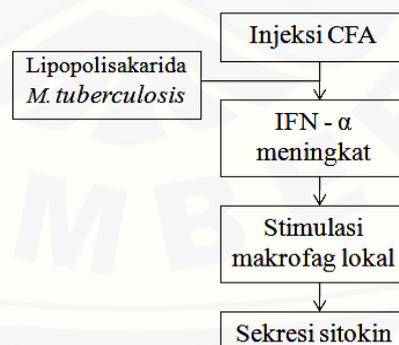
*Freund's Adjuvant* merupakan salah satu adjuvan yang paling umum digunakan untuk penelitian. Biasa digunakan sebagai emulsi air dalam minyak dan dibuat dari minyak non-metabolis seperti parafin dan manide monooleat. Jika adjuvan ini mengandung mycobacterium disebut *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) sedangkan jika tidak mengandung mycobacterium disebut *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA). Pertama kali dikembangkan oleh Jules Freund pada tahun 1940, adjuvan ini dirancang untuk memelihara kontinuitas pelepasan antigen-antigen yang diperlukan untuk stimulasi respon imun yang kuat dan persisten. Kerugian utama yang ditimbulkan adjuvan ini adalah granuloma, inflamasi pada lokasi injeksi, dan lesi. Mycobacterium dalam CFA menarik makrofag dan sel lain menuju lokasi injeksi yang dapat meningkatkan respon imun.

*Complete Freund's Adjuvant* (CFA) umumnya mengandung *Mycobacterium tuberculosis* atau *Mycobacterium butyricum* yang dilemahkan dengan cara dipanaskan (*heat-killed*) yang mana lebih poten dan lebih adekuat untuk tujuan tertentu. *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) efektif meningkatkan respon antibodi selular dan humoral terhadap immunogen yang diinjeksikan.

Aktivitas fase minyak dan stimulasi respon imun lokal bawaan yang menyebabkan peningkatan imunitas adaptif. Komponen penting dari respon ini adalah reaksi inflamasi kuat pada lokasi deposisi antigen akibat pembentukan influks lekosit dan interaksinya dengan antigen (Billiau dan Matthys, 2001). Lipopolisakarida dari *Mycobacterium tuberculosis* yang inaktif dalam CFA merupakan sebab terjadinya inflamasi pada hewan coba. Pemberian CFA akan menstimulasi fagositosis dan sekresi sitokin oleh fagositosis mononuklear, sehingga berbagai jenis sitokin seperti TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, PGE-2, NO, MMP dan mediator lainnya turut disekresikan (Calder, 2006).

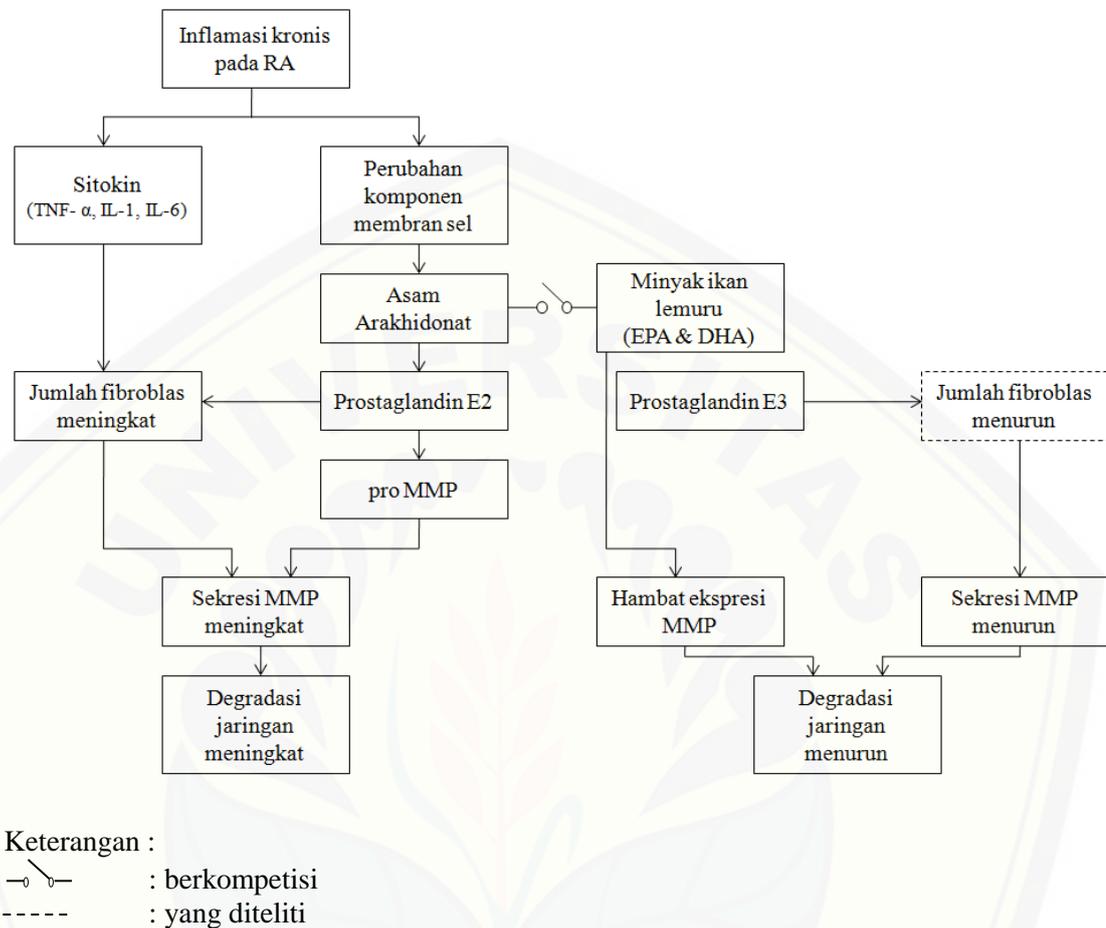
*Complete Freund's Adjuvant* (CFA) memacu inflamasi dan menghasilkan gambaran histopatologik yang analog dengan RA pada manusia. Induksi CFA diduga menyebabkan gangguan respon autoimun dan inflamasi kronik-sistemik. Respon autoimun meningkat dan dihasilkan inflamasi yang mirip RA. Pada RA yang diinduksi CFA menunjukkan peningkatan IFN- $\alpha$  yang diduga memacu makrofag pada lokal infeksi dan melepaskan sitokin inflamasi seperti IL-1 dan TNF- $\alpha$  (Wiralis, 2008).

Skema mekanisme inflamasi yang diinduksi oleh CFA dipaparkan dalam Gambar 2.3 berikut.



Gambar 2.3. Mekanisme inflamasi karena induksi CFA (Sumber : Billiau dan Matthys, 2001; Calder, 2006; Wiralis, 2008)

## 2.5 Kerangka Konsep



Gambar 2.4 Skema Kerangka Konsep Penelitian

Kondisi inflamasi menyebabkan sekresi sitokin (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) yang menyebabkan peningkatan jumlah sel fibroblas yang berakibat pada meningkatnya sekresi MMP (*matrix metallo-proteinase*). Inflamasi juga berpengaruh pada komponen membran sel yaitu fosfatidilkolin dan fosfatidil inositol yang diubah menjadi asam arakhidonat yang akan membentuk prostaglandin E2. Prostaglandin E2 menyebabkan sel fibroblas menjadi lebih aktif dan juga mengaktifasi pro-MMP yang mensekresikan MMP. Sekresi MMP yang meningkat menyebabkan degradasi jaringan semakin meningkat. *Eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *docohexaenoic acid* (DHA) yang terdapat pada minyak ikan lemuru berkompetisi dengan asam arakhidonat agar eikosanoid yang

disekresikan adalah prostaglandin E3 yang bersifat anti inflamasi yang mampu menurunkan jumlah fibroblas dan juga menghambat ekspresi MMP yang disekresikan oleh fibroblas yang berefek pada penurunan degradasi jaringan.

## **2.6 Hipotesis**

Terdapat perbedaan jumlah sel fibroblas jaringan ikat tikus model reumatoid artritis akibat perbedaan lama pemberian minyak ikan lemuru.



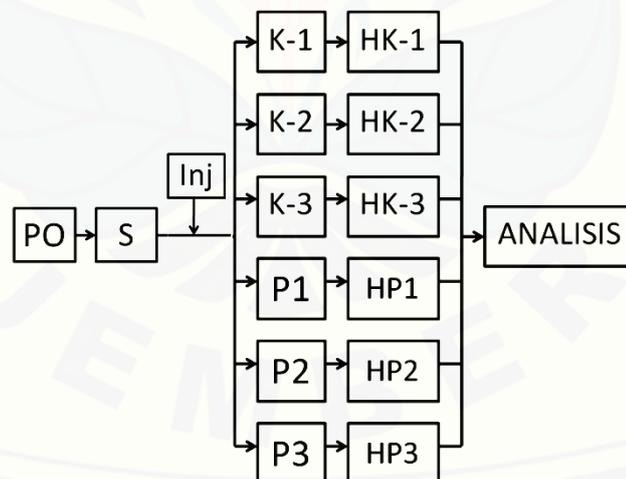
### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian

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

#### 3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *The Randomized Post Test Only Control Group Design*. (Notoadmodjo, 2010). Dalam penelitian ini terdapat 6 kelompok yang sampelnya dipilih secara random (R). Kelompok pertama, kedua dan ketiga merupakan kelompok kontrol negatif dengan perbedaan lamanya proses inflamasi. Sedangkan kelompok keempat, kelima dan keenam merupakan kelompok perlakuan dengan perbedaan lamanya pemberian minyak ikan lemuru. Dalam Gambar 3.1 berikut akan dijelaskan rancangan penelitian secara skematis.



Gambar 3.1 Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

PO : populasi tikus galur *Sprague Dawley*

S : sampel penelitian

Inj : sampel diinjeksi *Complete Freund's Adjuvant*

K-1 : kelompok kontrol negatif yang didekapitasi pada hari ke-7

- K-2 : kelompok kontrol negatif yang didekapitasi pada hari ke-14  
K-3 : kelompok kontrol negatif yang didekapitasi pada hari ke-21  
P1 : kelompok perlakuan yang diberi minyak ikan lemuru selama 7 hari  
P2 : kelompok perlakuan yang diberi minyak ikan lemuru selama 14 hari  
P3 : kelompok perlakuan yang diberi minyak ikan lemuru selama 21 hari  
HK-1 : hasil gambaran histopatologi kelompok kontrol negatif 1  
HK-2 : hasil gambaran histopatologi kelompok kontrol negatif 2  
HK-3 : hasil gambaran histopatologi kelompok kontrol negatif 3  
HP1 : hasil gambaran histopatologi kelompok perlakuan 1  
HP2 : hasil gambaran histopatologi kelompok perlakuan 2  
HP3 : hasil gambaran histopatologi kelompok perlakuan 3

### **3.3 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2015 hingga November 2016. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Laboratorium Kimia Dasar FMIPA Universitas Jember, Laboratorium Patologi Anatomi dan Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

### **3.4 Populasi, Sampel dan Besar Sampel Penelitian**

#### **3.4.1 Populasi Penelitian**

Populasi penelitian adalah hewan coba tikus jenis *Sprague Dawley* jantan dengan berat 200-300 gram. Keuntungan utama dari tikus jenis ini dibanding yang lainnya selain ukurannya yang lebih besar, terletak pada ketenangan dan kemudahan penanganannya.

#### **3.4.2 Sampel Penelitian**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Jenis kelamin jantan
- b. Umur 3-5 bulan dengan berat badan 200-300 gram
- c. Kondisi fisik sehat dan tidak mengalami kelainan

### 3.4.3 Besar Sampel Penelitian

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

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

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

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

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

$$P = t \times n = 6 \times 4 = 24 \text{ ekor}$$

Keterangan :

P = besar sampel yang dibutuhkan

t = jumlah kelompok

n = jumlah sampel

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

## 3.5 Variabel Penelitian

### 3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan pada penelitian ini adalah lama pemberian minyak ikan lemuru.

### 3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah sel fibroblas.

### 3.5.3 Variabel Terkendali

- a. Jenis hewan coba : Tikus galur *Sprague Dawley*
- b. Jenis kelamin : Jantan
- c. Berat badan : 200-300 gram
- d. Umur : 3-5 bulan

- e. Makanan tikus (pakan standar tikus merk Turbo 521-CP, Indonesia) dan minuman tikus (air minum kemasan Aqua).
- f. Tempat dan cara pemeliharaan tikus  
Hewan percobaan ditempatkan dalam kandang dengan ukuran 30 cm x 30 cm dengan suhu kelembaban ruangan sebesar 37°C (suhu kamar).
- g. Pemberian minyak ikan lemuru dengan sonde lambung
- h. Dosis CFA
- i. Prosedur pengambilan preparat
- j. Metode pewarnaan dengan menggunakan HE (*Hematoxilin Eosin*)

### **3.6 Definisi Operasional**

#### **3.6.1 Minyak Ikan Lemuru**

Minyak ikan yang digunakan diperoleh dari hasil proses pemerasan dan pemisahan molekul lemak dan air. Dosis minyak ikan lemuru yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1 ml/150-200 gram berat badan tikus (Indahyani, 2008). Diberikan pada kelompok P1, P2 dan P3 berurutan selama 7 hari, 14 hari dan 21 hari.

#### **3.6.2 Jumlah Sel Fibroblas**

Pengamatan ini dilakukan pada bagian jaringan ikat sendi tibiofemoral kanan dengan pewarnaan HE untuk mengetahui gambaran histopatologi sel fibroblas. Preparat sel fibroblas diamati pada enam lapang pandang dengan perbesaran 400x dan dihitung jumlah keenam lapang pandang secara manual. Penghitungan sel fibroblas dilakukan dengan metode blinding oleh tiga orang kemudian dirata-rata.

### **3.7 Alat dan Bahan Penelitian**

#### **3.7.1 Pembuatan Minyak Ikan Lemuru**

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

Bahan yang digunakan adalah ikan lemuru, aquadest, 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, silet.

Bahan yang digunakan adalah minyak ikan lemuru, CFA, ketamine, normal saline.

### 3.7.4 Dekapitasi Dan Pengambilan Sampel

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

### 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*), masker.

Bahan yang digunakan adalah buffer formalin 10%, H&E, etanol 100%, etanol 95%, etanol 70% dan larutan *xylol*.

### 3.8 Prosedur Penelitian

#### 3.8.1 *Ethical Clearance*

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

#### 3.8.2 Persiapan Sampel Penelitian

- a. Memilih tikus *Sprague Dawley* jantan sebanyak 24 ekor.
- b. Melakukan penimbangan berat badan tikus dengan neraca Ohaus (berat badan tikus 200-300 gram).
- c. Menyiapkan kandang tikus dengan ukuran 30 cm x 30 cm dan mengadaptasikan tikus tersebut didalam kandang dengan jumlah 4 ekor dalam satu kandang selama 7 hari dan diletakkan di ruang perawatan hewan.

#### 3.8.3 Pembuatan Minyak Ikan Lemuru

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

Ikan lemuru : NaCl : Aquadest

3 kg : 100 mg : 5L

- d. Minyak ikan yang ada di permukaan diambil dengan pipet lalu dipindahkan ke dalam tabung reaksi

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

#### 3.8.4 Perlakuan pada Hewan Coba Selama Penelitian

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

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

- a. Kelompok K-1 : 4 ekor tikus pada hari ke-7 adaptasi diinduksi dengan CFA lalu ditunggu selama 42 hari. 7 hari kemudian didekapitasi.
- b. Kelompok K-2 : 4 ekor tikus pada hari ke-7 adaptasi diinduksi dengan CFA lalu ditunggu selama 42 hari. 14 hari kemudian didekapitasi.
- c. Kelompok K-3 : 4 ekor tikus pada hari ke-7 adaptasi diinduksi dengan CFA lalu ditunggu selama 42 hari. 21 hari kemudian didekapitasi.
- d. Kelompok P1 : 4 ekor tikus pada hari ke-7 adaptasi diinduksi dengan CFA lalu ditunggu selama 42 hari. Selanjutnya diberi minyak ikan lemuru 1 ml/150-200 gram 1 kali sehari per-oral selama 7 hari, kemudian didekapitasi.
- e. Kelompok P2 : 4 ekor tikus pada hari ke-7 adaptasi diinduksi dengan CFA lalu ditunggu selama 42 hari. Selanjutnya diberi minyak ikan lemuru 1 ml/150-200 gram 1 kali sehari per-oral selama 14 hari, kemudian didekapitasi.

- f. Kelompok P3 : 4 ekor tikus pada hari ke-7 adaptasi diinduksi dengan CFA lalu ditunggu selama 42 hari. Selanjutnya diberi minyak ikan lemu 1 ml/150-200 gram 1 kali sehari per-oral selama 21 hari, kemudian didekapitasi.

### 3.8.5 Pembuatan Preparat Histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Berikut prosedur pembuatannya.

- a. Proses Pemotongan Jaringan Berupa Makroskopis
- 1) Gross hasil bedah dimasukkan ke larutan buffer formalin 10% (fiksasi) semalam
  - 2) Jaringan didekalsifikasi (pengembukan tulang sendi) 15 s/d 20 hari menggunakan EDTA
  - 3) Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan yang akan diteliti
  - 4) Jaringan dipotong kurang lebih ketebalan 2-3 milimeter
  - 5) Potongan jaringan dimasukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti
  - 6) Dicuci dengan air mengalir sebelum dilakukan proses jaringan dengan alat *Automatic Tissue Tek Processor*
  - 7) Diproses menggunakan mesin *Automatic Tissue Tek Processor*
  - 8) Alarm bunyi tanda selesai
- b. Proses Pengeblokan dan Pemotongan Jaringan
- 1) Jaringan diangkat dari mesin *Automatic Tissue Tek Processor*
  - 2) Jaringan diblok dengan paraffin sesuai kode jaringan
  - 3) Jaringan dipotong dengan alat mikrotom ketebalan 3-5 mikron
- c. Proses Deparafinisasi
- Setelah disayat atau dipotong dengan ketebalan 3-5 mikron, diletakkan dalam oven selama 30 menit dengan suhu panas 70-80° C, kemudian dimasukkan ke dalam 2 tabung larutan xylol masing-masing 20 menit,

setelah itu dimasukkan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (hidrasi), dan yang terakhir dimasukan air mengalir selama 15 menit.

### 3.8.6 Pewarnaan HE (*Hematoxilin Eosin*)

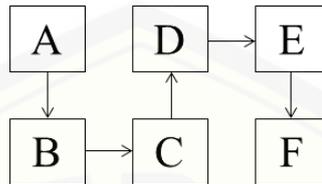
Pewarnaan *Hematoxilin Eosin* (HE) dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pewarnaan HE untuk melihat ekspresi fibroblas. Berikut langkah-langkah pewarnaan HE (Tim PA FKG Unej, 2007) :

- a. Sediaan dilakukan deparafinisasi preparat (blok parafin) dengan larutan *xylol* sebanyak dua kali masing-masing tiga menit.
- b. Kemudian rehidrasi untuk memasukkan air kedalam jaringan (dimasukkan ke dalam alkohol secara bertingkat dari tinggi ke rendah) dengan menggunakan alkohol 100% dan alkohol 95% masing-masing sebanyak dua kali selama tiga menit.
- c. Dibilas dengan air mengalir selama 10-15 menit.
- d. Pewarnaan hematoxylin untuk memberi warna pada inti dan sitoplasma pada jaringan selama 15 menit lalu dibilas dengan air selama 20 menit.
- e. Pewarnaan eosin untuk memberi warna merah pada sitoplasma sel selama tiga menit. Lalu dengan alkohol 95% dan alkohol 100% masing-masing sebanyak dua kali selama tiga menit.
- f. *Clearing* dengan *xylol* sebanyak tiga kali masing-masing tiga menit.
- g. *Mounting* dengan entellan selama lima menit.
- h. Tutup preparat dengan *coverslip* dengan hati-hati agar tidak terdapat gelembung.
- i. Amati ekspresi sel fibroblas pada jaringan ikat.
- j. Dokumentasi setiap pengamatan.

### 3.8.7 Pengamatan Histopatologi

Pengamatan dilakukan untuk mengamati jumlah fibroblas per lapang pandang pada sediaan histopatologi yang telah dibuat. Sel fibroblas diamati dengan pembesaran 400x. Pengamatan dilakukan oleh peneliti dan didampingi

oleh ahli yang kompeten dengan metode blinding pada enam lapang pandang. Lapang pandang dipilih dengan metode *zig-zag* sesuai dengan Gambar 3.2. Hasil pengamatan dianalisis secara manual untuk menghitung jumlah sel fibroblas per lapang pandang. Hasil dari perhitungan ini kemudian akan dirata-rata.



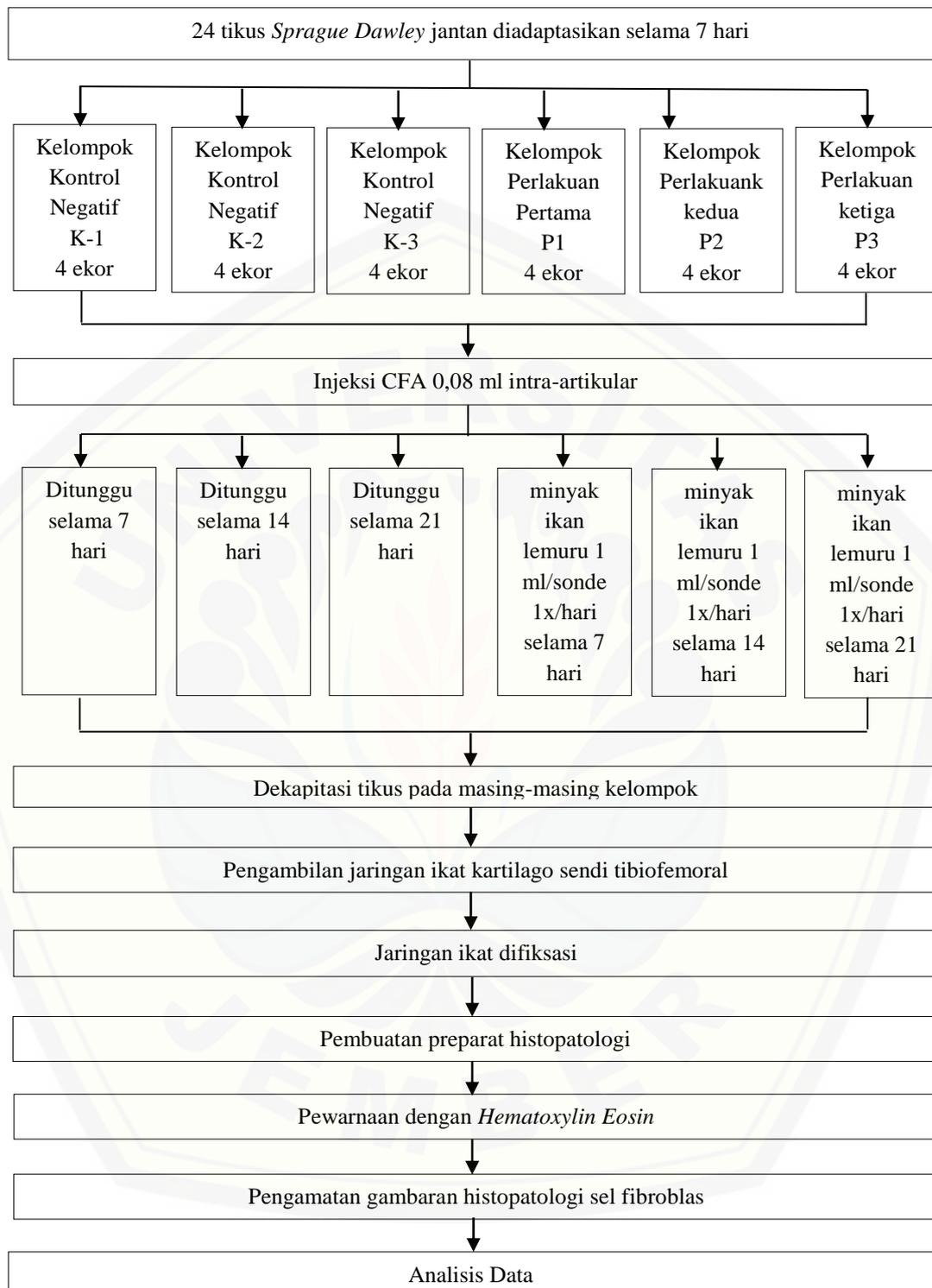
Gambar 3.2 Lapang pandang yang digunakan untuk menghitung

### 3.9 Analisis Data

Dari hasil pengamatan yang diperoleh, data dianalisis terlebih dahulu dengan uji normalitas untuk menentukan apakah distribusi kelompok sampelnya normal lalu diuji homogenitas untuk menguji variasi populasinya. Data yang berdistribusi normal dan homogen lalu diuji dengan uji hipotesis *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *LSD (Least Significant Difference)* untuk menentukan perbedaan yang bermakna dalam tiap kelompok.

### 3.10 Alur Penelitian

Dalam Gambar 3.3 berikut akan dipaparkan alur penelitian secara skematik.



Gambar 3.3 Skema alur penelitian

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan jumlah sel fibroblas jaringan ikat tikus model reumatoid arthritis akibat perbedaan lama pemberian minyak ikan lemuru yaitu semakin lama diberi minyak ikan lemuru, jumlah sel fibroblas semakin rendah.

### 5.2 Saran

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

- a. Diperlukan penelitian lebih lanjut menggunakan pewarnaan spesifik sel fibroblas.
- b. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang dosis toksik minyak ikan lemuru.
- c. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang jangka waktu maksimal penggunaan minyak ikan lemuru.
- d. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang perbedaan efek minyak ikan yang diberikan secara intraartikular dan oral.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Alamanos, Y. dan A. Drosos. 2005. Epidemiology of Adult Rheumatoid Arthritis. *Autoimmunity Reviews* 4(3) : 130-6.
- Aletaha, Neogi, Silman, Funovits, Felson, Bingham, Birnbaum, Burmester, Bykerk, Cohen, Combem Costenbader, Dougados, Emery, Ferraccioli, Hazes, Hobbs, Huizinga, Kavanaugh, Kay, Kvien, Laing, Pincus, Smolen, Stanislawska-Biernat, Symmons, Tak, Upchurch, Vencovsky, Wolfe, dan Hawker. 2010. Rheumatoid Arthritis Classification Criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative." *Arthritis & Rheumatism* 62.9 (2010): 2569-2581.
- Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, dan Walter. 2007. Molecular Biology of the Cell. 5th edition. New York: *Garland Science*.
- Anom, M. 2011. Pemberian Astaxanthin Gel Melindungi Kulit Terhadap Proses Penuaan Dini Akibat Paparan Sinar UVB dengan Menurunkan Ekspresi MMP-1 pada Kultur Fibroblast. Tidak diterbitkan. *Tesis*. Denpasar: Program Studi Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Udayana.
- Arthritis Foundation. 2008. Research update. [http://www.arthritis.org/media/research/ResearchUpdate\\_NOVDEC.pdf](http://www.arthritis.org/media/research/ResearchUpdate_NOVDEC.pdf) [7 Agustus 2016].
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2013. *Riset Kesehatan Dasar 2013*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Billiau, A. dan P. Matthys. 2001. Modes of action of Freund's adjuvants in Experimental Models of Autoimmune Diseases. *J Leukoc Biol* 70(6): 849-860.
- BPOM RI. 2005. *Peraturan Kepala Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor HK 00.05.41.1384 tentang Kriteria dan Tata Laksana Pendaftaran Obat Tradisional, Obat Herbal Terstandar dan Fitofarmaka*. Jakarta: Kepala BPOM.
- Burgess, Stevens, Zhang, dan Peck. 2000. Long-chain polyunsaturated fatty acids in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71(S1):327S-30S.
- Burhanuddin, M. H., S. Martosewojo, dan R. Moeljanto. 1984. Sumber daya ikan lemuru. Jakarta: *National Institute of Oceanology*. 70.
- Cahyanto, Santoso, Zuprizal, Irianto dan Sastrodihardjo. 1997. Ekstraksi Minyak Mengandung Asam Lemak Omega-3 Dari Limbah Industri Minyak Ikan Lemuru dan Penggunaannya Dalam Peningkatan Kandungan Asam Lemak

Omega-3. *Laporan Hasil Penelitian. Kerjasama Lembaga Penelitian UGM dengan Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.*

Calder, P.C. 2006. n-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Inflammation, and Inflammatory Disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 83: 1505S-1519S.

Cooke R. dan B. Stewart. 2004. *Colour Atlas of Anatomical Pathology*. 3rd ed. Italy: Churchill Livingstone.

Deslinda, G. 2011. Pelatihan Humor untuk Penanganan Depresi Penderita Nyeri Sendi. Tidak diterbitkan. *Tesis*. Surakarta: Fakultas Psikologi Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Fadli, W.K. 2011. Manajemen Proses Pada Pengalengan Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) di PT. Pasific Harvest Banyuwangi Jawa Timur. Tidak diterbitkan. *Proposal Praktek Kerja Lapang* .Jurusan Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan. Sidoarjo: Departemen Kelautan dan Perikanan Badan Pengembangan SDM Kelautan dan Perikanan Akademi Perikanan Sidoarjo.

Fajriani. 2008. Pemberian Obat-Obatan Anti Inflamasi Non Steroid (AINS) pada Anak. *Indonesian Journal of Dentistry 2008; 15 (3): 200-204.*

Federer, W.T. 1991. *Statistics And Society: Data Collection and Interpretation* 2<sup>nd</sup>ed. New York. *Marcel Dekker*.

Grimble, R. dan P. Tappia. 1998. Modulation of pro-inflammatory cytokine biology by unsaturated fatty acids. USA. *PubMed.gov US National Library of Medicine National Institutes of Health 1998;37 Suppl 1:57-65.*

Hanafiah, K. 2010. *Rancangan Percobaan : Teori dan Aplikasi. Edisi Revisi*. Jakarta. Raja Grafindo Persada.

Kaladhar, D. 2010. *Studies on Antimicrobial, Biochemical and Image Analysis in Mirabilis jalapa*. Germany: Anchor Academy Publishing.

Indahyani, D.E., Barid, I., dan Handayani, A.W. 2008. Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) Meregulasi Survival Osteoblas dan Osteoklas, Ekspresi Integrin Av $\beta$ 3 Tulang Alveolaris serta Struktur Gigi pada Tikus yang Mengalami Infeksi Periodontal Selama Masa Odontogenesis. Dipublikasikan. *Laporan Hasil Penelitian*. Jember: Universitas Jember.

Indahyani, D., I. Barid, dan A. Richna. 2011. Minyak Ikan Lemuru Menghambat Kerusakan Kolagen pada Tulang Alveolaris. Dipublikasikan. *Laporan Hasil Penelitian* Jember: Universitas Jember.

- Irianto, H. dan I. Soesilo, 2007. Dukungan Teknologi Penyediaan Produk Perikanan. Badan Riset Kelautan dan Perikanan. [on line] <http://www.doestoc.com/does/19432492/Dukungan-Tek.perikanan>. [8 Juni 2016].
- Kee, J. dan E. Hayes. 1996. *Farmakologi Pendekatan Proses Keperawatan. Dr. Peter Anugrah (Alih Bahasa)*. Jakarta. EGC.
- Kim, H., C. Shin, C. Park, K. Kim, K. Cho, H. Eun, dan Chung, J. 2005. Eicosapentaenoic Acid Inhibits UV-Induced MMP-1 Expression in Human Dermal Fibroblasts. Korea: *Journal of Lipid Research Volume 46*.
- Kim, H., S. Cho, S. Lee, K. Kim, K. Cho, H. Eun, dan Chung, J. 2006. Photoprotective and anti-skin-aging effects of eicosapentaenoic acid in human skin in vitro. Korea: *Journal of Lipid Research Volume 47*.
- Kurniawati, Y., S. Adi, Achadiyani, O. Suwarsa, D. Erlangga, dan T. Putri. 2015. Kultur Primer Fibroblas : Penelitian Pendahuluan. *MKA FK UNAND Volume 38 Nomor 1*.
- Lawrence, R., D. Felson, C. Helmick, L. Arnold, H. Choi, R. Deyo, dan J. Jordan. 2008. Estimates of the Prevalence of Arthritis and Other Rheumatic Conditions in the United States: Part II. *Arthritis & Rheumatism*, 58(1), 26-35.
- Lelo, A., Z. Rangkuty, dan Y. Pane. 2004. Manfaat AINS Terhadap Nyeri Gangguan Muskuloskeletal Pada Usia Lanjut. Fakultas Kedokteran Bagian Farmakologi dan Terapeutik Universitas Sumatera Utara. *e-USU Repository*.
- Li. R., B. Wang, C. He, Y. Yang, Y. Chen, dan T. Du. 2015. *Upregulation Of Fibroblast Growth Factor 1 In The Synovial Membranes of Patients with Late Stage Osteoarthritis*. China. FUNPEC.
- Longmore, M., I. Wilkinson, A. Baldwin, dan E. Wallin. 2014. *Oxford Handbook of Clinical Medicine 9<sup>th</sup> edition*. New York. Oxford University Press Inc.
- Meachim G. dan G. Brooke. 1984. *The pathology of osteoarthritis in Osteoarthritis: Diagnosis and Management. Edited by Moskowitz RW, Howell D S, Goldberg VM, Mankin HJ*. Philadelphia:WB Saunders, 1984:29-42.
- Mescher, A. 2009. *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas 12<sup>th</sup> Edition*. New York. McGraw-Hill Education/Medical.

- Montgomery, R., T. Dryer, Conway, dan A. Spector. 1993. *Biokimia: Suatu Pendekatan Berorientasi Kasus. Jilid 2. Edisi Keempat*. Yogyakarta: Terjemahan Gadjah Mada University Press.
- Mulyaningsih, S. dan E. Darmawan. 2006. Efek Anti Arthritis Pisang Ambon (*Musa paradisiaca sapientum L.*) dan Lidah Buaya (*Aloe vera L.*) terhadap Adjuvant-Induced Arthritic Pada Tikus. *Biodiversitas*, 7(3), 273-277.
- Office of Animal Care and Use. 2011. *Guidelines for the Research Use of Adjuvant*. 18 Januari 2012. [Oacu.od.nih.gov/ARAC/freunds.pdf](http://Oacu.od.nih.gov/ARAC/freunds.pdf).
- Pradana, S. 2012. Sensitifitas dan Spesifisitas Kriteria Acr 1987 dan Acr/Eular 2010 Pada Penderita Arthritis Reumatoid di Rsup Dr. Kariadi Semarang. Tidak diterbitkan. *Disertasi*. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Prasetyo, R. 2010. Potensi dan Laju Eksploitasi Ikan Kerapu di Perairan Teluk Lasongko, Kabupaten Buton, Sulawesi Tenggara. Tidak diterbitkan. *Tesis*. Bogor. Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Price, A.S. dan M. L. Wilson. (2006). *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Ramadhan, M. dan T. Arifin. 2013. Aplikasi Sistem Informasi Geografis dalam Penilaian Proporsi Luas Laut Indonesia. Jakarta. *Pusat Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Laut dan Pesisir & Badan Penelitian dan Pengembangan Kelautan dan Perikanan*.
- Rindfleisch, J. dan D. Muller. 2005. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis. *American Family Physician* 72(6): 1037-1047.
- Robin dan D. Merry. 2006. The Effect of Curcuninoid to The Collagen Fibers Density of Osteoarthritis of Temporomandibular Joint. *The Indonesian Journal of Dental Research* : 197-201.
- Robbins, S., R. Cotran, dan V. Kumar. 2007. *Buku Ajar Patologi, Edisi ke – 7*. Jakarta: EGC.
- Schuna, A., in Rheumatoid Arthritis, J. Dipiro, R. Talbert, G. Yee, G. Matzke, B. Wells, dan L. Posey. 2005. *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach, Sixth Edition*, 1671-1683. New York : Medical Publishing Division..
- Setiati, S., M. Simadibrata, I. Alwi, B. Setiyohadi, dan A. Sudoyo. 2014. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam, Jilid III Edisi VI*. Jakarta. Interna Publishing.
- Setiyohadi, B., I. Alwi, A. Sudoyo, dan M. Simadibrata. 2009. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam jilid III Edisi V*. Jakarta Pusat: Interna Publishing.

- Simopoulus, A.P. 2002. Omega-3 Fatty Acid in Inflammation Autoimmune Disease. *Journal of the American College of Nutrition*. 21(6): 495-505.
- Siwik, D., D. Chang, dan W. Colucci. 2000. Interleukin 1- $\beta$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Decrease Collagen Synthesis and Increase Matrix Metalloproteinase Activity in Cardiac Fibroblasts In Vitro. Boston: *Circulation Research*, 2000;86:1259-1265.
- Smolen, Landewe, Breedveld, Buch, Burmester, Dougados, Emery, Viala, Gossec, Nam, Ramiro, Winthrop, de Wit, Aletaha, Betteridge, Bijlsma, Boers, Buttgerit, Combe, Cutolo, Damjanov, Hazes, Kouloumas, Kvien, Mariette, Pavelka, Riel, Rubbert-Roth, Scholte-Voshaar, Scott, Sokka-Isler, Wong dan van der Heijde. 2010. "EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs." *Annals of the rheumatic diseases* 69.6 (2010): 964-975.
- Suarjana, I. 2009. *Artritis Reumatoid Dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Edisi V*. Jakarta. Interna Publishing.
- Susilo, E., T. Wibawa, dan A. Wijaya. 2015. Pendugaan Daerah Penangkapan Ikan Lemuru Di Selat Bali Berbasis Rantai Makanan Menggunakan Data Satelit Osenografi. Bali. *Balai Penelitian dan Observasi Laut-KKP*.
- Tim Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. 2007. *Petunjuk praktikum Patologi Anatomi Degenerasi dan Radang*. Tim Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Tjokronegoro, A. dan S. Sudarsono. 1999. *Metodologi Penelitian Bidang Kedokteran*. Cetakan Ketiga. Jakarta: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia.
- Triskayani, W. 2010. Peranan Sitokin pada Proses Destruksi Jaringan Periodonsium. Tidak diterbitkan. *Tesis*. Medan. Universitas Sumatera Utara.
- Wiralis. 2008. Pengaruh Pemberian Jus Jambu Biji (*Psidium Guajava L*) Terhadap Kadar Ion Nitrit dan Gambaran Histopatologik Panus Sendi Adjuvant Induced Arthritis Tikus Wistar. Tidak diterbitkan. *Tesis*. Semarang. Universitas Diponegoro.

LAMPIRAN

LAMPIRAN A. JUMLAH DAN RATA-RATA MASING-MASING  
SAMPel OLEH TIGA PENGHITUNG

A.1

Folder	Jumlah Fibroblas per lapang pandang						Total Fibroblas	Rata-rata
	1	2	3	4	5	6		
K-1 . 1	60	51	57	60	65	77	370	61.67
K-1 . 2	56	46	77	26	38	31	274	45.67
K-1 . 3	151	184	183	217	140	115	990	165.00
K-1 . 4	54	47	61	83	136	118	499	83.17
K-2 . 1	109	124	65	58	32	35	423	70.50
K-2 . 2	38	59	34	40	38	71	280	46.67
K- 2 . 3	42	48	67	58	56	51	322	53.67
K- 2 . 4	20	33	36	38	11	25	163	27.17
K- 3 . 1	216	195	174	240	218	223	1266	211.00
K- 3 . 2	69	79	93	86	106	125	558	93.00
K- 3 . 3	37	85	96	98	104	166	586	97.67
K- 3 . 4	111	124	67	108	143	140	693	115.50
P 1 . 1	56	66	84	87	44	41	378	63.00
P 1 . 2	148	122	46	51	89	127	583	97.17
P 1 . 3	136	93	98	88	68	76	559	93.17
P 1 . 4	47	111	90	87	72	88	495	82.50
P 2 . 1	85	82	34	72	87	135	495	82.50
P 2 . 2	40	49	46	49	43	35	262	43.67
P 2 . 3	33	40	68	78	67	114	400	66.67
P 2 . 4	61	44	46	36	48	53	288	48.00
P 3 . 1	9	23	33	14	11	10	100	16.67
P 3 . 2	17	10	14	9	8	11	69	11.50
P 3 . 3	36	31	41	56	35	47	246	41.00
P 3 . 4	64	37	51	42	49	27	270	45.00

## A.2

Folder	Jumlah Fibroblas per lapang pandang						Total Fibroblas	Rata-rata
	1	2	3	4	5	6		
K-1 . 1	33	25	39	29	20	22	168	28
K-1 . 2	15	12	21	24	22	11	105	17.5
K-1 . 3	35	39	40	31	33	38	216	36
K-1 . 4	27	25	19	24	16	22	133	22.16
K-2 . 1	35	37	30	26	28	18	174	29
K-2 . 2	11	18	17	18	21	29	114	19
K- 2 . 3	17	20	25	28	27	24	141	23.5
K- 2 . 4	19	17	13	9	10	11	79	13.16
K- 3 . 1	25	21	21	30	23	33	153	25.5
K- 3 . 2	11	13	12	9	15	10	70	11.66
K- 3 . 3	14	13	17	21	16	31	112	18.66
K- 3 . 4	20	29	19	21	28	24	141	23.5
P 1 . 1	11	9	8	12	13	10	63	10.5
P 1 . 2	22	24	18	14	9	21	108	18
P 1 . 3	13	11	15	17	18	14	88	14.66
P 1 . 4	17	22	24	31	21	19	134	22.33
P 2 . 1	23	17	14	13	10	9	86	14.33
P 2 . 2	9	6	7	11	10	8	51	8.5
P 2 . 3	7	11	10	12	11	19	70	11.66
P 2 . 4	12	14	16	9	8	12	71	11.83
P 3 . 1	7	11	13	8	14	7	60	10
P 3 . 2	10	13	9	14	11	12	69	11.5
P 3 . 3	12	15	14	16	17	15	89	14.83
P 3 . 4	17	19	21	17	22	23	119	19.83

## A.3

Folder	Jumlah Fibroblas per lapang pandang						Total Fibroblas	Rata-rata
	1	2	3	4	5	6		
K-1 . 1	50	54	57	67	72	81	381	63.5
K-1 . 2	32	52	45	49	69	72	319	53.16
K-1 . 3	98	87	90	76	88	96	535	89.16
K-1 . 4	56	45	34	40	48	38	261	43.5
K-2 . 1	76	67	74	65	54	46	382	63.66
K-2 . 2	40	54	60	43	80	79	356	59.33
K- 2 . 3	71	67	78	89	76	81	462	77
K- 2 . 4	23	34	31	23	18	20	149	24.83
K- 3 . 1	82	78	74	90	82	88	494	82.33
K- 3 . 2	60	66	65	67	59	70	387	64.5
K- 3 . 3	43	41	38	32	33	35	222	37
K- 3 . 4	65	65	67	64	67	70	398	66.33
P 1 . 1	31	32	33	32	35	32	195	32.5
P 1 . 2	33	54	58	34	40	35	254	42.33
P 1 . 3	23	21	24	22	22	27	139	23.16
P 1 . 4	30	33	32	28	36	32	191	31.83
P 2 . 1	24	24	28	24	21	20	141	23.5
P 2 . 2	23	25	17	13	14	21	113	18.83
P 2 . 3	9	8	40	38	14	21	130	21.66
P 2 . 4	31	34	34	32	36	30	197	32.83
P 3 . 1	4	6	4	7	17	13	51	8.5
P 3 . 2	2	4	11	9	10	13	49	8.16
P 3 . 3	4	5	23	22	26	22	102	17
P 3 . 4	10	11	12	8	15	11	67	11.16

**LAMPIRAN B. JUMLAH DAN RATA-RATA SELURUH PENGHITUNG**

Kelompok Perlakuan	Jumlah Fibroblas	Rata-rata Fibroblas
K-1	306.33	51.06
	232.67	38.78
	580.33	96.72
	297.67	49.61
K-2	326.33	54.39
	250.00	41.67
	308.33	51.39
	130.33	21.72
K-3	637.67	106.28
	338.33	56.39
	306.67	51.11
	410.67	68.44
P1	212.00	35.33
	315.00	52.50
	262.00	43.67
	273.33	45.56
P2	240.67	40.11
	142.00	23.67
	200.00	33.33
	185.33	30.89
P3	70.33	11.72
	62.33	10.39
	145.67	24.28
	152.00	25.33

## LAMPIRAN C. TABEL ANALISIS STATISTIK

## C.1 Uji normalitas dan homogenitas

## Tests of Normality

	Group	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Fibroblas	K-1	.372	4	.	.809	4	.120
	K-2	.233	4	.	.888	4	.372
	K-3	.284	4	.	.857	4	.250
	P1	.216	4	.	.981	4	.905
	P2	.185	4	.	.992	4	.965
	P3	.287	4	.	.802	4	.105

## a. Lilliefors Significance Correction

## Test of Homogeneity of Variances

Fibroblas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.004	5	18	.127

## C.2 Uji hipotesis

## ANOVA

Fibroblas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7029.404	5	1405.881	5.088	.004
Within Groups	4973.429	18	276.302		
Total	12002.833	23			

## C.3 Uji Post Hoc

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Fibroblas

LSD

(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-1	K-2	16.75000	11.75376	.171	-7.9437	41.4437
	K-3	-11.51250	11.75376	.340	-36.2062	13.1812
	P1	14.77750	11.75376	.225	-9.9162	39.4712
	P2	27.04250*	11.75376	.034	2.3488	51.7362
K-2	P3	41.11250*	11.75376	.003	16.4188	65.8062
	K-1	-16.75000	11.75376	.171	-41.4437	7.9437
	K-3	-28.26250*	11.75376	.027	-52.9562	-3.5688
	P1	-1.97250	11.75376	.869	-26.6662	22.7212
K-3	P2	10.29250	11.75376	.393	-14.4012	34.9862
	P3	24.36250	11.75376	.053	-.3312	49.0562
	K-1	11.51250	11.75376	.340	-13.1812	36.2062
	K-2	28.26250*	11.75376	.027	3.5688	52.9562
P1	P1	26.29000*	11.75376	.038	1.5963	50.9837
	P2	38.55500*	11.75376	.004	13.8613	63.2487
	P3	52.62500*	11.75376	.000	27.9313	77.3187
	K-1	-14.77750	11.75376	.225	-39.4712	9.9162
P2	K-2	1.97250	11.75376	.869	-22.7212	26.6662
	K-3	-26.29000*	11.75376	.038	-50.9837	-1.5963
	P2	12.26500	11.75376	.311	-12.4287	36.9587
	P3	26.33500*	11.75376	.038	1.6413	51.0287
P3	K-1	-27.04250*	11.75376	.034	-51.7362	-2.3488
	K-2	-10.29250	11.75376	.393	-34.9862	14.4012
	K-3	-38.55500*	11.75376	.004	-63.2487	-13.8613
	P1	-12.26500	11.75376	.311	-36.9587	12.4287
P3	P3	14.07000	11.75376	.247	-10.6237	38.7637
	K-1	-41.11250*	11.75376	.003	-65.8062	-16.4188
	K-2	-24.36250	11.75376	.053	-49.0562	.3312
	K-3	-52.62500*	11.75376	.000	-77.3187	-27.9313
P3	P1	-26.33500*	11.75376	.038	-51.0287	-1.6413
	P2	-14.07000	11.75376	.247	-38.7637	10.6237

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

**LAMPIRAN D. DOKUMENTASI PENELITIAN**



Gambar B.1 Ikan lemuru yang telah dicuci



Gambar B.2 Pembuatan minyak ikan



Gambar B.3 Pembuatan minyak ikan menggunakan metode penguapan



Gambar B.3 Minyak ikan lemuru setelah disentrifuge akan terpisah dari air dan lemak

**LAMPIRAN E. PERIZINAN KOMISI ETIK FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER**



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 : I. 402 /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 :*

**PERBEDAAN JUMLAH SEL FIBROBLAS JARINGAN IKAT YANG DIINDUKSI  
COMPLETE FREUND'S ADJUVANT DENGAN PEMBERIAN MINYAK IKAN  
LEMURU (*Sardinella longiceps*)**

Nama Peneliti Utama : Asyirah Mujahidah Fillah (NIM. 122010101047)  
*Name of the principal investigator*

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember  
*Name of institution*

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

Jember, 29 Des 2016  
11 Januari 2017  
  
dr. Rini Riyanti, Sp.PK

**Tanggapan Anggota komisi Etik**

(Diisi oleh Anggota Komisi etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya)

- Pemilihan, pemeliharaan, perlakuan dan pengorbanan hewan coba mengacu pada Pedoman Etik penelitian Kesehatan
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan minyak ikan lemuru agar didapatkan kadar yang sesuai
- Perlakuan injeksi intraartikular dan penyondean dilakukan oleh orang yang terampil agar tidak melukai hewan coba
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan preparat histopatologi agar didapatkan preparat yang memenuhi syarat pembacaan
- Pengamatan preparat histopatologi dilakukan oleh orang yang kompeten, dengan metode blinding dan dilakukan minimal oleh dua orang pengamat.
- Mohon diperhatikan pembuangan limbah biologis dan limbah B3 agar tidak mencemari lingkungan

Jember, 11 Januari 2017



Dr. Rini Riyanti Sp.PK