

Perbedaan Lama Pemberian Minyak Ikan Lemuru terhadap Jumlah Sel Fibroblas Jaringan Ikat pada Tikus Model Reumatoid Arthritis

The Difference in Lemuru Fish Oil Duration of Administration on Connective Tissue Fibroblast Cell Count in Rheumatoid Arthritis Rat Model

Asyirah Mujahidah Fillah¹, Rena Normasari², Dwita Aryadina Rachmawati³

¹Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember

²Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember

³Laboratorium Ilmu Kesehatan Masyarakat Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Jalan Kalimantan No. 37 Kampus Tegalboto, Jember 68121

e-mail korespondensi: asyirafilla@gmail.com

Abstrak

Reumatoid arthritis merupakan proses inflamasi kronis pada persendian yang menyebabkan destruksi progresif. Sitokin yang disekresikan akibat inflamasi kronis menyebabkan peningkatan jumlah sel fibroblas yang mensintesis matriks metallo-proteinase. Obat antiinflamasi non steroid yang diberikan untuk mengurangi gejala inflamasi memiliki berbagai efek samping sehingga diperlukan antiinflamasi alternatif yang dinilai berefek samping minimal seperti minyak ikan lemuru. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan jumlah sel fibroblas jaringan ikat tikus model reumatoid arthritis akibat lama pemberian minyak ikan lemuru. Jenis penelitian ini adalah true eksperimental dengan desain the randomized post test only control group design. Sampel yang digunakan adalah tikus galur sebanyak 24 ekor dan dibagi menjadi 6 kelompok. Hasil uji one way anova didapatkan $p=0,004$. Hasil analisis data Post Hoc LSD menunjukkan ada perbedaan signifikan pada pemberian minyak ikan lemuru selama 21 hari dengan signifikansi 0,038 dibandingkan dengan pemberian selama 7 hari. Kesimpulan penelitian ini adalah terdapat perbedaan jumlah sel fibroblas jaringan ikat tikus model reumatoid arthritis akibat lama pemberian minyak ikan lemuru selama 21 hari.

Kata kunci: reumatoid arthritis, sel fibroblas, minyak ikan lemuru

Abstract

Rheumatoid arthritis is a joint chronic inflammation process leading to progressive destruction. Cytokines secreted from chronic inflammation increases fibroblast cell number that synthesize matrix metalloproteinase. Non steroidal anti inflammation drugs administrated to lighten inflammation symptoms had several side effects that increase the urge to discover an alternative antiinflammation with lower side effect like lemuru fish oil. This true experimental study with randomized post test only control group design aimed to investigate the difference in lemuru fish oil duration of administration on connective tissue fibroblast cell count in rheumatoid arthritis rat model. The One Way Anova test revealed that there are at least two group means that are statistically significant different from each other with a p value of 0,004. Post Hoc LSD analysis result indicate a significant difference after 21 days duration of administration compared to 7 days administration with significance value of 0,038. It can be concluded that there is a significant difference in lemuru fish oil administration after 21 days duration.

Keywords: rheumatoid arthritis, fibroblast cell, lemuru fish oil

Pendahuluan

Rheumatoid arthritis adalah salah satu jenis arthritis yang merupakan proses inflamasi kronis pada persendian yang ditandai pembengkakan dan nyeri sendi dan mengakibatkan destruksi sendi progresif yang menyebabkan disabilitas parah (Aletaha et al., 2010). Untuk keperluan penelitian, kondisi inflamasi seperti pada rheumatoid arthritis ini diinduksi dengan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) melalui pembentukan influx leukosit dan interaksinya dengan antigen. Pelepasan mediator inflamasi dapat menyebabkan kehilangan proteoglikan dan matriks ekstraselular. Perubahan histopatologi yang dapat diperhatikan adalah degradasi matriks dan peningkatan jumlah sel fibroblas.

Sel fibroblas merupakan sel aktif utama pada jaringan ikat yang berfungsi menjaga integritas struktur jaringan ikat dan mengatur *turnover* jaringan ikat dengan memproduksi enzim yang dapat mendegradasi matriks ekstraseluler seperti MMP (*matrix metalloproteinase*) (Pap et al., 2000). 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). 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. 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).

Ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) adalah salah satu jenis ikan pelagik kecil yang banyak terdapat di Indonesia dan sering dikonsumsi masyarakat namun pemanfaatannya masih kurang optimal. 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). Minyak ikan lemuru yang merupakan hasil ekstraksi limbah industri pengalengan kaya asam lemak tak jenuh ganda *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). Pemanfaatan potensi sumber daya kelautan Indonesia yang lebih banyak terbuang adalah dasar dari penelitian ini.

Metode Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *true experimental* dengan rancangan *randomized post test only control group design*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Laboratorium Kimia Dasar FMIPA Universitas Jember dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Desember 2015 hingga November 2017. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari komisi etik dari FK Unej.

Sampel penelitian yang digunakan adalah tikus jenis *Sprague Dawley* jantan usia 3-5 bulan dengan berat badan 200-300 gram. Sampel dibagi ke dalam 6 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif dengan perbedaan waktu dekapitasi setelah diinjeksi CFA yaitu K-1 (hari ke-7), K-2 (hari ke-14), K-3 (hari ke-21) dan kelompok perlakuan dengan perbedaan lama pemberian minyak ikan lemuru yaitu P1 (7 hari), P2 (14 hari) dan P3 (21 hari). Metode penentuan besar sampel menggunakan rumus empiris Federer didapatkan 4 ekor tikus untuk masing-masing kelompok sehingga total sampel yang dibutuhkan sebesar 24 ekor tikus. Seluruh sampel diinjeksi CFA 0,08 ml intraartikular dan ditunggu selama 42 hari untuk membuat model inflamasi rheumatoid arthritis. Lalu kelompok perlakuan diberi minyak ikan lemuru per oral 1 ml/150-200 gramBB. Sediaan histopatologi yang diamati diperoleh dari jaringan ikat sendi tibiofemoral kanan. Data diperoleh dengan cara mengamati jumlah sel fibroblas 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.

Data kelompok perlakuan dianalisis menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui normalitas data. Uji *Shapiro-Wilk* dipilih sebagai uji normalitas karena jumlah sampel pada penelitian ini kurang dari 50. Data juga diuji homogenitas *Levene* untuk menguji kesamaan varians dari beberapa populasi. Kemudian dilakukan uji parametrik *One Way Anova* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan rata-rata antar minimal dua kelompok sampel.

Hasil Penelitian

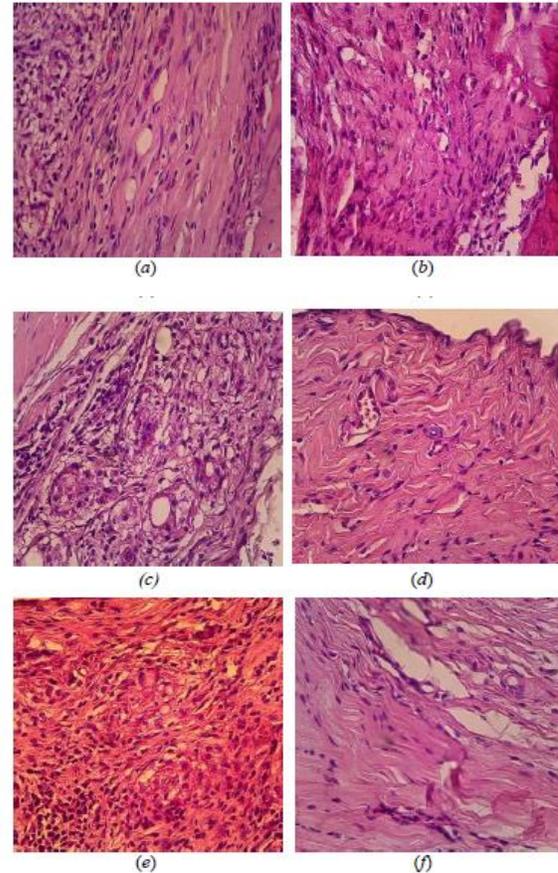
Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2015 hingga November 2016. Hasil penghitungan jumlah sel fibroblas masing-masing kelompok sampel dari ketiga pengamat dirata-rata dan didapatkan skor yang akan ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Skor rata-rata jumlah sel fibroblas masing-masing kelompok sampel

	Rata-rata Jumlah Fibroblas		Rata-rata Jumlah Fibroblas
K-1	354.25	P1	214.00
K-2	253.75	P2	192.00
K-3	423.33	P3	107.58

Hasil penelitian di atas menunjukkan sel fibroblas paling rendah terdapat pada kelompok P3 yaitu kelompok yang diberi pemberian minyak ikan lemuru selama 21 hari sedangkan jumlah sel fibroblas paling tinggi terdapat pada kelompok K-3 yaitu kelompok kontrol negatif yang tidak diberi minyak ikan lemuru dan didekapitasi pada hari ke-21 hari setelah injeksi CFA. Sedangkan pada kelompok P1 dan P2 terjadi penurunan jumlah sel fibroblas seiring dengan bertambah lamanya pemberian minyak ikan lemuru. Gambaran histopatologi dari penelitian dapat dilihat pada Gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan bahwa jumlah fibroblas pada kelompok kontrol negatif (a), (c), (e) mengalami peningkatan seiring dengan bertambahnya hari dengan jumlah fibroblas paling tinggi pada kelompok K-3 (e). Sedangkan jumlah fibroblas paling rendah pada kelompok perlakuan (b), (d), (f) dengan jumlah fibroblas paling rendah pada kelompok P3 (f).



Gambar 1. Gambaran histopatologi dengan pembesaran 400x pada contoh tiap kelompok sampel

Data jumlah fibroblas yang telah terkumpul kemudian dianalisis menggunakan uji *Shapiro Wilk*. Berdasarkan uji normalitas didapatkan data berdistribusi normal karena $p > 0,05$. Dilanjutkan dengan uji homogenitas *Levene* didapatkan nilai $p = 0,127$ menunjukkan data berasal dari populasi yang homogen. Selanjutnya dilakukan uji statistik parametrik *One Way Anova* didapatkan signifikansi $0,127$ yang artinya terdapat minimal sepasang kelompok yang memiliki perbedaan jumlah sel fibroblas yang signifikan. Selanjutnya dilakukan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui pada kelompok mana yang terdapat perbedaan bermakna. Hasil uji lanjutan ini menunjukkan bahwa perbedaan bermakna terdapat pada kelompok K-3 dan P3, P1 dan P3 serta K- 2 dan K-3.

Pembahasan

Dari hasil penelitian, peningkatan jumlah sel fibroblas antar kelompok kontrol negatif tidak

signifikan meskipun jumlahnya cenderung meningkat hari ke-21. Hal itu diduga karena pada penelitian ini seluruh model tikus telah mengalami inflamasi kronis seperti pada RA. Pada inflamasi kronis, makrofag akan teraktivasi sehingga akan menghasilkan produk-produk termasuk metabolit AA (asam arakidonat) dan sitokin (IL-1b, TNF α , PGE2) yang memicu produksi MMP oleh fibroblas (Cleland et al., 2006). Tidak seperti inflamasi akut dimana ada keseimbangan MMP dan TIMPs sehingga produksi jaringan baru dapat dikontrol, pada kondisi kronis penyembuhan terhenti, kadar sitokin inflamasi dan MMPs meningkat (Orsted, 2011 ; Diegelmann, 2004).

Nilai signifikansi kelompok P1 terhadap K-1 sebesar 0,225 dan kelompok P2 terhadap K-2 sebesar 0,393 yang berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan sedangkan nilai signifikansi kelompok P3 terhadap K-3 sebesar 0,000 yang menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan. Pada kelompok perlakuan, jumlah fibroblas cenderung menurun dengan bertambahnya hari perlakuan. Jumlah fibroblas pada kelompok perlakuan 7 hari dan 14 hari menurun meskipun hasilnya tidak signifikan. Hal tersebut diduga, pada hari ke-7 belum banyak terjadi penurunan AA pada jaringan membran fosfolipid sehingga belum terjadi penurunan PGE2 dan sitokin yang berujung pada belum tampaknya pengurangan jumlah fibroblas yang signifikan. Hal ini selaras dengan hasil penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa pada 1 hari setelah pemberian minyak ikan, penggantian struktur AA dengan EPA dalam jaringan belum banyak terjadi walaupun dosisnya ditingkatkan. Pada hari ke-14 diduga kandungan omega-3 PUFA dalam minyak ikan yang diberikan sudah mulai mengganti AA jaringan dengan EPA dan DHA walaupun belum sempurna, mengakibatkan jumlah sel fibroblas menurun meskipun tidak signifikan.

Perbandingan antar kelompok perlakuan menunjukkan bahwa berdasarkan lama pemberian, minyak ikan lemuru memberikan hasil yang signifikan jika diberikan rutin dan dalam waktu yang lebih lama dibuktikan dengan semakin menurunnya jumlah fibroblas seiring lamanya pemberian. Penelitian terdahulu membuktikan bahwa konsumsi minyak ikan lemuru selama 10 minggu secara terus menerus menyebabkan penurunan produk sitokin (Indahyani et al., 2011).

Perbandingan nilai signifikansi antara kelompok K-3 dengan P3 yang signifikan (0,000) menunjukkan bahwa semakin lama pemberian minyak ikan lemuru

maka semakin meningkat kadar EPA dan DHA dalam jaringan ikat sehingga daya hambat progresivitas inflamasi semakin tinggi dengan cara menghambat sintesis mediator inflamasi yang dapat memicu sintesis MMP oleh sel fibroblas. Pada keadaan ini, EPA dan DHA dari minyak ikan lemuru telah mengganti struktur AA dalam jaringan. Eikosanoid yang berasal dari EPA maupun DHA merupakan antagonis eikosanoid yang terbentuk dari AA jaringan (Indahyani et al., 2011).

Pemberian minyak ikan lemuru selama 21 hari ternyata mampu menyebabkan penurunan jumlah sel fibroblas pada jaringan ikat sendi tikus yang mengalami RA. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian minyak ikan lemuru dengan jangka waktu lama mampu mempengaruhi struktur AA jaringan dengan EPA dan DHA yang bersifat anti inflamasi sehingga berpengaruh pada jumlah fibroblas yang memproduksi MMP.

Kesimpulan

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

Perlu dilakukan penelitian selanjutnya mengenai dosis toksik dan jangka waktu maksimal penggunaan minyak ikan lemuru. Selain itu penelitian selanjutnya bisa menggunakan pewarna spesifik sel fibroblas sehingga bisa diketahui perbedaan sel fibroblas dengan sel lain yang terdapat pada jaringan ikat.

Ucapan Terima Kasih

Pada kesempatan ini peneliti mengucapkan terima kasih kepada dr. Rena Normasari, M.Biomed. serta dr.Dwita Aryadina Rachmawati, M.Kes. atas bimbingan yang diberikan hingga tersusunnya artikel penelitian ini. Peneliti juga mengucapkan terimakasih kepada Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Laboratorium Kimia Dasar FMIPA Universitas Jember dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang telah memberikan izin dan bantuannya dalam pelaksanaan penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Aletaha, Neogi, Silman, Funovits, Felson, Bingham, Birnbaum, Burmester, Bykerk, Cohen, Comben Costenbader, Dougados, Emery, Ferraccioli, Hazes, Hobbs, Huizinga, Kavanaugh, Kay, Kvien, Laing, Pincus, Smolen, Stanislawski-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* 62.9:2569-2581
- Cleland, L., Caughey, G., James, M., dan Proudman, S. 2006. Reduction of Cardiovascular risk factors with longterm fish oil treatment in early rheumatoid arthritis. *J. Rheumat.* 15: 1471-5
- Diegelmann, R. 2004. Wound Healing: an Overview of Acute, Fibrotic and Delayed Healing. *PubMed.gov US National Library of Medicine National Institutes of Health.* 1;9:283-9.
- Indahyani, D.E., Barid, I., dan Handayani, A.W. 2008. Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) Meregulasi Survival Osteoblas dan Osteoklas, Ekspresi Integrin $\text{Av}\beta 3$ Tulang Alveolaris serta Struktur Gigi pada Tikus yang Mengalami Infeksi Periodontal Selama Masa Odontogenesis. Dipublikasikan. *Laporan Hasil Penelitian.* Jember: Universitas Jember.
- 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].
- 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.*
- Orsted, H. 2011. Basic Principles of Wound Healing. *Wound Care Canada Volume 2 Nomor 9.*
- Pap, Ladner, Gay, R., dan Gay, S. 2000. Fibroblast biology: Role of Synovial Fibroblasts in the pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Research.* 2(5): 361-367