

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Penelitian “Efek Antiinflamasi *Minyak Ikan* pada Tikus Putih Induksi Karagenin” telah dilaksanakan pada tanggal 15-22 Februari 2009 di Laboratorium Penelitian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini untuk mengetahui efek antiinflamasi minyak ikan terhadap volume udem kaki belakang tikus yang diinduksi karagenin dengan pengamatan pengurangan dan penghambatan volume udem.

#### **A. Karakteristik minyak ikan**

Penelitian ini menggunakan kapsul minyak ikan yang beredar di masyarakat dengan pertimbangan bahwa kapsul minyak ikan tersebut mengandung omega 3 berupa EPA dan DHA yang berperan penting dalam proses inflamasi.

Sesuai dengan standar WHO (2000), kapsul minyak ikan yang beredar di berbagai negara, merupakan kapsul yang berisi 0,3 ml minyak ikan yang mengandung EPA sekitar 180 mg dan DHA sekitar 120 mg. Kandungan omega 3 dalam kapsul minyak ikan ini sama dengan kandungan omega 3 yang dikonsumsi langsung dari ikan segar.

Pada penelitian ini, minyak ikan yang digunakan dibagi menjadi 3 tingkatan dosis yaitu 75,6 mg; 126 mg; dan 201,6 mg. Dosis yang disarankan oleh WHO untuk minyak ikan yang dapat dikonsumsi oleh manusia adalah 0,3 s.d. 0,5 g EPA dan DHA per hari, kemudian dosis tersebut dikonversikan menjadi dosis untuk tikus sehingga didapatkan dosis tersebut diatas.

Minyak ikan yang telah dibagi dalam 3 tingkatan tersebut, kemudian diberikan pada tikus kelompok I sebesar 75,6 mg; kelompok II sebesar 126 mg; dan kelompok III sebesar 201,6 mg secara oral dengan menggunakan sonde oral.

#### **B. Karakteristik volume udem tapak kaki belakang tikus dan pengukurannya**

Bahan yang digunakan untuk membuat udem pada kaki belakang tikus adalah karagenin. Karagenin dibagi menjadi 3 kelompok utama yaitu karagenin kappa, lambda dan iota. Karagenin yang biasa digunakan dalam pembuatan udem pada uji antiinflamasi adalah karagenin lambda karena relatif larut terhadap air dingin.

Pada penelitian ini digunakan campuran 100 mg lambda karagenin dan 10 ml larutan NaCl 0,9 % sehingga didapatkan larutan karagenin dengan konsentrasi sebesar 1 %.

Udem yang ditimbulkan setelah penyuntikan karagenin merupakan reaksi inflamasi. Reaksi inflamasi ini memicu pengeluaran agen-agen inflamasi (histamin, serotonin, bradikinin, prostaglandin, dsb). Inflamasi yang muncul pada penelitian ini merupakan inflamasi akut karena tanda inflamasi terjadi atau muncul setelah diinduksi karagenin.

#### **C. Uji antiinflamasi minyak ikan**

##### **1. Pengamatan Pengurangan Udem**

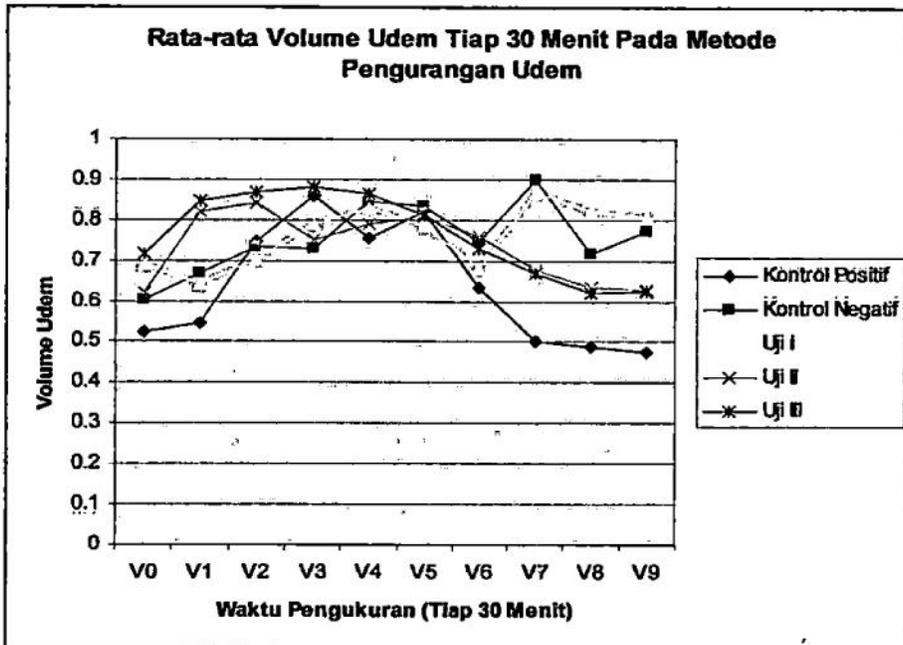
Penelitian dimulai dengan menyuntikan karagenin 1 % sebanyak 0,1 ml pada kaki kiri tikus bagian belakang, setelah  $\pm$  15 jam penyuntikan karagenin,

volume kaki kiri tikus putih diukur dengan plestimograph, hasil pengukuran ini dianggap sebagai volume udem awal ( $V_0$ ).

Peneliti mengharapkan volume udem awal ( $V_0$ ) kaki belakang kiri tikus sama atau tidak terlalu berbeda pada semua tikus. Hal ini diatasi dengan cara memilih tikus dari satu indukan, usia yang sama (2 bulan), jenis kelamin yang sama (jantan), berat badan antara 150 – 200 gram dan perawatan yang sama yaitu diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium selama beberapa hari dengan diet yang sama. Ternyata hasil pengukuran volume awal ( $V_0$ ) cukup bervariasi yaitu pada kelompok pengamatan penurunan udem sebesar 0,11 sampai 0,63 dan pada pengamatan penghambatan udem sebesar 0,1 sampai 0,65.

Tiga puluh menit sebelum pengukuran awal, masing-masing tikus diberikan perlakuan sesuai dengan kelompoknya yaitu kontrol positif diberikan ibuprofen 15 mg, kontrol negatif diberikan aquades dan kelompok uji I, II, dan III diberikan minyak ikan. Setelah itu, kaki kiri tikus diukur dengan plestimograph setiap 30 menit selama 4 jam. Hasil rata-rata pengurangan volume udem dapat dilihat pada gambar grafik 5.

Pada gambar grafik 5, memberikan informasi bahwa kelompok kontrol positif (ibuprofen) menunjukkan peningkatan udem pada 30 menit ke-1 ( $V_1$ ) sampai menit ke-5 ( $V_5$ ), kemudian secara perlahan menunjukkan penurunan udem setelah 30 menit ke-5 ( $V_5$ ) dan pada 30 menit ke-7 ( $V_7$ ) ibuprofen dapat menunjukkan penurunan udem dibawah volume awal ( $V_0$ ).



**Gambar 5.** Grafik rata-rata volume udem tiap 30 menit pada pengamatan pengurangan udem

Ibuprofen merupakan derivat asam propionat merupakan obat dari golongan NSAID's yang digunakan sebagai pengobatan simptomatik terhadap reumatoid arthritis, osteoarthritis, ankilosis spondilosis, dan arthritis gout akut. Obat golongan ini juga sering digunakan sebagai analgesik, tendinitis akut, bursitis dan dismenore primer. Aktivitas farmakodinamik dari derivat ini tidak berbeda dengan obat NSAID's lainnya. Beberapa penelitian menyebutkan ada perbedaan dalam kemampuan menghambat COX, namun hal ini tidak begitu berarti secara klinis (Burke et al, 2006).

Daya resorpsi ibuprofen di usus cepat dan baik (sekitar 80%), namun daya resorpsi rektal lebih lambat. Memiliki daya endap 90%-99% dan waktu paruh plasma 2-4 jam (Tjay & Rahardja, 2002, Burke et al, 2006). Peningkatan pada 30 menit awal kemungkinan terjadi proses absorpsi ibuprofen oleh lambung tikus

menuju ke aliran darah (terikat oleh plasma) sehingga belum terjadi mekanisme ibuprofen di daerah inflamasi sedangkan proses inflamasi pada area tersebut terus berjalan sehingga pada 30 menit awal belum terlihat adanya mekanisme penurunan inflamasi oleh ibuprofen.

Kontrol negatif (dengan pemberian aquades) menunjukkan peningkatan volume udem dari 30 menit pertama (V1) sampai dengan 30 menit terakhir (V9). Hal ini disebabkan aquades tidak mempunyai kandungan yang dapat mempengaruhi proses inflamasi. Hasil pengukuran volume udem pada kelompok kontrol negatif ini, terlihat fluktuatif sebagai akibat perbedaan reaksi biologis tikus.

Pada kelompok uji I (minyak ikan 75,6 mg), mengalami kenaikan setiap 30 menit. Kelompok uji I ini mempunyai pola volume udem yang hampir sama dengan aquades. Pada dosis ini, minyak ikan tidak mempunyai kemampuan dalam menurunkan inflamasi pada 4 jam pertama.

Kelompok uji II (minyak ikan 126 mg), volume udem meningkat pada 30 menit pertama (V1) hingga 30 menit ke-5 (V5) dan kemudian mengalami pengurangan udem mulai 30 menit ke-5 (V5). Sedangkan kelompok uji III (minyak ikan 201,6 mg), kaki belakang tikus mengalami peningkatan volume udem mulai 30 menit pertama (V1) hingga ke-3 (V3) dan setelah itu mengalami penurunan dan volume udem menjadi dibawah V0 pada 30 menit ketujuh (V7).

Hasil penelitian kemudian dianalisis dengan *repeated* Anova, Hasilnya disajikan dalam lampiran 1.

Dengan melihat nilai signifikansi dari *Pillai's Trace*, *Wilk's Lambda*, *Hotelling's Trace*, dan *Roy's Largest Root* dapat diketahui bahwa pengurangan volume udem kaki kiri belakang tikus tiap 30 menit untuk 4 jam pertama berdasarkan waktu pengukuran adalah berbeda secara nyata ( $p=0,000$ ) dan terdapat interaksi yang signifikan antara variabel volume udem tiap 30 menit per kelompok dosis pada penurunan volume udem ( $p=0,000$ ). Hal ini berarti bahwa pengurangan udem tiap 30 menit pada masing-masing kelompok dosis terdapat perbedaan yang bermakna. Untuk mengetahui pada kelompok mana perbedaan tersebut dapat dilihat pada *Tests of Within-Subjects Contrasts* yang disajikan dalam lampiran 1.

Dari tabel *Tests of Within-Subjects Contrasts* dapat diketahui bahwa untuk pengurangan volume udem tiap 30 menit dalam 4 jam pertama tiap kelompok tanpa melihat faktor dosis, perbedaan yang signifikan terjadi pada 30 menit ke-2 ( $p=0,000$ ), ke-3 ( $p=0,000$ ), ke-8 ( $p=0,019$ ), dan ke-9 ( $p=0,039$ ). Hal ini berarti bahwa pada waktu tersebut masing-masing kelompok mengalami perbedaan volume udem yang bermakna.

Interaksi yang signifikan antara variabel volume udem tiap 30 menit dengan dosis masing-masing kelompok pada penilaian pengurangan volume udem terjadi pada 30 menit pertama ( $p=0,000$ ), ke-2 ( $p=0,001$ ), ke-3 ( $p=0,012$ ), ke-5 ( $p=0,003$ ), dan ke-7 ( $p=0,000$ ).

Penurunan volume udem pada 4 jam pertama dengan perbandingan utama kelompok kontrol positif (ibuprofen) adalah bermakna terhadap kelompok kontrol negatif ( $p=0,012$ ); kelompok uji I ( $p=0,007$ ) dan kelompok uji III ( $p=0,006$ ). Hal

ini berarti bahwa pada kelompok-kelompok tersebut terdapat perbedaan secara nyata terhadap ibuprofen. Ibuprofen mempunyai kemampuan dalam menurunkan volume udem (inflamasi) pada 4 jam pertama sedangkan aquades, kelompok uji I dan III tidak mempunyai kemampuan dalam menurunkan volume udem seperti kemampuan ibuprofen. Walaupun secara grafik, kelompok uji III dapat menurunkan volume udem mulai 30 menit keempat (V4) dan volume udem menjadi dibawah V0 pada 30 menit ketujuh (V7), tetapi penurunan ini tidak signifikan menurut statistik.

Pada kelompok uji II secara statistik, tidak terdapat perbedaan secara nyata bila dibandingkan dengan ibuprofen ( $p = 0,051$ ), hal ini berarti bahwa kelompok uji II dapat menurunkan volume udem pada kaki kiri belakang tikus.

Pada penelitian pengamatan pengurangan udem ini termasuk dalam aspek kuratif yaitu untuk mengetahui kemampuan minyak ikan dalam menurunkan volume udem kaki kiri belakang tikus yang telah menjadi udem setelah didiamkan  $\pm 15$  jam, kemudian pemberian minyak ikan dapat menurunkan volume udem tersebut, terutama pada kelompok II (126 mg) mulai pada 30 menit ke-5 (V5). Hal ini disebabkan minyak ikan mengandung omega 3 yang terdiri dari EPA dan DHA (Calder, 2006).

EPA dan DHA dapat bekerja secara langsung yaitu menghasilkan asam arakhidonat sebagai substrat eikosanoid dan menghambat metabolisme asam arakhidonat, maupun bekerja secara tidak langsung yaitu dengan penghambatan ekspresi gen inflamasi terutama pada aktivasi faktor transkripsi. Selain itu

menurut Calder, 2006 EPA dan DHA menghasilkan mediator antiinflamasi berupa resolvins yang merupakan antiinflamasi pada proses akut maupun kronik.

Pada penelitian dengan pengamatan pengurangan udem terjadi proses penurunan inflamasi secara langsung maupun dengan pembentukan resolvin. Penurunan volume udem (inflamasi) secara tidak langsung adalah tidak mungkin karena untuk penghambatan ekspresi gen inflamasi, minyak ikan membutuhkan waktu yang lebih lama dari 4 jam.

Menurut Calder, 2006, proses inflamasi dipengaruhi beberapa faktor yaitu:

- a. Perbedaan pembentukan eikosanoid
- b. Sifat alamiah stimulus
- c. Waktu pembentukan dan aksi dari prekursor eikosanoid
- d. Konsentrasi dari perbedaan pembentukan eikosanoid
- e. Sensitivitas sel target dan jaringan terhadap eikosanoid yang terbentuk

Penelitian yang dilakukan oleh Bagga, 2003, tentang perbedaan omega 3 dan omega 6, menunjukkan bahwa PGE2 mempengaruhi COX2 pada sel fibroblas dan meregulasi produksinya. Hal ini mempengaruhi pembentukan IL-6 dari makrofag, penghambatan terhadap 5-lipooksigenase sehingga menurunkan produksi dari LT4 dan mempengaruhi 15-LOX sehingga mempengaruhi pembentukan lipoksin yang merupakan mediator antiinflamasi.

Bagga, 2003, juga melaporkan bahwa konsumsi minyak ikan dapat menurunkan konsentrasi PGE2 dan peningkatan PGE3. PGE3 merupakan mediator inflamasi yang kurang poten bila dibandingkan dengan PGE2 sehingga

PGE3 dapat memberikan proses inflamasi yang cukup dan tidak merusak jaringan normal secara berlebihan.

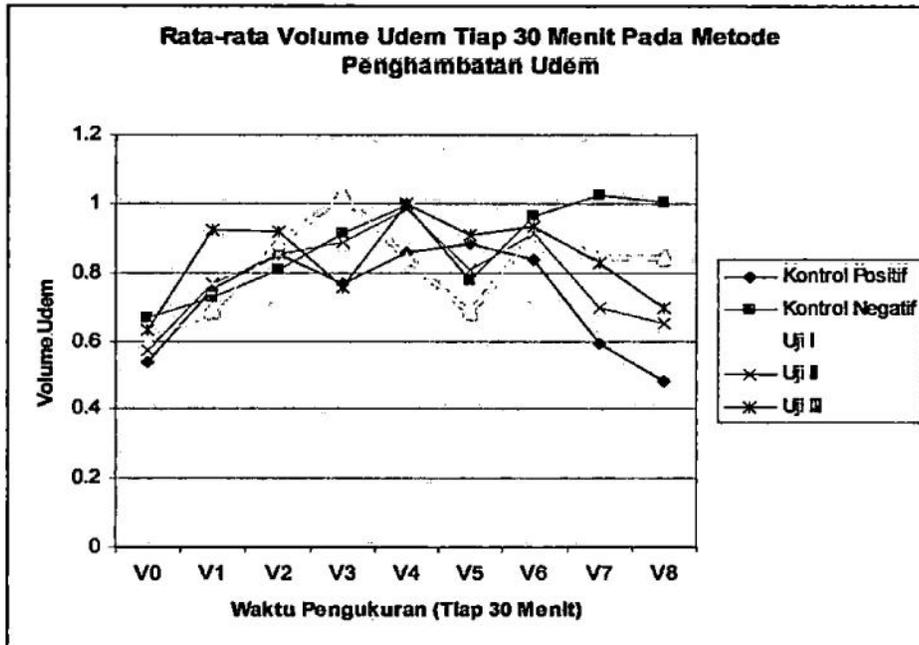
## 2. Pengamatan Penghambatan Udem

Pada uji antiinflamasi minyak ikan dalam menghambat udem, peneliti mencoba untuk melihat apakah minyak ikan mempunyai efek antiinflamasi dalam menghambat udem pada kaki kanan belakang tikus.

Penelitian dimulai dengan menyuntikan karagenin 1 % sebanyak 0,1 ml pada subplantar kaki kanan tikus bagian belakang, kemudian setelah 30 menit penyuntikan karagenin, volume udem kaki kiri tikus putih diukur dengan plestimograph, hasil pengukuran ini dianggap sebagai volume awal (  $V_0$  ).

Tiga puluh menit setelah pengukuran awal, masing-masing tikus diberikan perlakuan sesuai dengan kelompoknya yaitu kontrol positif diberikan ibuprofen 15 mg, kontrol negatif diberikan aquades 3 ml dan kelompok uji I, II, dan III diberikan minyak ikan dengan dosis berturut-turut 75,6 mg; 126 mg; dan 201,6 mg. Setelah itu, kaki kanan belakang tikus diukur dengan plestimograph setiap 30 menit selama 4 jam. Hasil penelitian digambarkan dalam gambar grafik 6.

Pada gambar grafik 6, menjelaskan bahwa kelompok kontrol positif (ibuprofen) menunjukkan peningkatan udem pada 30 menit ke-1 ( $V_1$ ) sampai 30 menit ke-5 ( $V_5$ ), kemudian secara perlahan menunjukkan penurunan udem setelah 30 menit ke-6 ( $V_6$ ) dan pada 30 menit ke-8 ( $V_8$ ) ibuprofen dapat menunjukkan penurunan udem dibawah volume awal (  $V_0$  ) dalam 4 jam pertama.



**Gambar 6.** Grafik rata-rata volume udem tiap 30 menit pada pengamatan penghambatan udem

Kontrol negatif (dengan pemberian aquades) menunjukkan peningkatan volume udem dari 30 menit pertama (V1) sampai dengan 30 menit terakhir (V8) secara fluktuatif sebagai akibat variasi teknis pengambilan data maupun perbedaan reaksi biologis tikus. Hal ini disebabkan aquades tidak mempunyai kandungan yang dapat mempengaruhi proses inflamasi.

Pada kelompok uji I, II, dan III terlihat bahwa dari tiap waktu pengukuran terjadi fluktuatif volume udem. Hasil pengukuran volume udem pada kaki kanan belakang tikus tidak beraturan dan naik turun. Hal ini disebabkan omega 3 pada minyak ikan berkompetisi dengan omega 6 (yang merupakan prekursor asam arakhidonat terbanyak dalam tubuh) untuk pembentukan asam arakhidonat dan prekusornya (Bagga, 2003). Walaupun terjadi kompetisi pembentukan asam

arakhidonat tetapi pada 4 jam pertama, dalam penelitian ini, minyak ikan belum mempunyai efek yang besar dalam penghambatan udem.

Hasil penelitian kemudian dianalisis dengan *repeated* Annova yang hasilnya disajikan dalam lampiran 3. Dengan melihat nilai signifikansi dari *Pillai's Trace*, *Wilk's Lambda*, *Hotelling's Trace*, dan *Roy's Largest Root* dapat diketahui bahwa perbandingan tingkat penghambatan volume udem tapak kaki belakang tikus tiap 30 menit untuk 4 jam pertama berdasarkan waktu pengukuran adalah berbeda secara nyata ( $p=0,000$ ) Sedangkan perbandingan antara volume tapak kaki belakang tikus dengan dosis adalah terdapat interaksi yang signifikan antara variabel volume udem tiap 30 menit dengan dosis pada penghambatan volume udem ( $p=0,000$ ). Hal ini berarti bahwa penghambatan udem tiap 30 menit pada masing-masing kelompok dosis terdapat perbedaan yang bermakna. Untuk mengetahui pada kelompok yang mana perbedaan tersebut dapat dilihat pada *Tests of Within-Subjects Contrasts*, yang hasilnya disajikan di lampiran 4.

Dari *Tests of Within-Subjects Contrasts* dapat diketahui bahwa untuk penghambatan volume udem tiap 30 menit dalam 4 jam pertama tiap kelompok tanpa melihat faktor dosis, perbedaan yang signifikan terjadi pada 30 menit ke-1 ( $p=0,001$ ), ke-2 ( $p=0,000$ ), ke-3 ( $p=0,004$ ), ke-4 ( $p=0,011$ ), ke-7 ( $p=0,003$ ), dan ke-8 ( $p=0,000$ ). Hal ini berarti bahwa pada waktu tersebut masing-masing kelompok mengalami perbedaan volume udem yang bermakna.

Interaksi yang signifikan antara variabel volume udem tiap 30 menit dengan dosis masing-masing kelompok pada penilaian penghambatan volume udem

terjadi pada 30 menit ke-1 ( $p=0,000$ ), ke-2 ( $p=0,000$ ), ke-3 ( $p=0,017$ ), ke-5 ( $p=0,000$ ), ke-6 ( $p=0,004$ ) dan ke-7 ( $p=0,002$ ).

Nilai statistik dari penghambatan volume udem pada aquades dibandingkan dengan ibuprofen adalah bermakna ( $p=0,042$ ). Hal ini berarti bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara ibuprofen (kontrol positif) dengan aquades (kontrol negatif), ibuprofen mempunyai penghambatan udem pada 4 jam pertama sedangkan aquades tidak mempunyai kemampuan dalam menghambat volume udem pada.

Pada kelompok uji I, II dan III tidak terdapat perbedaan yang bermakna dengan ibuprofen dalam menghambat udem ( $p>0,05$ ). Hal ini berarti bahwa minyak ikan mempunyai kemampuan dalam menghambat udem seperti ibuprofen.

Pada dasarnya mekanisme penurunan inflamasi pada pengamatan pengurangan dan penghambatan udem adalah sama, yaitu EPA dan DHA dapat bekerja secara langsung yaitu mengganti peran asam arakhidonat sebagai substrat eikosanoid dan menghambat metabolisme asam arakhidonat, maupun bekerja secara tidak langsung yaitu dengan penghambatan ekspresi gen inflamasi terutama pada aktivasi faktor transkripsi serta pembentukan resolvins (Calder, 2006).

EPA juga menghasilkan leukotriens dengan mengubah menjadi *hidroxyeicosapentanoic acids* dengan bantuan enzim LOX. Leukotriens B seri 5 ini mempunyai efek 10 sampai 100 kali lebih rendah daripada LTB4. Penurunan LTB4 yang merupakan substrat untuk menstimulasi kemotaksis leukosit (Calder, 2006; Calder, 2006; Trebble, *et.al.*, 2003).

Peningkatan asupan  $\omega$ -3 pada minyak ikan dapat menurunkan persatuan asam arakhidonat dari  $\omega$ -6 pada membran sel, terutama membran sel erosit, platelet, sel endotel, monosit, limfosit, granulosit, sel neuron, fibroblast, sel retinal, sel hepar dan neuroblastoma. Penurunan persatuan ini akan menyebabkan penurunan produksi mediator inflamasi karena itu menurunkan respon inflamasi (Oh, 2005; Kew, *et.al*, 2004; Simopoulus, 2002).

Asam arakhidonat merupakan  $\omega$ -6 yang berperan dalam pembentukan prostaglandin dan leukotriens melalui enzim siklooksigenase (COX) dan lipooksigenase (LOX). Omega-6 ini merupakan jumlah terbesar *polyunsaturated fatty acids* pada asupan makanan. Pemberian asupan  $\omega$ -3, yang terdapat dalam jumlah banyak pada minyak ikan, berkompetensi dengan  $\omega$ -6 dalam pembentukan prostaglandin pada tingkat enzim, yaitu COX dan LOX (Oh, 2005; Kew, *et.al*, 2004; Bagga, *et.al.*, Simopoulus, 2002).

Pada penelitian pengamatan penghambatan udem ini termasuk dalam aspek preventif yaitu untuk mengetahui kemampuan minyak ikan dalam menghambat pembesaran volume udem pada tapak kaki belakang tikus.

Pada segi preventif ini, menurut penelitian yang dilakukan Bagga, 2003, terjadi kompetisi antara omega 3 dan omega 6 dalam menghasilkan asam arakhidonat sebagai prekursor inflamasi sehingga dapat dilihat pada grafik penghambatan udem bahwa terjadi fluktuatif hasil volume udem.