

LAPORAN PENELITIAN

Efektivitas Kombinasi Pemberian Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) dan Aplikasi Hidroksiapatit terhadap Ekspresi FGF-2 pada Proses Bone Healing

*(Effectivity of Combination of Sardine Fish Oil (*Sardinella longiceps*) and Hydroxyapatite Application on The Expression of FGF-2 in Bone Healing Process)*

Tiaranita Ramadhani*, Rima Parwati Sari**, Widyastuti***

*Sarjana Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah

** Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah Surabaya

*** Periodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah Surabaya

ABSTRACT

Background: Bone healing on defect requiring the cells to form new bone. Fibroblast growth factor -2 belong to one of signaling control that play part in differentiation of fibroblast to osteoblast cell. Hydroxyapatite application on bone healing will aid bone regeneration as structure. Application of *Sardinella longiceps* oil that contain EPA and DHA as immunodulator could accelerate and optimize inflammatory phase in bone healing. **Purpose:** The aimed of this study to determine the effectivity of the combination of *Sardinella longiceps* oil and application of hydroxyapatite on the expression of fibroblast growth factor -2 (FGF-2) in bone healing process. **Materials and Methods:** The experimental units (male wistar rat, n=20) were divided into two groups, control (K) and treatment (P) groups. Treatment groups were given *Sardinella longiceps* oil per oral seven days before the surgery to make the defect, and continued for seven days later. Control groups were not given *Sardinella longiceps* at all. All of the wistar rat were have two defects in their right femur, which is use hydroxyapatite (K+ and P2) and no use hydroxyapatite (K- and P1). Defect was made as big as half diameter of round bur in femur. Rats were sacrificed seven days after surgery, and femur were sliced transversally and performed immunohistochemistry staining with Anti-bFGF Polyclonal antibody (Bioss®). Examination were done under light microscope. Data were analyzed using one-way Anova for FGF-2 expression. **Result:** *Sardinella longiceps* oil increased the mean of FGF-2 expression on P2 group : $15,29 \pm 5,251$, compare to K- : $5,57 \pm 2,070$, K+ : $12,14 \pm 3,976$ and P1 : $8,14 \pm 1,676$ ($P < 0.05$). **Conclusion:** The combination of *Sardinella longiceps* oil and hydroxyapatite application effective the expression of fibroblast growth factor-2 in the process of bone healing.

Keywords: Sardine fish oil, hidroxyapatite, fibroblast growth factor-2, bone healing

Correspondence: Rima Parwati Sari, Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, Hang Tuah University, Arif Rahman Hakim 150, Surabaya, Phone 031-5945864, Email: rimaparwatisari@gmail.com

ABSTRAK

Latar belakang: Penyembuhan pada kerusakan tulang membutuhkan sel-sel untuk membentuk tulang baru. Fibroblast growth factor-2 termasuk sinyaling kontrol pada diferensiasi fibroblas menjadi sel osteoblas. Aplikasi hidroksiapatit pada proses penyembuhan tulang dapat membantu proses regenerasi tulang sebagai kerangka. Pemberian minyak ikan lemuru yang mengandung EPA dan DHA sebagai immunodulator yang dapat mempercepat dan mengoptimalkan fase inflamasi pada fase penyembuhan tulang. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas kombinasi minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) dan aplikasi hidroksiapatit terhadap ekspresi fibroblast growth factor-2 (FGF-2) pada proses bone healing. **Bahan dan Metode:** Unit eksperimen (tikus wistar jantan, n=20) dibagi menjadi 2 kelompok, kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan diberikan minyak ikan lemuru secara per oral selama 7 hari sebelum dilakukan defek, dan dilanjutkan 7 hari setelah dilakukan defek. Kelompok kontrol tidak diberikan minyak ikan lemuru. Semua tikus wistar yang telah diberikan 2 defek difemur kanan, ada yang diaplikasikan hidroksiapatit (K+ dan P2) dan tidak diaplikasikan hidroksiapatit (K- dan P1). Defek dibuat sebesar setengah diameter round bur di femur. Tikus dikorbankan 7 hari setelah pembedahan dan femur di potong secara transversal dan dilakukan pengecatan IHC menggunakan Anti-bFGF Polyclonal antibody (Bioss®). Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya. Data dianalisis menggunakan one-way Anova. **Hasil:** Berdasarkan pada hasil uji ANOVA dan uji LSD, terjadi peningkatan rata-rata ekspresi FGF-2 pada kelompok P2 : $15,29 \pm 5,251$, dibandingkan dengan K- : $5,57 \pm 2,070$, K+ : $12,14 \pm 3,976$ dan P1 : $8,14 \pm 1,676$ ($P < 0.05$). **Simpulan:** Kombinasi minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) dan aplikasi hidroksiapatit efektif secara signifikan terhadap ekspresi fibroblast growth factor-2 FGF-2 pada proses bone healing pada hari ke-7.

Kata kunci: Minyak ikan lemuru, hidroksiapatit, fibroblast growth factor-2, penyembuhan tulang

Korespondensi: Rima Parwati Sari, Bagian Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Hang Tuah, Arif Rahman Hakim 150, Surabaya, Telepon 031-5945864, Fax 031-5912191, Email: rimaparwatisari@gmail.com

PENDAHULUAN

Tulang merupakan jaringan kuat yang memberi bentuk pada tubuh. Osteoblas, osteoklas, osteosit; mineral, matriks dan air termasuk dalam sel tulang yang menjadi unsur-unsur yang membentuk tulang.^{1,2} Dalam bidang kedokteran gigi, kerusakan tulang (*Bone defect*) dapat disebabkan oleh penyakit periodontal, dan juga oleh trauma mekanik yang sering dilakukan dalam perawatan dalam kedokteran gigi, antara lain pasca proses ekstraksi, aplikasi dental implan, pembedahan

preprostetik dan kondisi patologis lainnya.^{3,4} Kerusakan tulang akan menyebabkan kerusakan pada sel, matriks tulang, dan pembuluh darah.⁵

Terdapat 3 tahap dalam proses penyembuhan tulang yaitu fase inflamasi, reparatif, dan remodeling. Fase inflamasi yaitu adanya formasi hematoma, pengumpulan darah melalui akumulasi dari PMNs, limfosit, platelet, blood monosit, makrofag, neutrofil, dan osteoklas. Makrofag akan mengeluarkan sitokin, baik sitokin pro inflamasi (TNF- α , IL-1, IL-6,) maupun sitokin inflamasi (IL-10)

dan menstimulasi angiogenesis. Makrofag juga mengeluarkan *growth factor* antara lain *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Transforming Growth Factor* (TGF), dan *Angiopoietin 1* (Ang-1) yang selanjutnya menstimulasi angiogenesis.^{5,6}

Fibroblast growth factor (FGF) sangat penting pada pembentukan tulang dan osteogenesis yang merupakan sinyaling kontrol pada pembentukan tulang untuk berdiferensiasi menjadi osteoblas. FGF dan VEGF dikeluarkan oleh *growth factor* pada proses bone healing.⁶ *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Bone Morphogenic Protein-2* (BMPs), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGs), dan TGF menstimulus osteoprogenitor sel untuk berproliferasi serta berdiferensiasi menjadi osteoblas yang selanjutnya akan memproduksi tulang yang baru.^{7,8} *Basic Fibroblast Growth Factor* (FGF-2) termasuk anggota dari FGF yang penting dalam regenerasi jaringan pada proses angiogenesis dan juga dapat meningkatkan ekspresi penanda osteogenik dan mineralisasi serta menunjukkan peran dalam regenerasi tulang.^{9,10}

Fase proliferasi yaitu pada fase reparasi, fase ini dimulai saat fase inflamasi melepas sitokin dan *growth factor* sehingga terjadi proliferasi fibroblas untuk membentuk matriks ekstraseluler dan pembentukan garam kalsium melalui suatu perlekatan, sehingga terbentuk tulang baru (*woven bone*). Fase remodelling termasuk fase terakhir dari penyembuhan tulang yang mana terjadi aposisi dan pembentukan tulang oleh osteoblas dan osteoklas, dan juga kalus eksterna akan perlahan-

lahan menghilang.^{5,11}

Teknologi *bone graft* akhir-akhir ini berkembang dan digunakan sebagai alternatif untuk memperbaiki dan mengganti kerusakan tulang yang disebabkan oleh trauma, reseksi tumor, degenerasi patologis, dan deformasi kongenital. Ketika diberi *bone graft*, tulang mengalami suatu perbaikan tulang seperti hemostatis, inflamasi, proliferasi dan revaskularisasi, *soft callus*, *hard callus*, dilanjutkan dengan remodeling.^{12,13}

Alloplast merupakan *graft* sintetik yaitu tulang yang terbuat dari bahan keramik dan memiliki struktur mirip tulang, salah satu contohnya adalah Hidroksiapatit (HA) yang memiliki kemampuan untuk osteokonduktif.^{14,15,16} HA juga memberikan struktur (*scaffold*) *bonegraft* yang sama dengan komposisi tulang yang dapat mempercepat proses regenerasi tulang.¹⁷ Pemberian HA dapat memberikan efek penyembuhan yang baik dengan cara memperantarai faktor-faktor angiogenesis, merangsang makrofag dan FGF di daerah luka. Hidroksiapatit merangsang makrofag pada daerah kerusakan, dan makrofag dengan sel-sel radang membantu memperkuat proses angiogenesis pada daerah luka.¹⁸ Penggunaan Hidroksiapatit dalam bentuk *bonegraft* sebagai pembentuk formasi tulang masih belum mampu mempercepat penyembuhan tulang secara keseluruhan, sehingga diperlukan senyawa tambahan yang dapat mempengaruhi sistem imun tubuh yang dapat membuat penyembuhan tulang berjalan dengan baik.¹⁹ Omega-3 termasuk bahan alami yang membantu dalam memodulasi sistem imun dan juga dapat mempengaruhi

kerja dari efek sitokin.²⁰ Omega-3 dan Omega-6 terdapat senyawa *resolving E1* dan *lipoxin* yang dapat mempengaruhi sistem imun agar penyembuhan tulang dapat berjalan dengan baik, hal ini disebabkan oleh karena faktor inflamasi pada penyembuhan tulang menyebabkan kerusakan tulang semakin parah jika terjadi dalam waktu lama melalui pelepasan sitokin. Pemberian omega-3 secara sistemik yang dilakukan pada hewan coba berfungsi sebagai imunomodulator yang menghambat mediator proinflamatori. Kandungan omega-3 banyak ditemukan pada minyak ikan.^{19,21}

Ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) termasuk salah satu ikan yang memiliki kandungan asam lemak relatif tinggi terutama kandungan omega-3 berkisar 11,33%-40,26%. Omega-3 mengandung *docohexaenoic acid* (DHA) dan *eicosapentaenoic acid* (EPA) sebesar 13% dan 18%.^{22,23,24} Limbah minyak ikan lemuru didapatkan dari hasil sampingan proses pengalengan dan penepungan di daerah Muncar, Banyuwangi, Jawa Timur. Namun limbah minyak ikan ini masih belum optimal pemanfaatannya.^{23,25}

Berdasarkan pemaparan masalah diatas penulis mengambil judul “Kombinasi Aplikasi Hidroksiapatit dan Pemberian Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) terhadap Ekspresi *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF-2) pada proses *bone healing*”.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini penelitian *true eksperimental* dengan rancangan *post test only control group design*.

Unit eksperimen yang

digunakan pada penelitian ini 20 ekor tikus wistar jantan dengan berat badan berkisar 250-300 gram. Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah tabung penyimpanan *os femur dextra*, gunting dan pisau bedah, pinset anatomis dan respiratorium, mikrotom untuk memotong, mikroskop cahaya, spuit 3cc, *round bur (straight handpiece)* merk MG ukuran 18, mikromotor 1200 rpm, sonde makan, *dappen glass*, *separating disc*. Bahan yang digunakan adalah hidroksiapatit (*alloplast*), minyak ikan lemuru, benang jahit *silk* dan jarum, kapas, aquades untuk minuman tikus diganti setiap hari, makanan tikus, formalin *buffer* 10%, *ketamine hydrochloride*, *xylazine hydrochloride*, *povidine iodine* 10%, alkohol, *novalgin*, dan *EDTA* 10%.

Prosedur pada penelitian ini dimulai dengan penyesuaian tikus selama satu minggu. 20 ekor tikus wistar dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol yang mengalami penyesuaian tanpa diberi minyak ikan lemuru dan kelompok perlakuan yang beri minyak ikan lemuru dengan dosis suplemen yaitu 9mg/200 grBB/hari selama 7 hari. Masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok dengan aplikasi HA dan tanpa aplikasi HA.²⁶

Tikus yang sudah mengalami penyesuaian dibagi berdasarkan kelompok. Pembuatan defek dilakukan pada *os femur dextra*. Pertama dilakukan anestesi dengan memberikan *ketamine* 1 mL dan *xylazine* 0,5 mL dicampur dan disuntikkan dengan dosis 1,5 mL dicampur dan disuntikkan dengan dosis 1,5 mL/100 grBB pada *femur dextra (intramuscular)*.²⁷ Pada daerah yang akan dibuat defek, bulu dicukur

dan diberikan antiseptik *povidine iodine* 10%.²⁸ Dengan pisau bedah dibuat insisi selebar 2 cm pada jaringan lunak (kulit dan otot) diangkat menggunakan *periosteal elevator* tempat pembuatan defek. Pada os *femur dextra* tikus dengan menggunakan *straight handpiece* dibuat defek berupa 2 lubang pada kelompok 1 dan kelompok 2. Kedua kelompok tersebut dibuat 2 lubang pada masing-masing kelompok setengah diameter *round bur* merk MG dengan ukuran 18 (hasil trial). Lubang 1 dibuat 5mm dari *third trochanter femur* tikus.²⁹ Jarak antar lubang 1 dan ke 2 adalah 5mm (hasil trial).

Kelompok kontrol, defek pada bagian atas femur tidak diaplikasikan apa-apa (K-), sedangkan pada bagian bawah femur diaplikasikan hidroksiapatit (K+). Pada kelompok perlakuan, defek pada atas femur tidak diaplikasikan hidroksiapatit karena sebagai kelompok yang diberi minyak ikan lemuru (P1) dan defek pada bagian bawah diaplikasikan hidroksiapatit (P2). Setelah itu, dilakukan penjahitan dan untuk mengontrol pembengkakan serat rasa sakit diberikan analgesik novalgin dengan dosis 18,75 mg/ 200grBB yang dilarutkan dalam CMC 0,25 hingga mencapai 0,2 mL.^{30,31}

Pada kelompok perlakuan, minyak ikan lemuru dengan dosis antiinflamasi 0,56 gr/200grBB secara sistemik selama 7 hari pasca pembedahan.³¹ Setelah 7 hari pasca pembedahan, dilakukan pengambilan sediaan dan *euthanasia* pada hewan coba. terlebih dahulu tikus dianastesi dengan ketamine 1 mL dan xylazine 0,5 mL dicampur dan disuntikkan dengan dosis 1,5 mL 100 grBB pada femur *dextra* (*intramuscular*). Femur *dextra* diambil dan dipotong dengan

separating disc, kemudian dimasukkan kedalam *buffer* formalin 10%. Setelah itu, dilakukan *euthanasia* dengan *neck (cervical)* dislocation lalu dikubur dalam keadaan tidak sadar.³²

Sediaan tulang *femur* tikus yang sudah diambil dilakukan dekalsifikasi yang selanjutnya akan dilakukan pembuatan sediaan imunohistokimia. Pengecatan imunohistokimia menggunakan *Anti-bFGF Polyclonal antibody* (Bioss®).

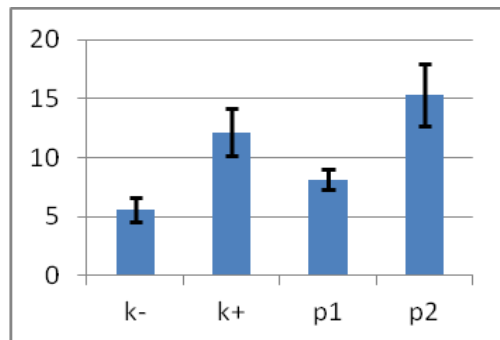
Pengamatan imunohistokimia dilakukan dengan mengamati jumlah sel fibroblas pada daerah defek yang mengekspresikan FGF-2 dengan pembesaran 400X.³³ Data dari hasil hitung sel fibroblas pada masing-masing kelompok ditabulasi. Uji statistik yang digunakan adalah uji parametrik *One-way Anova*.

HASIL

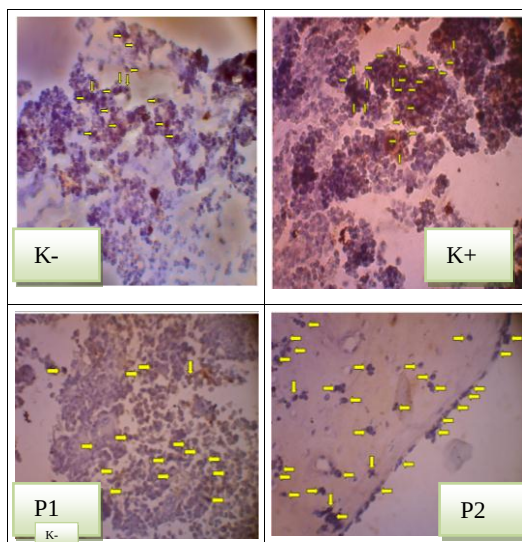
Data yang diperoleh dari hasil penelitian ditabulasi dan dianalisis secara deskriptif yang bertujuan untuk memperoleh gambaran distribusi dan peringkasan data guna memperjelas penyajian hasil, kemudian dilakukan uji hipotesis menggunakan statistik analitik dengan taraf signifikansi 95% ($p=0,05$) dengan menggunakan program SPSS versi 20.

Tabel 1. Rata-rata dan standar deviasi ekspresi FGF-2 pada *femur* tikus

Kelompok	Rata-rata ± Standar Deviasi
K -	5,57 ± 2,070
K +	12,14 ± 3,976
P1	8,14 ± 1,676
P2	15,29 ± 5,251



Gambar 1. Diagram batang rerata dan standar deviasi ekspresi FGF-2 pada femur tikus.



Gambar 2. Ekspresi FGF-2 pada femur tikus (*Rattus norvegicus*) dengan pengecatan IHC dan pembesaran 400x. Tanda panah menunjukkan fibroblas yang mengekspresikan FGF-2.

Data hasil penelitian dianalisis secara statistik deskriptif didapatkan data-data seperti yang terlihat pada gambar 1, dimana ekspresi FGF-2 pada masing-masing kelompok menunjukkan adanya perbedaan nilai rata-rata. Gambar tersebut menunjukkan bahwa dengan kombinasi pemberian minyak ikan lemuru dan hidroksiapatit terjadi peningkatan jumlah osteoblas.

Sebelum dilakukan uji hipotesis, maka setiap kelompok diuji normalitasnya dengan menggunakan

uji *Shapiro-Wilk*, karena pada penelitian ini jumlah sampel < 50 . Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa data berdistribusi normal dan hasil uji homogenitas didapatkan nilai signifikansi 0,100, sehingga dapat disimpulkan bahwa data hasil penelitian homogen ($p > 0,05$).

Hasil data di atas diketahui memiliki distribusi data yang normal dan memiliki varians yang homogen. Oleh karena itu, uji dilanjutkan dengan menggunakan uji *One-way ANOVA* karena desain atau rancangan penelitian ini menggunakan lebih dari 2 kelompok yang tidak berpasangan dengan skala pengukuran numerik (rasio). Uji *One-way ANOVA* ini digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan pada tiap kelompok baik secara terpisah maupun bersama-sama. Setelah itu, didapati nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$). Maka dapat disimpulkan terdapat perbedaan ekspresi FGF-2, minimal antar sepasang kelompok. Perbedaan pasangan antar kelompok dilakukan analisis perbandingan ganda (*multiple comparison*) dengan LSD.

Tabel 2. Tabel hasil uji LSD

Kelompok	K+	P1	P2
K-	.002*	.188	.000*
K+		.046*	.111
P1			.001*

Keterangan: $p < 0,05$ ada perbedaan bermakna $p > 0,05$ tidak ada perbedaan bermakna

*terdapat perbedaan bermakna

Berdasarkan hasil uji *LSD* didapatkan perbedaan ekspresi FGF-2 yang bermakna ($p < 0,05$) yaitu pada kelompok K- dengan kelompok K+, kelompok K+ dengan kelompok P1, kelompok K- dengan kelompok P2 dan kelompok P1 dengan kelompok P2. Sedangkan kelompok K- dengan P1

dan kelompok K+ dengan P2 memiliki perbedaan ekspresi FGF-2 yang tidak bermakna ($p>0,05$).

PEMBAHASAN

Unit eksperimen yang digunakan pada penelitian ini adalah hewan coba tikus wistar jantan karena jenis kelamin jantan tidak ada pengaruh hormonal yang dikawatirkan dapat mempengaruhi respon imun yang berakibat pada mekanisme penyembuhan. Sedangkan menggunakan tikus dikarenakan metabolisme tikus hampir sama dengan manusia dan memiliki tingkat stress yang lebih rendah dibanding hewan coba lainnya. Selain itu, pada penelitian ini bahan *scaffold* diaplikasikan pada *Os femur* tikus wistar dan secara klinis diamati dari sudut pandang histologis. *Os femur* tikus wistar memiliki bentukan *trabecular bone* yang menonjol di bawah tulang kortikal yang identik dengan tulang alveolar pada manusia sehingga dapat digunakan sebagai aplikasi untuk mempelajari regenerasi tulang rahang pada kedokteran gigi regeneratif.^{34,35}

Proses penyembuhan tulang terdapat 3 fase yang dimulai dari fase inflamasi yang terjadi selama 1-7 hari ditandai dengan ketika terjadi cedera pada daerah kortikal tulang, periosteum terangsang dan pembuluh darah pada sekitar daerah cedera menjadi pecah.^{13,36} Selain itu pada fase ini terjadi migrasi sel makrofag, monosit, limfosit, sel PMN dan fibroblas ke daerah yang mengalami kerusakan melalui prostaglandin selaku mediator inflamasi. Pada fase ini akan menghasilkan jaringan granulasi, pembuluh darah muda dan

migrasi sel-sel mesenkimal.³⁷ Pada saat terjadi inflamasi, terjadi penurunan jumlah sel inflamasi pada *defect* sehingga akan dilanjutkan dengan fase proliferasi yang ditandai dengan adanya jaringan granulasi yang terdiri dari fibroblas, pembuluh darah baru, matriks ekstraseluler dan kolagen.³⁸

Fase proliferasi atau reparatif dimulai saat fase inflamasi melepas sitokin dan *growth factor* (PDGF, VEGF, FGF, TGF dan Ang-1) sehingga terjadi proliferasi fibroblas untuk membentuk matriks ekstraseluler dan pembentukan garam kalsium melalui suatu perlekatan, sehingga terbentuk tulang baru (*woven bone*). *Growth factor* juga dilepaskan oleh platelet dan fibroblas, termasuk FGF-2 dihasilkan juga oleh monosit, keratinosit maupun fibroblas. Fase ini menghasilkan perkembangan jaringan yang pada akhirnya akan digantikan oleh tulang. Ketika jaringan diresorpsi, sel seperti fibroblas, kondroblas, dan osteoblas akan mulai terbentuk oleh *pluripotent mesenchymal cells*.^{5,39,37} Akhir fase inflamasi untuk transisi ke fase proliferasi, makrofag merangsang sitokin dan *growth factor* salah satunya FGF-2. Fase proliferasi dimulai 3 hari pasca pencabutan gigi.⁴⁰ Pada penelitian yang dilakukan oleh Takayama et al (2001) proses perbaikan secara normal, FGF-2 dapat dilihat 1 sampai 8 minggu pasca kerusakan tulang pada hewan coba tikus dan pada penelitian pasca pencabutan gigi maarmut, ekspresi FGF-2 dapat dilihat pada hari ke 3. Ekspresi FGF-2 merupakan sinyaling kontrol dari diferensiasi sel fibroblas, fibroblas pertama kali muncul pada hari ke 3 dan memuncak pada hari ke 7 di daerah luka.⁴⁰ Proses *bone healing* pada penelitian ini dapat diasumsikan

ekspresi FGF-2 dihitung pada hari ke 7 paska pembuatan defek pada *femur* tikus wistar.

Fase remodeling merupakan fase paling lama dari penyembuhan tulang yang ditandai dengan perubahan lambat dari bentuk tulang untuk suatu fungsi dan kekuatan yang normal atau hampir normal. Pada fase ini terjadi aposisi dan pembentukan tulang oleh osteoblas dan resorpsi tulang yang rusak oleh osteoklas.^{11,41}

Hidroksiapatit (HA) merupakan komponen mineral utama penyusun mineral tulang dan jaringan keras pada mamalia yang memiliki sifat osteokonduktif dan biokompatibel yang berintegrasi dengan tulang host dan berperan sebagai pengganti tulang dengan membentuk kerangka (*scaffold*). FGF -2 merupakan sinyaling kontrol dalam pembentukan tulang yang berfungsi untuk meregulasi replikasi sel osteoprogenitor, diferensiasi fibroblas pada periosteum menjadi osteoblas, dan apoptosis sebagai pengisi dari *scaffold*. Sel-sel progenitor akan menempel pada *scaffold* dan akan berdiferensiasi menjadi osteoblas dan memberikan tempat untuk deposisi matriks tulang serta jalur pembuluh darah sebagai suplai nutrisi.^{6,18,42,43,44} *Fibroblast growth factor* (FGF) terbukti merangsang pertumbuhan tulang, sintesis kolagen pada *bone healing* baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.⁴⁵ Dari teori tersebut dapat menjadi alasan ekspresi FGF-2 pada K(+) dengan aplikasi hidroksiapatit lebih meningkat dibandingkan dengan K(-) yang tidak diaplikasikan hidroksiapatit.

Pemberian minyak ikan lemuru yang kaya akan Omega-3 memiliki kandungan 13,7% EPA, 8,9 DHA dan 26,8 % total omega-3 yang berasal dari

total minyak, memiliki peran sebagai imunmodulator pada proses *bone healing*.⁴⁶ Omega-3 dapat mempengaruhi proses inflamasi. Pada proses inflamasi, makrofag akan mengeluarkan sitokin, baik sitokin proinflamasi maupun sitokin inflamasi serta *growth factor* (GF). Antiinflamasi akan meningkat sehingga dapat menekan proinflamasi. Minyak ikan lemuru juga akan mempengaruhi *growth factor*, sehingga meningkatkan *fibroblast growth factor* (FGF) yang memiliki fungsi dalam diferensiasi osteoblas.^{47,48}

Omega-3 juga mengandung senyawa *resolvingE1* dan *lipoxin* yang dapat mempengaruhi system imun agar penyembuhan tulang dapat berjalan dengan baik. Senyawa bioaktif RvE1 yang menghambat PGE2 dalam meresorpsi tulang. Selain itu, RvE1 juga dapat mengurangi inflamasi, migrasi sel dendritik, peritonitis dan produksi IL-2).^{19,49} Pada kelompok K(-) ekspresi FGF-2 lebih sedikit dibandingkan dengan P1 yang diberikan perlakuan minyak ikan lemuru. Secara statistik perbedaan keduanya tidak terlihat perbedaan yang signifikan, tetapi setidaknya terdapat perbedaan ekspresi FGF-2 pada kedua kelompok tersebut.

Kelompok K(+) yang diaplikasikan hidroksiapatit secara topikal langsung pada *defect* memiliki sifat osteokonduktif sehingga membentuk kerangka (*scaffold*) sehingga osteoblas dapat melekat pada kerangka tersebut. Pemberian HA secara kuratif membantu pada fase remodeling. Hal tersebut yang mungkin dapat menjadikan hasil penelitian menjadi terdapat perbedaan yang bermakna antara K(+) dengan P1, pada K(+) yang diaplikasikan

hidroksiapatit menunjukkan ekspresi FGF-2 lebih meningkat dibandingkan dengan P1 yang diaplikasikan minyak ikan lemuru. Karena pada P1, pemberian minyak ikan lemuru diberikan secara sistemik dan preventif yaitu diberikan seminggu sebelum pembedahan dan kuratif sebagai immunomodulator agar dapat mempercepat fase inflamasi. Pada pemberian sistemik ini memungkinkan untuk efek dari minyak ikan lemuru tidak langsung mengenai defek dan harus melalui aliran darah terlebih dahulu.

Penelitian ini, kombinasi pemberian minyak ikan lemuru dengan aplikasi hidroksiapatit menunjukkan peningkatan ekspresi FGF-2 paling baik dibandingkan dengan kelompok lainnya. Karena pada P2, HA yang diaplikasikan secara topikal memiliki sifat osteokonduktif sebagai *scaffold* yang dapat merangsang osteoblas yang berasal dari diferensiasi fibroblas oleh FGF-2 pada periosteum. Pemberian minyak ikan lemuru secara sistemik sebagai immunomodulator dapat mempercepat fase inflamasi tanpa membentuk *scaffold*, sehingga didapatkan kombinasi dari hidroksiapatit dengan pemberian minyak ikan lemuru memiliki pengaruh paling besar terhadap ekspresi FGF-2 pada proses *bone healing* dibandingkan kelompok yang lain. Proses penyembuhan tulang, aplikasi hidroksiapatit dan pemberian minyak ikan lemuru dapat dijadikan obat alternatif.

SIMPULAN

Pada penelitian ini secara umum dapat disimpulkan bahwa kombinasi minyak ikan lemuru (*Sardinella*

longiceps) dan aplikasi hidroksiapatit paling efektif dibandingkan dengan penyembuhan secara normal, aplikasi hidroksiapatit saja, dan pemberian minyak ikan lemuru saja.

DAFTAR PUSTAKA

1. Price SA, Wilson LM. 2006. Patofisiologi, Ed. 6. Jakarta: EGC.
2. Liza RH. 2004. Densitas Mineral Tulang Pada Wanita Menopause 5 Tahun. Tesis, Departemen Obstetri dan Ginekologi Fakultas 208-21. Kedokteran Universitas Sumatra Utara. H. 28-26.
3. Matthew P, William V, Caroline s, Zhu Z, Tejeda K.. 2001. Surgical aids to Prosthodontic, Including Osseintegrated Implant in Pedlar J., 2001, Oral and Maxillofacial Surgery. Edinberg. Churchill Livingstone.
4. Cochran DL. 2008. Inflammation and bone loss in periodontal disease. J Periodontal, 79(8): 1569-76.
5. Sfeir C, Ho L, Doll BA, Azari K, Hollinger JO. 2005. Fractur Repair. Humana Press Inc.: 44-21.
6. Marie PJ. 2003. Fibroblast Growth Factor Signaling Controlling Osteoblast Differentiation. PubMed NCBI, 316: 32-23.
7. Ferdiansyah, Rushadi D, Rantam F A, Aulani'am. 2011. Regenerasi pada Massive Bone Defect dengan Bovine Hydroxyapatite sebagai Scaffold Mesenchymal Stem Cell. JBP, 13(3): 195-179.
8. Hardhani PR, Lastianny SP, Herawati D. 2013. Pengaruh Penambalan platetlet-rich plasma pada Cangkuk Tulang terhadap Kadar Osteocalcin Cairan Sulkus gingival pada Terapi Poket Infraboni. Jurnal PDGI, 62: 82-75.
9. Jeong I, Yu H, Kim M, Jang H, K H, 2010. FGF2-Adsorbed Macroporous Hydroxyapatite Bone Granules Stimulate In Vitro Osteoblastic Gene Expression and Differentiation. J Mater Sci: Mater Med, 21: 1342-1335.
10. Yun R Y *et al.*, 2010. Fibroblast Growth Factor: Biology, Function, and Application for Tissue Regeneration. Journal of Tissue Engineering. Article ID 218142. P. 18-1.
11. Rasjad C. 2008. Pengantar Ilmu Bedah Ortopedi. Jakarta: PT Yarsif Watampone H. 367-364.

12. Zhang X, Awad HA, O'Keefe RJ, Guldberg RE, Schwartz EM. 2008. A Perspective: Engineering Periosteum for Structural Bone Graft Healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 466(8): 406-365.
13. Slutsky DJ, Herman M. 2005. Rehabilitation of Distal Radius Fractures: A Biomechanical Guide. *Hand Clin* 21: 455-68.
14. Schwartz Z. 2001. Tissue Banking of Bone Allograft Used in Periodontal Regeneration. *Journal Periodontal*, (72): 834-8.
15. Hung NN. 2012. Basic Knowledge of Bone Grafting. *Pediatric Orthopaedic Journal*. Available From <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/33456.pdf>. Diakses 14 April 2015.
16. Ichsan MZ. 2011. Hidroksiapatit. Available from http://skp.unair.ac.id/repository/webpdf/web_hidroksiapatit_MIRANDA_ZAWAZI_ICHSAN.pdf. Diakses 9 Maret 2015.
17. Nandi S K, Roy S, Kundu B, Basu D, Mukherjee P. 2010. Orthopaedic Applications of /bonegraft and Graft substitutes: A Review. *Indian Journal Medicine*, 132: 30-15.
18. Putri AKN, Ulfah N, dan Bargowo L. 2013. Efek Angiogenesis pada Proses Regenerasi Jaringan Tulang Terhadap Aplikasi Serbuk Natural Hidroksiapatit Kitosan Konsentrasi 30:70 dan 70:30. *Periodontic Jurnal*, 5(1): 25-19.
19. Micelli C. 2015. Efektivitas Kombinasi Pemberian Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) dan Aplikasi Hidroksiapatit Terhadap Ekspresi Osteokalsin pada Proses Penyembuhan Tulang. Skripsi. Universitas Hangtuah Surabaya.
20. Weiss LA, Connor EB, Mu'hlen DV. 2005. Ratio of n-6 to n-3 Acids and Bone Adults: the Rancho Bernardo Study. Fatty Acid and Bone Mineral Density. *Am J Clin Nutr.*, 81(4): 934-8.
21. Lawrence T. 2009. The Nuclear Factor NF- κ B Pathways in Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspect Biol.*, 1(6):a001651. doi: 10.1101/cshperspect.a001651.
22. Mahrus, Sumitro SB, Widodo N, Sartimbul A. 2012. The Association Between Genetic Variations and Omega-3 Production on *Sardinella* lemuru in Lombok Strait. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 1(6): 16-12.
23. Saputra D R, Huda A M, Setyorini D Y, Hakam M. 2015. Potensi Minyak Asam Lemak Omega-3 Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) Sebagai Pencegah dan Terapi Alternatif Osteoarthritis pada Wanita Pasca-Menopause. *BIMKGI*, 3(1): 42-31.
24. Purnomo S. 2015. Efektivitas Kombinasi Pemberian Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) dan Aplikasi Hidroksiapatit Terhadap Jumlah Pembuluh Darah pada Proses Penyembuhan Tulang. Skripsi. Universitas Hangtuah Surabaya.
25. Ahmadi KGS, Wakyu M. 2007. Aktivasi Kimiawi Zeolit Alam Untuk Pemurnian Minyak Ikan dari Hasil Sampingan Penepungan Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*). *Jurnal Teknologi Pertanian*, 8(2): 4-3.
26. Harris WS. 2004. Fish Oil Supplementation: Evidence for Health Benefits. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 71(3): 221-208.
27. Fleckhell, Paul. 2009. *Laboratory Animal Anesthesia Edisi Ketiga*. Elsevier. P. 187.
28. Rokn AR, Khodadoostan MA, Ghahroudi AARR, Motahhary P, Fard MJK, Bruyn HD, Afzalifar R, Soolar E, Soolari A. 2011. Bone Formation with Two Types of Grafting Materials : A Histologic and Histomorphometric Study. *Open Dent. Journal*, 5: 104-96.
29. Kopschina MI, Marinowic DR, Klein CP, Araujo CA, Freitas TA, Hoff G, and Silva JB. 2012. Effect of Bone Marrow Mononuclear Cells Plus Platelet-rich Plasma in Femoral Bone Repair in Rats. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, Sao Paulo, 49(3): 184-179.
30. Schmidlin PR, Nicholls F, Kruse A, Zwahlen RA, Weber FE. 2011. Evaluation of In Situ Hardening Calcium Phosphate Bone Graft Substitutes. *Clin Oral Implants Res.* 24(2): 149-57.
31. Hartono, Puji. 2013. Pengaruh Pemberian Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) pada Remodeling Alveolaris Gigi Kelinci New Zealand White yang Digerakkan Secara Ortodontik (Kajian pada Interleukin-1, Tumot Nekrosis Faktor- α , Ekspresi Osteopontin dan Alkaline Fosfatase). Disertasi, Universitas Gadjah Mada. H. 51.
32. Parmana A D, Sumaryono B, Rahayu R P. 2014. Ekspresi FGF-2, Jumlah Sel Fibroblas dan Pembuluh Darah Kepiler Setelah Pemberian Gel Spirulina (Blue-green Algae) pada Luka Pasca Pencabutan Gigi Marmut (*Cavia Cabaya*). *Oral Pathology & Maxillofacial Dental Journal*, 1(1): 6-1.

33. Asakura T, Nagano A, Tanioka Y, Sakurai N, Sezutsu H, Kiba H. 2011. Bone Regeneration on The Epicondyle of The Femur Supported by Silk Fibroin-based Scaffold : A Model System for Dental Surgery. *Journal of Insect Biotechnology and Sericoloy* 80, 30-25.
34. Hughes RN. 2007. Sex Does Matter: Comments on The Prevalence Of Male-Only Investigations Of Drug Effects On Rodent Behaviour. *Behavioural Pharmacology*. Vol 18:583-589.
35. Sharon RS. 2011. Effect of Soybean Extract After Tooth extraction on osteoblast Number. *Dent.j*, 44(2): 116-111.
36. Kalfas IH. 2001. Principles of Bone Healing. *Neurosurg Focus*, 10: 4-1.
37. Larjava H. 2012. Oral Wound Healing: Cell Biology and Clinical Management. Singapore: Markono Print Media. P. 184-175, 65-62.
38. Kumar, Vinay et al. 2009. Robins & contran Dasar Patologis Penyakit. Edisi 7, Jakarta: EGC. H. 103-101, 99, 93.
39. Dielgelmann RF, Evans MC. 2004. Wound Healing: an Overview Of Acute, Fibrotic And Delayed.
40. Basyar E. 2004. Pengaruh Stimulus elektrik Kontinyu dan Intermiten pada Penyembuhan Fraktur. Bagian Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. H. 7-5.
41. Kanczler JM dan Oreffo ROC. 2008. Osteogenesis and Angiogenesis: The Potential For Engineering Bone. *European Cells and Materials*, 15: 114-100.
42. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. 2003. Biokimia Harper, Ed. 25. Jakarta: EGC
43. Scaglione S, Giovanni P, Bianchini P, Sandri M, Marotta R, Firpo G, Valbusa U, Tampieri A, Diaspro A, Bianco P, Quarto R. 2012. Order Versus Disorder: In Vivo Bone Formation within Osteoconductive Scaffolds. *Scientific Reports*, 2(274): 6-1.
44. Yilgor P, Tuzlakoglu K, Reis RL, Hasirci N, Hasirci V. 2009. Incorporation of A Sequential BMP-2/BMP-7 Delivery System Into Chitosan-Based Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Biomaterial*, 30(21): 3551-9.
45. Estiasih, T. 2009. Minyak Ikan Teknologi dan Penerapannya untuk Pangan dan Kesehatan. Graha Ilmu. Yogyakarta.
46. Wildan F. 2000. Perbandingan Kandungan Omega-3 dan Omega-6 dalam Minyak Ikan Lemuru dengan Teknik Kromatografi. *Temu Teknis Fungsional dan Penelitian*. H. 58.
47. Purnomo S. 2015. Efektivitas Kombinasi Pemberian Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) dan Aplikasi Hidroksiapatit Terhadap Jumlah Osteoblas pada *bone Healing*. Skripsi. Universitas Hangtuah Surabaya. H. 3-1.
48. Arita M, Yoshida M, Hong S, Tjonahen E, Glickman J N, Blumberg R S, Serhan C N, Petasis N A. 2005. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *The National Academy of Sciences of the USA*, 102(21): 7671-767.