

# DISERTASI

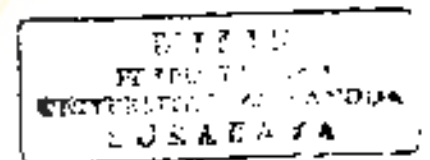
## STRES OKSIDATIF SEBAGAI FAKTOR PENYEBAB DALAM PATOGENESIS KERUSAKAN TULANG RAWAN SENDI OSTEOARTRITIS SEKUNDER AKIBAT GANGGUAN BIOMEKANIK INSTABILITAS

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

D2  
K 09/04  
i hid  
s



MOHAMAD HIDAYAT



PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2003

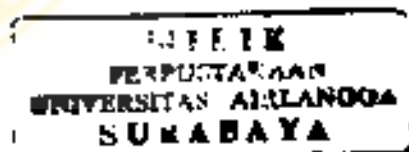
**STRES OKSIDATIF SEBAGAI FAKTOR PENYEBAB DALAM  
PATOGENESIS KERUSAKAN TULANG RAWAN SENDI  
OSTEOARTRITIS SEKUNDER AKIBAT GANGGUAN  
BIOMEKANIK INSTABILITAS**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**

Dis  
K 09/0A  
Hid  
S

**DISERTASI**

Untuk memperoleh Gelar Doktor  
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran  
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga  
Telah dipertahankan di hadapan  
Panitia Ujian Doktor Terbuka  
Pada hari : Kamis  
Tanggal : 17 Juni 2003  
Pukul 10.00 WIB



Oleh :

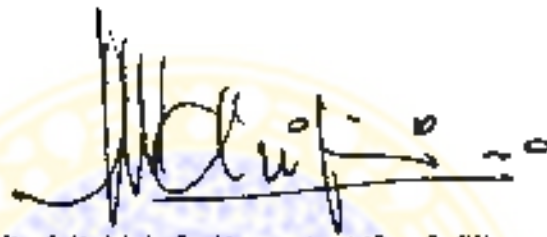
**MOHAMAD HIDAYAT**  
NIM. 099813195 D

**Lembar Pengesahan**

**DISERTASI INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL 12 MARET 2003**

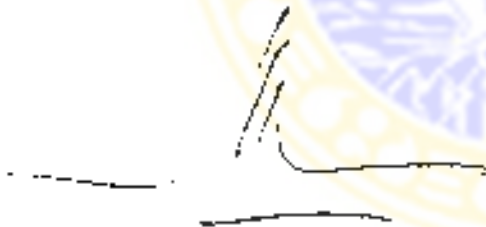
**Oleh**

**Promotor**



**Prof. D. Maimun Husein, dr., MSc., SpFK**

**Ko-Promotor I**



**Prof. H. Soelarto Reksupradjo, dr., SpB, SpHC, FICS**

**Ko-Promotor II**



**Prof. Dr. H. Handono Kalim, dr., SpPD, K.R**

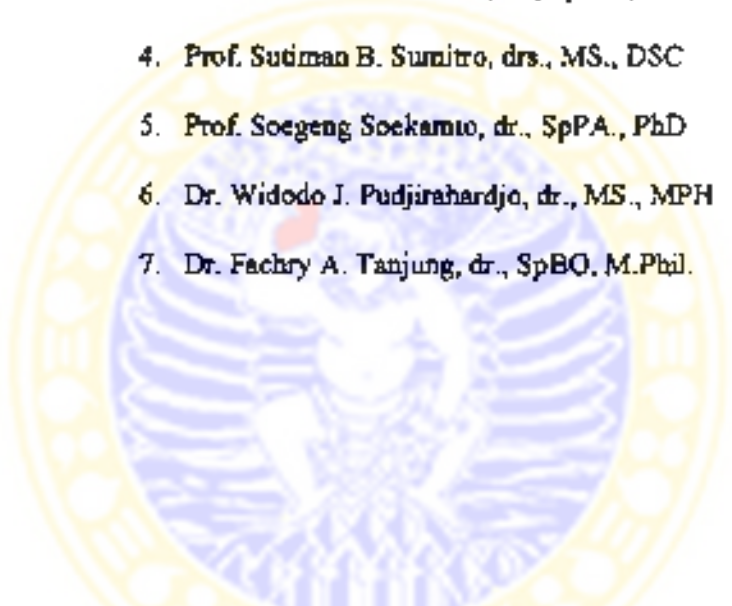
Telah diuji pada Ujian Tahap I

Tanggal, 27 Pebruari 2003

---

**PANTIA PENGUJI DISERTASI**

- Ketua** : Prof. Dr. Djoko Rushadi, dr., SpB., SpBO
- Anggota** :
1. Prof. D. Ma'rifin Husin, dr., MSc., SpFK
  2. Prof. H. Soelarto Reksoprodjo, dr., SpB., SpBO
  3. Prof. Dr. Handono Kalim, dr., SpPD., KR
  4. Prof. Sutiman B. Sunitro, drs., MS., DSC
  5. Prof. Soegeng Soekamio, dr., SpPA., PhD
  6. Dr. Widodo J. Pudjirahardjo, dr., MS., MPH
  7. Dr. Fachry A. Tanjung, dr., SpBO, M.Phil.



Ditetapkan dengan Surat Keputusan Rektor  
Universitas Airlangga  
Nomor : 1680/J03/PP/2003  
Tanggal : 07 Maret 2003

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya yang dilimpahkan kepada saya, sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini.

Terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Prof. D.Ma'rifin Husin, dr., MSc., SpFK guru besar di bidang Farmakologi, bahwa selaku Promotor beliau telah menghantarkan saya melewati jenjang pendidikan tertinggi. Beliau senantiasa menyediakan waktu untuk membimbing dengan penuh kesabaran, penuh perhatian dan senantiasa mendorong semangat serta meningkatkan rasa percaya diri saya. Dari beliau saya mendapat wawasan keilmuan bagaimana seharusnya seorang ilmuwan bersikap dan mengamalkan ilmunya sesuai dengan tanggung jawabnya kepada Allah SWT. Semoga Allah SWT. senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya serta melipatgandakan pahala-Nya kepada beliau.

Terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya juga saya sampaikan kepada Prof. H.Soelarto Reksoprodjo, dr., SpB., SpBO., guru besar di bidang Ilmu Bedah Orthopedi. Selaku Ko-Promotor beliau senantiasa menyediakan waktu untuk berkonsultasi dan dengan penuh kesabaran mendorong saya untuk senantiasa berpandangan ke depan mengikuti perkembangan ilmu. Semoga Allah SWT membalasnya dengan pahala yang berlipat ganda.

Juga terima kasih dan penghargaan yang setulus-tulusnya saya sampaikan kepada Prof. Dr. H.Handono Kalim, dr., SpPD., KR., selaku Ko-Promotor yang telah membimbing saya sampai selesainya disertasi. Beliau senantiasa memberikan masukan-masukan yang sangat berarti dalam substansi ilmu yang saya tekuni. Semoga Allah SWT. membalasnya dengan pahala yang berlipat ganda.

Dengan selesainya disertasi ini, perkuatlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr.Med. Puruhito, dr., SpBTKV, serta mantan Rektor Prof. H.Soedarto, dr., DTM&H, PhD., atas kesempatan bagi saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Direktur Program Pasca sarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. H.Muh Amin, dr., SpP dan mantan Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Soedijono, dr., SpTHT., yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Rasa terima kasih juga saya sampaikan kepada Prof. Dr. Hj.Juliati Hood Alsegaff, dr., MS., SpPA., FIAC., sebagai Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga, atas nasehat dan perhatian serta dorongan yang diberikan kepada saya selama saya mengikuti Program Doktor.

Ungkapan rasa terima kasih saya sampaikan kepada Rektor Universitas Brawijaya Prof. Dr. H.Bambang Guritno, Ir. dan mantan Rektor Universitas Brawijaya Prof.Dr.H.Eka Afnan Troena., SE. serta Prof. H.M. Hasyim Baisoeni.,Drs. atas ijin yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Haryanto,dr., MSPH., dan mantan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Achmad Rudianto, dr., SpPD., KE., saya ucapkan terima kasih atas dorongannya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Ungkapan rasa terima kasih saya sampaikan kepada Kepala Laboratorium Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya / RSUD Saiful Anwar, H.Rochmad Idjro'i, dr., SpB., dan mantan Kepala Laboratorium Ilmu Bedah FKUB/RSSA H. Martopo Marnadi , dr., SpB., saya sampaikan terima kasih yang sedalam-dalamnya atas segala perhatian dan dorongan semangat selama saya mengikuti pendidikan Program Doktor.

Ungkapan rasa terima kasih yang tak terhingga saya sampaikan kepada Kepala Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya Prof. Dr.H. Mulyohadi Ali, dr., SpFK atas ijin yang diberikan kepada saya untuk menggunakan fasilitas laboratorium yang beliau pimpin.



Rasa terima kasih yang tak terhingga dan setulus-tulusnya saya sampaikan juga kepada sejawat di Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya: Dr. I.G.Ketut Muliarta, dr., Hj. Loeki Enggar Fitri ,dr., MKes , Nur Permatasari drg., Aulani'am. drh.DES, Wihi Riawan, SSL, dan anggota staf biomedik lainnya, sdr Pujani A.MD, sdr Afida, sdr.Bambang Eko Mulyono yang dengan penuh kesabaran, ketekunan yang luar biasa, serta dengan ketrampilannya di bidang pekerjaan laboratorium telah begitu banyak membantu saya mulai dari persiapan segala keperluan penelitian sampai penyelesaian pekerjaan penelitian untuk disertasi saya. Sekaligus rasa terima kasih saya ucapkan kepada sdr. Sugeng Haryono dan rekan, selaku perawat bedah dan juga kepada anggota staf anestesi yang sudah mendampingi dan membantu saya menyelesaikan penelitian yang saya lakukan. Juga kepada Dr. Fdi Wijayanto, dr SpPK dan Haryo Trianto Drajad drg. yang telah memberikan bantuannya, saya ucapkan terima kasih

Kepada Prof. H. Sutirman Bambang Sumitro., Drs., MS. DSc, saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas dorongan, bantuannya dan masukan-masukannya selama saya melakukan penelitian. Juga rasa terima kasih saya sampaikan kepada Prof. Dr.Loekito Adi Soehono, Ir., M.Agr. Ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya saya sampaikan kepada Dr. Solimun , Drs., selaku konsultan metodologi dan statistik. yang telah dengan sabar banyak membantu dan memberikan masukan-masukan yang berkaitan dengan analisis data yang saya lakukan.

Kepada guru-guru saya sejak Sekolah Taman Kanak-kanak, sekolah Rakyat, Sekolah Menengah Pertama dan Sekolah menengah Atas, serta para dosen saya di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan guru-guru saya di Laboratorium Ilmu Bedah Umum dan Ilmu Bedah Orthopedi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, saya sampaikan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya atas didikan dan bimbingannya. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya

Ungkapan rasa terima kasih saya sampaikan kepada para dosen saya di program Pasca Sarjana Universitas Airlangga, Prof. Purnomo Suryohusodo, dr., Prof.

## RINGKASAN

Patogenesis terjadinya kerusakan tulang rawan sendi pada osteoarthritis disebabkan oleh multifaktor, telah diteliti oleh banyak peneliti. Faktor yang berperan dapat saling mempengaruhi satu sama lain atau bergantung satu kepada yang lain, berinteraksi menjadi suatu proses yang membuat perubahan pada komponen sendi antara lain tulang rawan. Perubahan tulang rawan sendi berupa degenerasi akibat kerusakan komponen tulang rawan, antara lain proteoglikan dan kolagen. Penyebab kerusakan tulang rawan dapat berupa bermacam bentuk pemicu yang berbeda, baik berupa rudapaksa, gangguan metabolik dan lain sebagainya. Salah satu bentuk penyebab atau pemicu adalah gangguan biomekanik dari sendi, berupa instabilitas, diskongruensi ataupun beban yang berlebihan. Gangguan biomekanik akan menimbulkan faktor yang menyebabkan terjadinya perubahan di dalam tulang rawan sendi. Faktor tersebut dapat berperan di dalam jalur enzimatik seperti halnya faktor enzim proteolitik metaloprotease, serin protease dan thiol protease, atau faktor nitrik oksid yang berperan di dalam jalur non enzimatik. Faktor sitokin yang memicu peradangan juga berperan di kedua jalur tersebut. Kemungkinan faktor lain ikut juga berperan di dalam patogenesis kerusakan tulang rawan sendi pada osteoarthritis yang disebabkan gangguan biomekanik instabilitas, seperti halnya stres oksidatif oleh karena radikal bebas oksigen. Hal ini mengingat pada penelitian *in vitro*, telah dibuktikan bahwa kondrosit memproduksi radikal bebas oksigen setelah diberikan lingkungan yang menyerupai keadaan hipoksia reperfusi. Penelitian ini dibuat untuk mengungkap peran stres oksidatif radikal bebas oksigen pada kerusakan komponen tulang rawan proteoglikan akibat gangguan biomekanik instabilitas.

Penelitian ini menggunakan metoda eksperimental laboratoris dengan memakai hewan coba kelinci atas dasar mudah dilakukan, mudah membuat persamaan jenis, umur, berat badan dan jenis kelamin hewan coba. Kesamaan dari derajat gangguan biomekanik instabilitas dilakukan dengan cara tindakan operasi yang sama, dan hewan coba kelinci merupakan hewan coba baku yang digunakan untuk eksperimen sendi osteoarthritis, dengan biaya yang memadai.

Derajat gangguan biomekanik instabilitas dikelompokkan dalam perlakuan kategori berat dengan melakukan operasi transeksi ligamentum *cruciatum anterior* digabung dengan tenektomi *medial*, kategori sedang dengan melakukan operasi tenektomi *medial* saja, sedangkan untuk kontrol digunakan *Sham operation*. Operasi dilakukan semua pada lutut kiri dibawah pembiusan umum dan mengikuti kaidah aseptis. Jumlah hewan coba dihitung berdasarkan rancang acak lengkap dan tiap kelompok perlakuan ditentukan 6 (enam) hewan coba kelinci jenis *New Zealand*. Hewan coba pasca operasi dimasukkan ke dalam kandang yang berukuran sama, dengan aktivitas normal, dikeluarkan dari kandang setiap hari selama 2-3 jam, dengan pemberian makanan serupa. Selang 8 (delapan) minggu pasca operasi pertama dilakukan operasi ulangan, mengambil tulang rawan sendi lutut kiri. Setiap tulang rawan diperiksa dalam beberapa variabel yaitu MDA (malondialdehid) dan SOD (supetoksid dismutase) mewakili stres oksidatif, iNOS mewakili nitrik oksid



dan GAG (glikosaminoglikan) mewakili proteoglikan. Pemeriksaan MDA dengan metoda asam thiobarbiturik, SOD dengan Oberley, GAG dengan DMMB (*dimethylmethylene blue*) dan imunohistokimia, dan iNOS dengan imunohistokimia. Hasil data dianalisis dengan perhitungan statistik ANOVA, korelasi dan analisis jalur.

Hasil analisis data menunjukkan terdapat perbedaan pengaruh gangguan biomekanik terhadap terjadinya stres oksidatif pada tulang rawan sendi yang disebabkan oleh radikal bebas oksigen. Terdapat hubungan antara stres oksidatif dengan kerusakan proteoglikan ( $r=0,585$ ,  $p=0,000$ ), dan dengan produksi iNOS ( $r=0,779$ ,  $p=0,000$ ). Terdapat hubungan erat antara iNOS sel dengan kerusakan proteoglikan ( $r=0,870$ ,  $p=0,000$ ). Pada analisis jalur yang sesuai konsep dan teori yang ada didapatkan data stres oksidatif secara tidak langsung merusak proteoglikan.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa stres oksidatif radikal bebas oksigen berperan (berkontribusi 1,27%, dan 42,54% bersama dengan iNOS) di dalam proses kerusakan proteoglikan, tetapi stres oksidatif radikal oksigen tidak berperan langsung. Terjadinya stres oksidatif diduga berasal dari proses hipoksi reperfusi akibat gangguan biomekanik instabilitas. Radikal bebas oksigen yang menyebabkan stres oksidatif lipid peroksidasi mengaktivasi iNOS dan sitokin, yang akan menghasilkan  $NO^+$  dan enzim proteolitik. Kedua substansi tersebut bersama dengan peroksidasi lemak merusak komponen tulang rawan sendi dan kondrosit. Keadaan itu akan menimbulkan degenerasi tulang rawan osteoartritis sekunder.

Hasil penelitian ini memberikan kontribusi di dalam khasanah ilmu pengetahuan tentang patogenesis kerusakan tulang rawan sendi osteoartritis yang disebabkan gangguan biomekanik instabilitas. Selain itu bermanfaat langsung dalam pengelolaan penderita osteoartritis sekunder untuk pemakaian anti oksidan.

Kata kunci : osteoartritis, stres oksidatif, instabilitas sendi.

## ABSTRACT

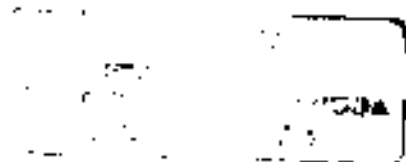
Pathophysiology of osteoarthritis had been studied and described by many authors. Mechanical overload and instability is considered to be one of the main factors in the induction of osteoarthritic degeneration of articular cartilage. Nitric oxide, cytokines and metalloproteases had been known as important factors in degradation of cartilage. Since reactive oxygen species (ROS) have been shown produced by chondrocytes, which is induced by PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), *in vitro*, this experimental study was performed to quantify *in vivo* the amount of oxidative stress in knee cartilage of rabbit undergone meniscectomy and combination with anterior cruciate ligament transaction.

Eighteen mature New Zealand rabbits were assigned into three groups. First six rabbits were performed medial meniscectomy combined with anterior cruciate ligament transaction (AM group), second group were performed medial meniscectomy alone (M group), and the third group with Sham operation (K group), involving all the left knees. The knees were harvested within eight weeks, and the cartilage were examined for malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) for oxidative stress, and glycosaminoglycan (GAG) to asses the cartilage degradation, and iNOS (inducible nitric oxide synthase) to measure the nitric oxide production. The laboratory examination were performed using thiobarbituric test for MDA, Oberley method for SOD using spectrophotometry, DMMB (dimethylmethylene blue) for measuring GAG, immuno histochemical study for iNOS and GAG.

Significant higher concentrations of MDA, iNOS, GAG, and lower SOD were demonstrated in two operated groups comparing control group. There was positive correlation between MDA and GAG ( $r=0,585$ ,  $p=0,011$ ), and there were positive strong correlation between iNOS (sel and matrix) and GAG ( $r=0,870$ ,  $p=0,000$ ). Path analysis showed MDA had no direct effect into GAG. Histological examination using anti Caspase 3, and HE (Hematoxylin Eosin), showed increasing amount of apoptosis and necrosis of chondrocytes in AM and M group.

This study indicate that the ROS produced during oxidative stress which caused by biomechanical alteration of joint, were involved in the degradation of articular cartilage. It is likely that ROS arise from hypoxic reperfusion injury caused by biomechanical alteration on the cartilage. These findings also indicate that oxidative stress by ROS may cause cartilage degradation indirectly.

**Keywords:** Osteoarthritis, oxidative stress, joint instability.



## DAFTAR ISI

Halaman Judul .....	vi
Lembar Pengesahan .....	vii
UCAPAN TERIMA KASIH .....	v
RINGKASAN .....	x
ABSTRACT .....	xii
DAFTAR ISI .....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xvi
DAFTAR TABEL .....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xix
DAFTAR SINGKATAN .....	xx
DAFTAR ISTILAH .....	xxiii
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang Masalah. ....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	11
1.3 Tujuan Penelitian .....	11
1.3.1 Umum .....	11
1.3.2 Khusus .....	12
1.4 Manfaat Penelitian .....	12
1.4.1 Teoritis .....	12
1.4.2 Praktis .....	13
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	14
2.1 Struktur dan Fungsi Tulang Rawan Sendi .....	14
2.2 Epidemiologi dan Patologi Osteoarthritis .....	28
2.3 Metabolisme Tulang Rawan Sendi .....	31
2.4 Patogenesis Osteoarthritis .....	36
2.5 Peran Gangguan Biomekanik Sendi Diarthrodial dalam patogenesis OA .....	42
2.6 Radikal Hidroksil sebagai Radikal Bebas Oksigen ( <i>Reactive Oxygen         Species - ROS</i> ) terbentuk pada stres oksidatif .....	46
2.7 Lipid peroksidasi menggambarkan stres oksidatif .....	48
2.8 Penelitian kerusakan tulang rawan dengan hewan coba .....	52
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS .....	58
3.1 Kerangka Konsep .....	58
3.1.1 Gangguan Biomekanik Sendi dan Kerusakan ECM .....	58
3.1.2 Gangguan biomekanik stabilitas menimbulkan terjadinya stres oksidatif dan kerusakan tulang rawan sendi .....	62
3.1.3 Hubungan stres instabilitas, radikal hidroksil, nitrik oksid dan kerusakan ECM .....	64
3.1.4 Kerusakan Proteoglikan menyebabkan Osteoarthritis .....	66
3.2 Hipotesis .....	72
BAB 4 METODE PENELITIAN .....	73

4.1 Rancangan Penelitian .....	73
4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	75
4.3 Sampel dan Replikasi .....	75
4.4 Variabel penelitian dan definisi operasional variabel .....	77
4.4.1 Variabel Bebas .....	78
4.4.2 Variabel Kendali .....	79
4.4.3 Variabel Tergantung .....	80
4.5 Bahan Penelitian .....	81
4.6 Instrumen Penelitian .....	81
4.7 Prosedur Penelitian .....	83
4.7.1 Perlakuan untuk Model Osteoarthritis .....	83
4.7.2 Pasca Perlakuan .....	86
4.7.3 Pengambilan Sampel Spesimen .....	87
4.7.4 Pemeriksaan MDA (Malondialdehid) dengan metoda assay (Tes Asam Thio Barbiturik ) .....	88
4.7.5 Pemeriksaan SOD dengan metoda Oberley (1985) .....	88
4.7.6 Pemeriksaan Glikosaminoglikan (GAG) dengan imuno- histokimia metoda peroksidase dengan <i>counterstaining</i> Mayer Hematoxylin, antibodi anti GAG .....	89
4.7.7 Pemeriksaan Glikosaminoglikan (GAG) dengan DMMB ( <i>dimethylmethylene blue</i> ) .....	90
4.7.8 Pemeriksaan kadar iNOS dengan imunohistokimia metoda peroksidase <i>counterstaining Mayer Hematoxylin</i> , antibodi anti iNOS .....	91
4.8 Metoda Analisis Data .....	92
<b>BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>95</b>
5.1 Analisis patologik dan histopatologik .....	96
5.2 Analisis diskriptif data hasil penelitian .....	101
5.3 Pemeriksaan Asumsi .....	102
5.4 Pengaruh Gangguan Biomekanik terhadap MDA, SOD, GAG dan iNOS .....	102
5.4.1 Variabel MDA .....	103
5.4.2 Variabel SOD .....	104
5.4.3 Variabel iNOS .....	105
5.4.4 Variabel GAG .....	113
5.5 Hubungan antara MDA dengan GAG dan iNOS .....	118
5.6 Jalur hubungan Gangguan Biomekanik ke kerusakan Tulang Rawan .....	120
5.6.1 Model I .....	121
5.6.2 Model II .....	122
5.6.3 Model III .....	124
5.6.4 Model IV .....	126
5.6.5 Model V .....	127
5.6.6 Model VI .....	129
<b>BAB 6 PEMBAHASAN .....</b>	<b>138</b>



6.1 Derajat gangguan biomekanik instabilitas berpengaruh terhadap kerusakan proteoglikan .....	138
6.2 Derajat instabilitas sendi berpengaruh terhadap derajat stres oksidatif pada tulang rawan sendi.....	144
6.3 Stres oksidatif merusak proteoglikan tulang rawan sendi <i>in vivo</i> .....	149
6.4 Mekanisme peran stres oksidatif terhadap kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi dan mekanisme pengaruh gangguan biomekanik terhadap kerusakan tulang rawan.....	152
6.5 Perluasan kerusakan tulang rawan sendi melalui ekspresi iNOS .....	157
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN .....	160
7.1 Kesimpulan .....	160
7.2 Saran .....	163
DAFTAR PUSTAKA.....	164
DAFTAR LAMPIRAN .....	172





## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Penampang zona tulang rawan sendi.....	15
Gambar 2.2	Aliran ion dan medan magnet ECM pada saat beban.....	18
Gambar 2.3	Anyaman kolagen dan proteoglikan.....	20
Gambar 2.4	Pelepasan fragmen GAG akibat kerusakan proteoglikan.....	21
Gambar 2.5	Bentuk Kolagen.....	22
Gambar 2.6	Relaksasi Stres tulang rawan sendi.....	24
Gambar 2.7	Perubahan ECM pada stres gesekan.....	26
Gambar 2.8	Perubahan ECM pada stres tekanan.....	26
Gambar 3.1	Bagan gangguan biomekanik instabilitas menimbulkan kerusakan ECM.....	61
Gambar 3.2	Alur konsep stres instabilitas menyebabkan kerusakan proteoglikan.....	69
Gambar 3.3	Iskemia/hipoksi reperfusi <i>injury</i> .....	70
Gambar 3.4	Kerangka Konsep Penelitian : Hubungan stres instabilitas, OH <sup>-</sup> (stres oksidatif), NO <sup>-</sup> dan kerusakan ECM.....	71
Gambar 4.1	Rancangan Penelitian.....	74
Gambar 4.2	Menisektomi <i>medial</i> lutut kiri hewan coba kelinci.....	85
Gambar 4.3	Transeksi ACL.....	86
Gambar 4.4	Model Hipotetik untuk Pengujian Hipotesis 4 dan 5.....	94
Gambar 5.1	Permukaan tulang rawan sendi perlakuan AM.....	96
Gambar 5.2	Pengecatan sediaan M dengan imunohistokimia terhadap Caspase 3 pembesaran 200 X.....	97
Gambar 5.3	Sediaan M dengan pengecatan imunohistokimia poliklonal antibodi anti <i>rabbit</i> Caspase 3, pembesaran 1000X.....	98
Gambar 5.4	Sediaan AM dengan pengecatan HE, pembesaran 200X.....	99
Gambar 5.5	Sediaan AM dengan pengecatan HE pembesaran 1000X.....	100
Gambar 5.6	Kadar MDA pada setiap perlakuan.....	104
Gambar 5.7	Kadar SOD pada setiap perlakuan.....	105
Gambar 5.8	Densitas iNOS sel pada setiap perlakuan.....	106
Gambar 5.9	Densitas iNOS matriks pada setiap perlakuan.....	106
Gambar 5.10	Sediaan tulang rawan sendi pada kontrol (iNOS).....	108
Gambar 5.11	Sediaan tulang rawan sendi dengan perlakuan kontrol (iNOS).....	109
Gambar 5.12	Sediaan tulang rawan sendi dengan perlakuan menisektomi (iNOS).....	110
Gambar 5.13	Sediaan tulang rawan sendi pada perlakuan transeksi ACL + menisektomi (iNOS).....	111
Gambar 5.14	Sediaan tulang rawan sendi pada perlakuan transeksi ACL + menisektomi (iNOS).....	112
Gambar 5.15	Kadar GAG pada setiap perlakuan.....	113
Gambar 5.16	Sediaan tulang rawan sendi pada perlakuan kontrol (GAG).....	114

Gambar 5.17	Sediaan tulang rawan sendi pada perlakuan menisektomi (GAG).....	115
Gambar 5.18	Sediaan tulang rawan sendi pada perlakuan transeksi ACL + menisektomi (GAG).....	116
Gambar 5.19	Sediaan tulang rawan sendi pada perlakuan transeksi ACL + menisektomi (GAG).....	117
Gambar 5.20	Model V1au.....	131
Gambar 5.21	Model V1as.....	132
Gambar 5.22	Model V1bu.....	134
Gambar 5.23	Model V1bs.....	135



**DAFTAR TABEL.**


Tabel 4.1	ANOVA RAL (Rancang Acak Lengkap).....	76
Tabel 4.2	Tahap Randomisasi.....	77
Tabel 5.1	Nilai <i>mean</i> dan standar deviasi.....	101
Tabel 5.2	Nilai <i>mean</i> , standar deviasi dan nilai <i>p</i> .....	103
Tabel 5.3	Koefisien Korelasi antara MDA, iNOS dan GAG.....	119



## DAFTAR SINGKATAN



ACL	: Anterior cruciate ligament
ACLT	: Anterior cruciate ligament transection
AEC	: Aminoethyl Carbazole
ANOVA	: Analysis of Variance
ATP	: Adenosine Triphosphate
bFGF	: Basic Fibroblast Growth Factor
BNJ	: Beda nyata jujur
COL2A1	: Gen kolagen
CuZnSOD	: Copper-zinc-superoxide dismutase
db-galat	: Derajat bebas galat
df-error	: Degrees of freedom error
DMMB	: Dimethylmethylene blue
DMSO	: Dimethylsulphoxide
DNA	: Deoxyribo Nucleic Acid
ECM	: Extra Cellular Matrix
EDTA	: Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
GAG	: Glycosaminoglican
GSH	: Glutathion



<b>GuHCL4M</b>	<b>: Guanidin HCL 4 mollar</b>
<b>HA</b>	<b>: Hyaluronic acid</b>
<b>HE</b>	<b>: Hematoxylin Eosin</b>
<b>IGF-1</b>	<b>: Insulin Like Growth Factor-1</b>
<b>IgG</b>	<b>: Immunoglobulin-G</b>
<b>IL-1</b>	<b>: Interleukin-1</b>
<b>IL-4</b>	<b>: Interleukin-4</b>
<b>iNOS</b>	<b>: Inducible Nitric Oxide synthase</b>
<b>LIF</b>	<b>: Leukemic Inhibitory Factor</b>
<b>LOO•</b>	<b>: Lipid Peroxy radical</b>
<b>HSD</b>	<b>: Honestly Significant Difference</b>
<b>mAb</b>	<b>: Monoclonal Antibody</b>
<b>MDA</b>	<b>: Malondialdehyde</b>
<b>MM</b>	<b>: Medial menisectomy</b>
<b>MMP</b>	<b>: Metalloprotease</b>
<b>MnSOD</b>	<b>: Manganase-superoxide dismutase</b>
<b>mRNA</b>	<b>: Messenger Ribose Nucleic Acid</b>
<b>MT-MMP</b>	<b>: Membrane –type metalloprotease</b>
<b>NBT</b>	<b>: Nitro Blue Tetrazolium</b>
<b>NO•</b>	<b>: Nitric Oxide</b>
<b>OA</b>	<b>: Osteoarthritis</b>
<b>ODFR</b>	<b>: Oxygen derived free radical</b>



<b>OH•</b>	: <b>Radikal Hidroksi</b>
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	: <b>Peroksi Nitrit</b>
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: <b>Superoksid radikal</b>
<b>PBS</b>	: <b>Phosphate Buffer Saline</b>
<b>PDGF</b>	: <b>Platelet derived growth factor</b>
<b>PG</b>	: <b>Proteoglikan</b>
<b>PKC</b>	: <b>Protein Kinase-C</b>
<b>PMA</b>	: <b>Phorbol 12-Myristate 13-acetate</b>
<b>pO<sub>2</sub></b>	: <b>Oxygen tension</b>
<b>PUFA</b>	: <b>Polyunsaturated fatty acid</b>
<b>pAb</b>	: <b>Polyclonal Antibody</b>
<b>RAL</b>	: <b>Rancangan Acak Lengkap</b>
<b>RCD</b>	: <b>Randomize Completely Design</b>
<b>ROS</b>	: <b>Reactive Oxygen Species</b>
<b>SOD</b>	: <b>Superoxide Dismutase</b>
<b>TNF-α</b>	: <b>Tumor Necrosis Factor alfa</b>

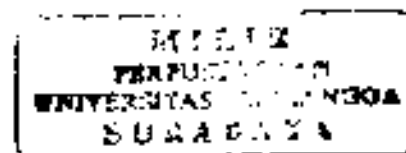


## DAFTAR ISTILAH

Apoptosis	Kematian sel yang terprogram dari dalam sel ditandai dengan kondensasi khromatin dan fragmentasi
Biomekanik	Efek dari mekanika atau energi dan gaya pada sistem biologik
Compressive stress	Tekanan tegak lurus dengan permukaan
Gangguan Biomekanik	Gangguan dari gerak dan perubahan bentuk/arah dari gaya dan momen yang terjadi pada jaringan muskuloskeletal.
Gaya fisik	Gaya yang ditimbulkan oleh gerak fisik tubuh.
Hukum Wolff	Terbentuknya jaringan lebih banyak pada daerah stres yang lebih besar
Hypoxic reperfusion injury	Keadaan hipoksi temporer yang diikuti reoksigenasi secara cepat menimbulkan senyawa radikal bebas
Kongruensi	Bentuk dan ukuran sama dari dua bidang permukaan tulang rawan sendi
Menisektomi	Pengangkatan jaringan meniskus
Osteoarthritis	Penyakit degenerasi sendi diarthrodial yang ditandai dengan kerusakan tulang rawan, pembentukan osteofit, penebalan kapsel, kista subkhondral, kadang disertai peradangan. Hiper atau hiposelularitas, pengelompokan kondrosit, fibrilasi, fisura permukaan tulang rawan, ekspresi iNOS meningkat, ekspresi GAG meningkat, duplikasi/penebalan tide mark, adanya peningkatan apoptosis dan nekrosis kondrosit
Osteofit	Tonjolan tulang yang terbentuk pada tepi permukaan tulang rawan sendi

**BAB 1****PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang Masalah**

Degenerasi tulang rawan sendi ditandai dengan terjadinya kerusakan pada komponen matriks ekstraseluler (ECM = *Extracellular Matrix*) yaitu proteoglikan dan kolagen, merupakan penyakit yang banyak dijumpai pada sendi manusia, dan dikenal sebagai penyakit Osteoarthritis (OA). Penanggulangan penyakit OA hingga saat ini belum mencapai taraf dapat menghentikan progresivitas penyakit dan menyembuhkan penyakit secara tuntas. Berbagai teori patogenesis terjadinya kerusakan matriks tulang rawan sendi yang bersifat multifaktor, dan beberapa faktor diantaranya masih belum diketahui dengan jelas. Beban berlebihan, stabilitas sendi terganggu yang dikategorikan sebagai gangguan biomekanik sendi, peradangan sendi, timbunan kristal didalam sendi, dan bermacam sebab lain dapat menyebabkan kerusakan matriks tulang rawan sendi, dan kematian sel kondrosit, yang berimplikasi terjadinya OA sekunder. Telah diketahui bahwa kondrosit mempunyai peran penting dalam mengatur dan memelihara metabolisme matriks ekstraseluler (Brandt KD and Mankin, 1993; Brandt KD et al., 1998; Pelletier JP et al., 1997; Pelletier JM, 1998). Sampai saat ini kondrosit diketahui mempunyai peran mensintesis komponen matriks ekstraseluler antara lain proteoglikan dan kolagen, tetapi juga mempunyai peran memproduksi enzim proteolitik dan radikal bebas nitrogen yaitu NO<sup>•</sup> (nitrik oksid) yang merusak matriks ekstraseluler. Sejauh mana pengaruh gangguan biomekanik



dapat menimbulkan stres oksidatif pada kondrosit dan mengakibatkan pembentukan radikal bebas oksigen pada OA sekunder, belum diketahui.

Salah satu tanda degenerasi tulang rawan sendi pada OA, adalah kerusakan dari matriks ekstraseluler (ECM) dimulai dengan terjadinya fibrilasi, fisura, dan ulserasi pada permukaan tulang rawan sendi, yang akhirnya sampai kepada keadaan menghilangnya seluruh lapisan permukaan tulang rawan. Hal tersebut diikuti oleh perubahan tulang subkondral dengan terbentuknya osteofit, dan penebalan dari lapisan tulang subkondral. Selain itu, perubahan lain yang ditemukan adalah peradangan pada lapisan sinovial, perubahan pada kapsul sendi dan otot perikapsuler.

"*Workshop on Etiopathogenesis of Osteoarthritis*", tahun 1986 merumuskan klasifikasi OA yang terdiri dari (1): OA primer atau Idiopatik, dimana latar belakang penyebab tidak diketahui dengan jelas. Golongan ini dibagi lagi dalam OA yang umum (*generalized*) dan OA yang terlokalisasi (*localized*) dan (2). OA sekunder, dimana latar belakang penyebab sebagai faktor predisposisi diketahui, yaitu antara lain: trauma, penyakit endokrin, penyakit metabolik, penyakit kongenital, dan penyakit infeksi. OA merupakan penyakit sendi dengan prevalensi cukup tinggi di beberapa daerah di Indonesia. Hal ini diungkapkan dalam penelitian Kalim H *et al.*, (1999a) yang menemukan prevalensi di Malang relatif lebih tinggi dibandingkan di Amerika.

Meskipun penyakit OA tidak membawa penderita ke arah keadaan yang membahayakan jiwa, namun dapat menghalangi aktivitas sehari-hari, sehingga

menurunkan kualitas hidup maupun produktivitas seseorang, khususnya pada penderita OA dalam usia produktif. OA yang terjadi pada usia produktif umumnya adalah akibat gangguan biomekanik berupa instabilitas dan inkongruensi sendi, yang disebabkan oleh karena trauma sebelumnya pada sendi.

Sampai saat ini penanggulangan penyakit OA terdiri dari beberapa macam tindakan, mulai dari yang sederhana yaitu menghindari faktor risiko antara lain menurunkan obesitas, menghindari aktivitas berlebihan, sampai pada tindakan yang invasif yaitu melakukan operasi penggantian sendi buatan (*total joint replacement*). Berbagai bentuk penanggulangan yang hakekatnya didasarkan pada pengurangan faktor risiko, menurunkan atau mengurangi keluhan, baik dengan obat antiinflamasi, analgesik, maupun dengan fisioterapi, dan beraneka macam tindakan bedah, yang berakhir dengan tindakan penggantian segala lapisan tulang rawan yang mengalami kerusakan dengan prosthesis. Usaha penanggulangan yang ditujukan terhadap proses patogenesis dari kerusakan matriks ekstraseluler tulang rawan sendi masih belum banyak dilakukan oleh karena proses patogenesis kerusakan ECM yang menyebabkan degradasi proteoglikan dan kolagen masih banyak belum diketahui.

Teori tentang patogenesis degradasi proteoglikan dan kolagen pada OA yang dianut sekarang, merupakan teori multifaktor. Faktor penting adalah melalui jalur enzimatik proteolitik, yaitu golongan metalloproteinase antara lain kolagenase, gelatinase dan stromelisin (Pelleier JM, 1998). Kondrosit mempunyai peran penting dalam menjaga homeostasis tulang rawan dari segala bentuk rangsangan dari luar, berupa inflamasi, respon imun dan gangguan biomekanik seperti instabilitas sendi.



Rangsang dari luar dapat merubah sifat kondrosit untuk mengeluarkan enzim proteolitik dengan perantaraan aktivator ataupun mediator seperti misalnya *interleukin 1* (IL-1) ataupun *tumor necrosis factor alfa* (TNF- $\alpha$ ). Gangguan biomekanik menimbulkan perubahan transduksi sinyal mekanoelektrokimiawi terhadap kondrosit melalui proses deformasi sel kondrosit, perubahan medan magnet akibat aliran ion di dalam ECM, maupun melalui proses *viscoelastic time dependent* dari ECM. Keadaan tersebut merupakan pemeran penting dalam merubah ekspresi sel kondrosit untuk mengeluarkan enzim degradatif dan meningkatkan ekspresi iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), yang meningkatkan pembentukan radikal bebas NO $\cdot$  (*nitric oxide*). Radikal bebas nitrogen NO $\cdot$  diketahui mempunyai peran dalam patogenesis kerusakan tulang rawan sendi, dan dikenal sebagai jalur non enzimatik (Mow VC *et al.*, 1995; Guilak F *et al.*, 1999).

Patofisiologi terjadinya degenerasi tulang rawan sendi yang ditandai dengan kerusakan ECM, pada saat ini para ahli masih memusatkan perhatian pada peran utama dari enzim proteolitik yaitu metalloprotease (MMP) dan *membrane-type metalloprotease* (MT-MMP), selain beberapa enzim proteolitik yang lain antara lain serine dan thiol protease (Roughley PJ, *et al.*, 1992; Brandt KD and Mankin HJ, 1993; Brandt KD *et al.*, 1998; Poole AR, 1995; Pelletier JP *et al.*, 1997; Pelletier JM, 1998).

Proses kerusakan tulang rawan sendi merupakan keadaan terjadinya ketidakseimbangan antara anabolisme dan katabolisme kolagen dan proteoglikan, dimana terdapat kecenderungan proses ke arah katabolisme yang utamanya diperankan oleh

enzim proteolitik (perusak protein) dan radikal bebas  $\text{NO}^*$ . Aktivitas biologik dari MMP secara fisiologik dikontrol oleh enzim *tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMP) yang menghambat fungsi MMP. Pada tulang rawan OA ditemukan aktivitas yang meningkat dari semua tipe enzim protease, baik MMP maupun MT-MMP.

Selain enzim MMP, dan MT-MMP, telah diketahui pula bahwa IL-1 dan TNF-alfa memicu dan menyebabkan timbulnya MMP dalam kondrosit. Selain itu juga memacu kerusakan dan menghambat sintesis ECM. Beberapa macam sitokin (*cytokine*), seperti LIF (*leukimia inhibitory factor*) mempunyai efek yang sama dengan IL-1, sedangkan IL-4, TGF-beta dan IGF-1 mempunyai peran sebaliknya yaitu menghambat kerusakan ECM. Sedangkan sitokin yang lain seperti misalnya bFGF dan PDGF tidak mempunyai peran penting dalam proses metabolisme tulang rawan (Poole AR, 1995).

Faktor gangguan mekanik (biomekanik) sendi telah diketahui dapat menyebabkan kerusakan tulang rawan dan berakhir menjadi OA sekunder. Mekanisme kerusakan belum diketahui dengan jelas. Diketahui bahwa beban kompresi secara siklik akan mendorong sintesis dan molekul matriks sedangkan beban kompresi statik akan menghambat sintesis dari proteoglikan. Kompresi matriks diperkirakan akan menurunkan pH periseluler, dan keadaan ini mengaktifkan *cytosine protease* dan MMP yang menyebabkan peningkatan degradasi dari ECM (Poole, AR, 1995).

Telah diketahui juga bahwa gangguan lingkungan mekanik, seperti stres, tekanan, gesekan, aliran cairan interstusiel, keadaan fisikokimia, dan efek

elektrokinetik, dapat menimbulkan perubahan yang berarti dan metabolisme tulang rawan sendi. Demikian pula bentuk sel dan organisasi dari sitoskeleton, diperkirakan sebagai faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas beberapa tipe sel termasuk kondrosit. Bagaimana penggunaan jalur mekanotransduksi yang digunakan oleh kondrosit mengontrol kejadian sintesis yang spesifik, termasuk ekspresi gen, secara rinci belum diketahui. Oleh karena itu penting untuk mengetahui bagaimana kejadian mekanik diterjemahkan menjadi sinyal biologik yang kemudian secara modulasi diubah menjadi ekspresi gen seluler, sintesis protein dan modifikasi *posttranslational* (Mow VC, *et al.*, 1995).

Lingkungan mekanik di sekitar kondrosit di dalam tulang rawan sendi berperan penting dalam pengaturan aktivitas metabolik kondrosit untuk menjaga homeostasis, dalam hal ini mempertahankan integritas dari ECM.

Beberapa penelitian *in vitro* mengemukakan kemungkinan adanya peran radikal bebas oksigen (*Reactive Oxygen Species*/ROS) yang diproduksi sendiri oleh kondrosit, dalam patogenesis kerusakan ECM tulang rawan sendi. ROS tersebut mempunyai efek langsung maupun tidak langsung dalam proses degradasi proteoglikan dan kolagen, meskipun belum diungkapkan secara jelas patobiologinya (Henrotin Y, *et al.*, 1993; Tilu ML, *et al.*, 1999).

$\text{OH}^{\bullet}$  (radikal hidroksi) adalah salah satu dari ROS yang terbentuk antara lain melalui hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), yang bereaksi dengan logam transisi  $\text{Fe}^{++}$  dan  $\text{Cu}^{+}$  melalui reaksi Fenton. Selain itu timbul dari reaksi Haber-Weiss, dimana anion superoksida ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ) atau ROS bereaksi dengan  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kane AH, 1996)

Beberapa peneliti telah membuktikan bahwa kondrosit dari tikus dan sapi merupakan sumber yang poten untuk menghasilkan ROS (Tiku ML, *et al.*, 1990; Iwasaki Y, *et al.*, 1990; Henrotin Y, *et al.*, 1992).

Henrotin Y, *et al.* (1992) menunjukkan bahwa secara *in vitro* kondrosit manusia mempunyai kemampuan untuk memproduksi  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  dan  $OH^\bullet$  radikal. Hasil serupa diperoleh dalam penelitian yang mengamati adanya oksigen aktif, khususnya  $OH^\bullet$  di dalam sel kondrosit dengan menggunakan *Electron Paramagnetic Resonance*, di mana kondrosit dirangsang dengan PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) sebagai reaksi anoksia-reoksigenasi (Tiku ML, *et al.*, 1990, Tiku ML, *et al.*, 1998). Seperti diketahui  $OH^\bullet$  timbul pada keadaan stres oksidatif di dalam proses *hypoxic-reperfusion injury* (Granger DN, *et al.*, 1986).

Blake DR, *et al.* (1989), memperkirakan adanya fenomena iskemia reperfusi pada sinovia sendi yang mengalami peradangan. Pada saat pergerakan sendi, tekanan di dalam sendi mencapai nilai ambang kritis, sehingga terjadi oklusi dari kapiler permukaan sinovial dengan konsekuensi terjadinya hipoksia. Pada saat istirahat terjadi reperfusi, mengakibatkan terbentuknya ROS aktif. Adanya aktivitas xantin dehidrogenase dalam sinovium manusia meskipun dalam konsentrasi rendah telah dideteksi (Allen RE, *et al.*, 1987), dan kenaikan konsentrasi dari hipo-xantin, xantin, dan urat dalam sinovium dan plasma pada arthritis rematoid dan OA mendukung hipotesis di atas (Gubjorson B, *et al.*, 1991). Fenomena hipoksia-reperfusi pada suatu jaringan/sel menyebabkan stres oksidatif dan dapat menimbulkan radikal bebas

dalam hal ini  $O_2^-$  dan  $OH^+$ , yang dapat merusak jaringan atau sel itu sendiri. (McCord., 1984; Granger DN, *et al.*, 1986).

Radikal bebas pada umumnya merusak proteoglikan melalui fragmentasi rantai polipeptida (Dean RT, *et al.*, 1984), dengan menghilangkan kemampuan sub unit proteoglikan berinteraksi dengan asam hialuronat (Roberts CR, *et al.*, 1989). Selain itu radikal bebas yang dibentuk oleh xantin oksidase dan xantin, menghambat sintesis DNA, proteoglikan, dan kolagen. (Zhu J, 1993). Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa ROS kemungkinan ikut berperan dalam patogenesis OA, meskipun peran biologiknya belum dijelaskan secara pasti (Tiku ML, *et al.* 1999).

Pada penelitian dengan hewan coba dan pengamatan pada manusia di klinik didapatkan fakta bahwa transeksi ACL (*anterior cruciate ligament*) pada hewan coba atau ruptur ACL dan menisektomi pada penderita di klinik, akan menyebabkan degenerasi tulang rawan sendi di kemudian hari dan berakhir pada keadaan osteoarthritis sekunder (Ghosh P *et al.*, 1993; Woo SL-Y, 1995).

Putusnya ACL menyebabkan terjadinya "laxity " sendi lutut dan menimbulkan instabilitas anterior posterior. Keadaan ini meningkatkan tekanan di dalam sendi pada saat pergerakan, baik oleh karena adanya instabilitas yang menyebabkan terjadinya perubahan kontak antar permukaan sendi yang tidak merata (tekanan meningkat pada kontak yang sempit), maupun disebabkan oleh kontraksi otot yang meningkat akibat kompensasi instabilitas pada saat pergerakan fisiologik (Woo SL-Y, 1995).



Gangguan biomekanik instabilitas menyebabkan perubahan tekanan yang hilang timbul pada tulang rawan sendi. Perubahan tekanan tersebut dapat menyebabkan deformitas tulang rawan dan deformasi kondrosit yang "reversible." Merupakan suatu pertanyaan apakah keadaan deformitas ini memungkinkan terjadinya stres oksidatif akibat hipoksi-reperfusi dan timbulnya produksi radikal bebas oksigen yang bisa merusak tulang rawan secara langsung maupun tidak langsung.

Trauma keras dapat menyebabkan kerusakan langsung dari tulang rawan sendi, namun kerusakan tulang rawan dapat terjadi juga secara tidak langsung dengan melalui jalur enzimatik pada keadaan gangguan biomekanik, seperti halnya pada transeksi ACL atau menisektomi. Hal ini diakibatkan oleh karena rangsang mekanik pada kondrosit dapat merubah ekspresi gen kondrosit untuk mengeluarkan enzim degradatif. Namun apakah gangguan biomekanik hanya mengakibatkan pengeluaran enzim degradatif, dan meningkatkan ekspresi iNOS saja, perlu diteliti lebih lanjut. Oleh karena itu diperlukan suatu penelitian yang dapat mengungkapkan secara lebih jelas tentang masalah respons kondrosit terhadap beban mekanik (Grudzinsky AJ, *et al.*, 1998).

Dari bermacam faktor yang berpengaruh terhadap timbulnya OA sekunder, akan lebih bermanfaat untuk meneliti faktor yang berpengaruh dalam degradasi proteoglikan ECM yang bertubungan dengan gangguan biomekanik atau instabilitas sendi, sebab hal ini banyak terjadi pada penderita OA dalam usia produktif.

Dari uraian di atas tampaknya ada dua jalur mekanisme timbulnya degradasi proteoglikan dan kolagen dari ECM tulang rawan pada OA akibat gangguan biomekanik, yaitu melalui jalur enzimatik dan non enzimatik berupa radikal bebas. Beberapa peneliti telah membuktikan bahwa radikal bebas nitrogen ( $\text{NO}^*$ ) mempunyai peran dalam patofisiologi timbulnya OA (Hashimoto S, *et. al.*, 1998, Amin AR, *et al.*, 1998). Namun apakah radikal bebas oksigen ikut pula berperan pula dalam proses kerusakan tulang rawan sendi akibat gangguan biomekanik masih dipertanyakan.

Hal yang terakhir ini telah ditunjukkan pada percobaan dengan meningkatnya kadar MDA (*malondialdehyde*) dan penurunan SOD (*superoxide dismutase*) pada sendi yang mengalami kerusakan ECM (secara histopatologik sama dengan OA) akibat instabilitas transeksi ACL dan menisektomi (Hidayat dkk., 1997).

Dengan mengungkapkan lebih banyak tentang peran radikal bebas pada degradasi proteoglikan, khususnya dihubungkan dengan keadaan instabilitas sendi pada transeksi atau ruptur ACL, akan memberikan kemungkinan gambaran tentang bagaimana keadaan instabilitas sendi, selain menimbulkan sinyal mekanoelektrokimia pada kondrosit, juga akan memicu terjadinya stres oksidatif dan terbentuknya  $\text{O}_2^-$ , atau  $\text{OH}^*$  yang kemungkinan secara langsung atau tidak langsung menimbulkan degradasi proteoglikan dari ECM tulang rawan sendi.

Bertolak dari uraian di atas maka dapat dirumuskan masalah yang perlu diteliti untuk mengungkapkan peran stres oksidatif pada instabilitas sendi.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah stres oksidatif oleh ROS mempunyai peran dalam proses kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi yang mengalami gangguan biomekanik instabilitas, dan mengakibatkan terjadinya OA sekunder ?

Dari masalah tersebut, kemudian dijabarkan menjadi beberapa sub masalah, yaitu :

- (1) Apakah derajat berat ringannya gangguan biomekanik instabilitas sendi berpengaruh terhadap derajat kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi ?
- (2) Apakah gangguan biomekanik instabilitas sendi berpengaruh terhadap timbulnya stres oksidatif di dalam tulang rawan sendi ?
- (3) Apakah stres oksidatif merusak proteoglikan tulang rawan sendi, secara *in vivo*?
- (4) Bagaimana mekanisme peran stres oksidatif terhadap kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi, apakah berpengaruh langsung atau berpengaruh tidak langsung melalui ekspresi iNOS yang meningkat ?
- (5) Bagaimana mekanisme pengaruh gangguan biomekanik instabilitas sendi terhadap proses patogenesis kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Umum

Mengungkap pengaruh stres oksidatif pada tulang rawan sendi dalam patogenesis kerusakan matriks ekstraseluler tulang rawan sendi akibat gangguan biomekanik instabilitas sendi.

### 1.3.2 **Khusus**

- (1) Membuktikan pengaruh derajat berat ringannya gangguan biomekanik instabilitas sendi terhadap derajat kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi.
- (2) Membuktikan pengaruh derajat gangguan biomekanik instabilitas sendi terhadap derajat stres oksidatif pada tulang rawan sendi.
- (3) Membuktikan stres oksidatif merusak proteoglikan tulang rawan sendi, secara *in vivo*.
- (4) Menentukan mekanisme peran stres oksidatif terhadap kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi, berpengaruh langsung atau berpengaruh tidak langsung melalui ekspresi iNOS yang meningkat.
- (5) Mengidentifikasi jalur pengaruh gangguan biomekanik instabilitas sendi terhadap proses patogenesis kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi.

## 1.4 **Manfaat Penelitian**

### 1.4.1 **Teoritis**

Penelitian ini pada akhirnya dapat menghasilkan beberapa rumusan sebagai berikut:

- (1) Rumusan konsep tentang terjadinya stres oksidatif dalam tulang rawan pada gangguan biomekanik instabilitas sendi.
- (2) Rumusan konsep tentang terjadinya proses kerusakan proteoglikan lebih besar di dalam matriks ekstraseluler tulang rawan sendi akibat gangguan biomekanik instabilitas.

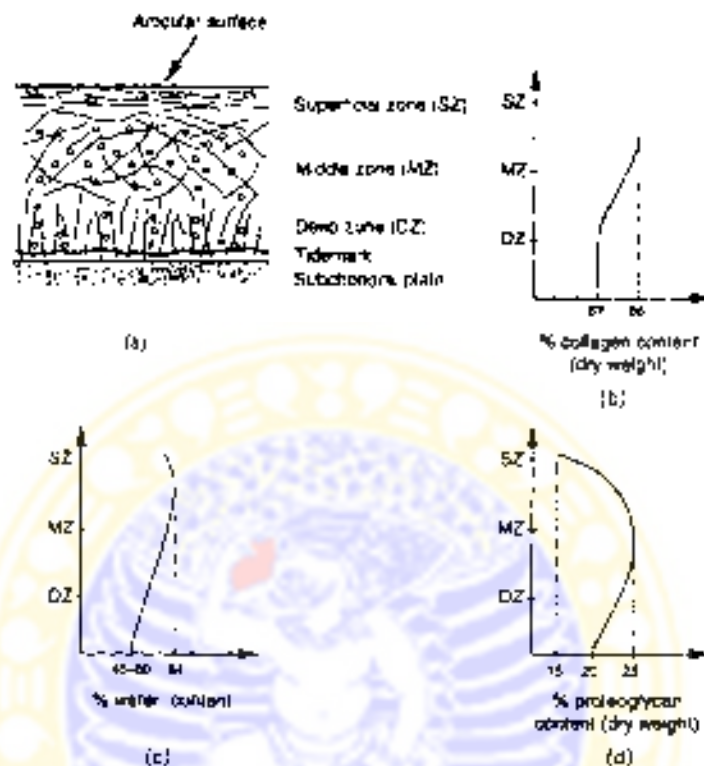


**BAB 2****TINJAUAN PUSTAKA****2.1 Struktur dan Fungsi Tulang Rawan Sendi**

Tulang rawan sendi terdiri dari sebagian besar jaringan matriks ekstraseluler dengan terdapat sel kondrosit dalam jumlah sedikit di dalamnya ( lebih-kurang 2-3% dari kandungan total ) Tulang rawan sendi dibagi dalam beberapa lapisan atau zona yaitu : lapisan di permukaan disebut zona superfisial atau tangensial (I), zona transisional atau zona tengah (*middle*) (II), zona dalam (*deep*) atau zona radial (III), dan zona kalsifikasi (IV). Batas antara zona III dan zona IV disebut "*indemark*". Kondrosit menunjukkan pula bermacam densitas di dalam matriks ekstraseluler bergantung dari letak zonanya. Densitas paling tinggi terdapat pada zona I dan selanjutnya menurun sampai pada zona IV. Densitas jumlah sel kondrosit (selularitas) tidak sama pada sendi satu dengan yang lain, umumnya lebih tebal lapisan tulang rawannya akan lebih besar densitas kondrositnya. Pada zona I, zona superfisial, serabut kolagennya tipis berjalan sejajar dengan permukaan tulang rawan sendi, demikian juga kondrositnya berbentuk lonjong dan terletak sesuai dengan permukaan tulang rawan sendi, Pada zona II, zona transisional, serabut kolagennya ber diameter lebih besar, terletak tidak teratur dan bentuk kondrositnya lebih bulat. Zona radial mengandung proteoglikan dengan konsentrasi tinggi, dan kadar air terendah. Serabut kolagennya selain ber diameter besar, tersusun tegak lurus dengan permukaan tulang rawan sendi, dan kondrositnya berbentuk bulat tersusun seperti



kolom (Mankin *HJ, et al.*, 1994; Mow VC, *et al.*, 1998). Gambar 2.1 menunjukkan penampang tulang rawan sendi dan skema konsentrasi kolagen, proteoglikan dan air pada tiap zona



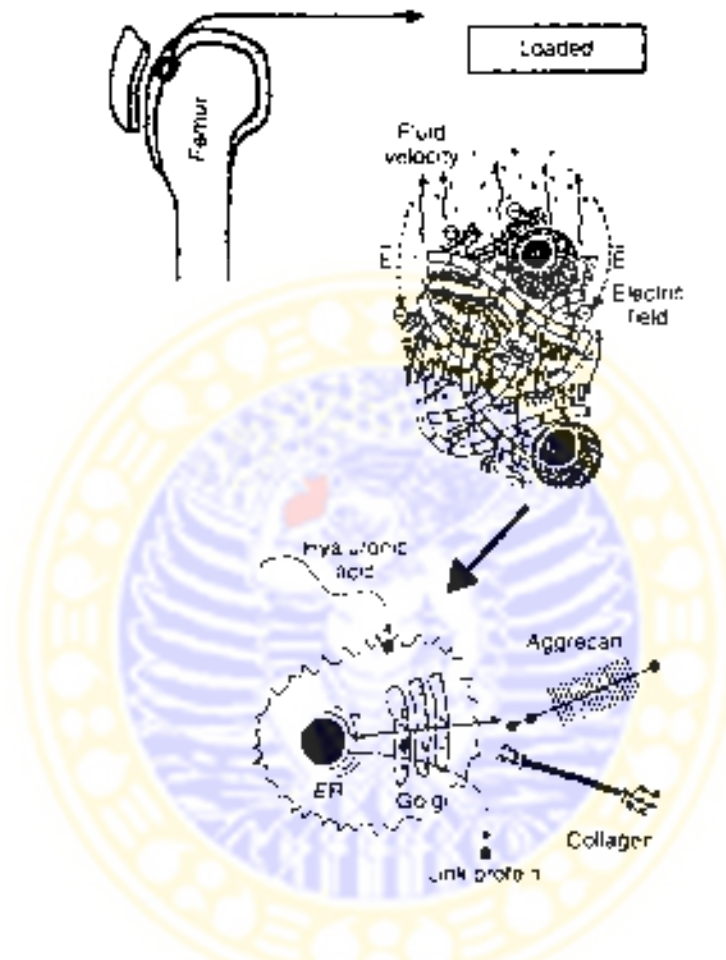
**Gambar 2.1** Penampang zona tulang rawan sendi

**Keterangan:** (a) Skema penampang sagital struktur kolagen tulang rawan sendi. Zona SZ daerah dengan serabut kolagen yang padat sejajar dengan permukaan. Zona MZ serabut kolagen lebih jarang dan tidak beraturan. Zona DZ, serabut kolagen membentuk kumpulan dan berjalan tegak lurus lempeng *subchondral*. (b) Distribusi kolagen per-unit berat kering tulang rawan sendi. (c) Distribusi isi dari air setiap lapisan tulang rawan sendi. (d) Distribusi jumlah proteoglikan per-unit berat kering tulang rawan sendi. (Dikutip dan "Osteoarthritis", 1998, *eds* Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS)

Letak kondrosit tersebar di dalam matriks ekstraseluler (ECM), dan komunikasi antar sel selalu melibatkan ECM. Tidak terdapatnya pembuluh kapiler dan limfe di dalam ECM, maka hantaran makanan dan hasil produk metabolisme dari sel kondrosit terjadi secara proses difusi melalui ECM. Demikian pula tidak terdapat jejret saraf di dalam ECM, sehingga sinyal saraf tidak dapat diteruskan secara langsung dari jaringan. Meskipun kondrosit mempunyai proses metabolisme yang aktif, secara normal kondrosit tidak melakukan pembelahan sel setelah dewasa. Setiap kondrosit diperkirakan bertindak sebagai satu unit fungsional metabolik, yang terisolasi dari sel lainnya, namun sangat berperan di dalam mengelaborasi dan memelihara ketahanan dari ECM. Daerah ECM yang terletak langsung berada di sekeliling membran sel kondrosit disebut matriks periseluler atau matriks lakuner, yang ditandai dengan berisikan kumpulan proteoglikan yang besar, berikatan dengan sel melalui interaksi antara hialuronat (HA) dengan reseptor seperti CD44, yang mengandung sedikit serabut kolagen. Sedangkan di daerah tersebut terdapat matriks teritorial atau matriks kapsuler yang terdiri dari anyaman serabut serabut kolagen yang menyelubungi sel atau sekumpulan kondrosit (*chondron*) yang tampaknya berfungsi mendukung peran biomekanik dari kondrosit. Kondrosit berhubungan dengan matriks kapsuler melalui bermacam-macam proses sitoplasmik yang kaya akan filamen mikro dan juga melalui molekul matriks yang spesifik seperti *anchorage*, *CD44-like receptor*. Bagian lain yang terbesar dari ECM, merupakan bagian paling jauh dari membran sel disebut matriks interteritorial yang mengandung sebagian besar serabut kolagen dan proteoglikan (Thonar FJMA, *et al.*, 1999)

Secara fungsional, molekul *aggrecan* memberi kemampuan kepada tulang rawan sendi untuk berubah-ubah bentuk. Di dalam jaringan matriks ekstraseluler molekul *aggrecan* dapat mencapai konsentrasi 100 mg/ml. Molekul *aggrecan* menjadikan tulang rawan mampu melakukan perubahan bentuk yang "reversible". Molekul tersebut menunjukkan interaksi yang spesifik di dalam lingkungan ekstraseluler dan dipastikan sebagai peneran tambahan yang penting di dalam organisasi, struktur dan fungsi ECM. Serabut kolagen membentuk anyaman tiga dimensi sedemikian rupa sehingga dapat merupakan perangkap bagi proteoglikan untuk tidak berkembang seterusnya. Proteoglikan yang terperangkap dalam anyaman kolagen tersebut adalah molekul yang mengandung anionik potensial listrik negatif dengan konsentrasi tinggi, dan akan berinteraksi dengan kation dalam air. Dengan demikian proteoglikan mempunyai kemampuan untuk menarik air, sehingga menimbulkan tekanan pembengkakan (*swelling pressure*) yang ditahan oleh kekakuan dan gaya regang dari serabut kolagen. Sifat material yang dimiliki oleh tulang rawan sendi bergantung pada peran kerjasama antara serabut serabut kolagen, proteoglikan yang terperangkap, dan fase cairan dari jaringan. Struktur dan komposisi yang dimiliki akan berubah akibat terjadinya ketidak seimbangan antara sintesis dan katabolisme, degradasi dari makromolekul atau material jaringan yang rusak karena trauma, akan mengakibatkan gangguan fungsi dari tulang rawan. Pada keadaan menahan beban, terjadi distribusi yang kompleks dari stres regangan, gesekan, dan tekanan. Tulang rawan sendi akan mengalami perubahan bentuk akibat dorongan dari "cairan" pada daerah terkena tekanan beban, akan meningkatkan

koncentrasi ionk dalam cairan interstituil, dan secara bersamaan proteoglikan akan didesak terkumpul, dan akan meningkatkan pula densitas potensial listrik negatif dan potensial listrik antar molekul Gambar 2.2 menunjukkan aliran ion pada tulang rawan kondilus femur yang diberi beban.



**Gambar 2.2** Aliran ion dan medan magnet ECM pada saat beban

**Keterangan** Skema aliran cairan dan medan listrik, yang disebabkan oleh tekanan dinamik tulang rawan sendi, yang dapat memodulasi sintesis makromolekul oleh kondrosit, termasuk aggrecan, link protein, asam hialuronat dan kolagen. ( dikutip dari "Osteoarthritis", 1998, eds. Rimm KD, Doherty M, Lohmander LS )

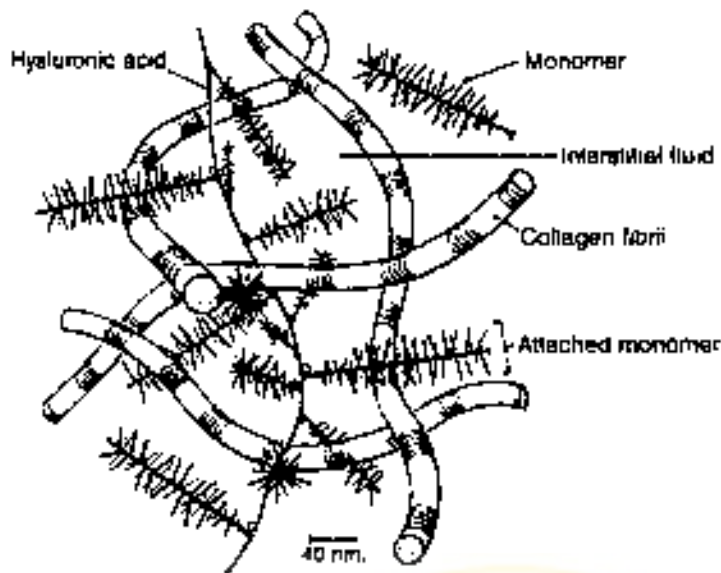
Pada akhir dari tekanan beban tersebut, deformasi akan mencapai keseimbangan dimana gaya beban eksternal diseimbangkan oleh gaya di dalam yang berdasarkan tekanan pembengkakan (interaksi proteoglikan-ionik) dan stres mekanik (interaksi proteoglikan-kolagen) (Tönar *FJMA, et al.*, 1999)

*Proteoglycan* merupakan suatu makromolekul yang terdiri dari protein inti dengan rantai ikatan kovalen glikosaminoglikan (polisakarida). Proteoglikan juga disebut protein-polisakarida atau mukopolisakarida, dimana istilah ini masih sering digunakan. Glikosaminoglikan terdiri dari rantai panjang unit unit disakarida yang tidak bercabang. Ada 3 jenis utama yang ditemukan yaitu : (1) kondroitin sulfat 4- dan 6- isomer (2) Keratan sulfat (3) Dermatan sulfat. Kondroitin sulfat merupakan glikosaminoglikan yang terbanyak dalam tulang rawan sendi.

Setiap rantai glikosaminoglikan mempunyai gugus karboksil ( $\text{COOH}$ ) dan atau kelompok sulfat ( $\text{SO}_4$ ), dimana kelompok ini terionisasi ( $\text{COO}^-$  dan  $\text{SO}_4^-$ ) dan dalam keadaan lingkungan fisiologis mereka membutuhkan lawan ion positif seperti  $\text{Ca}^{++}$  dan  $\text{Na}^+$ , untuk mempertahankan keseimbangan elektron. Ion yang terambang bebas di dalam cairan matriks ekstraseluler tersebut memberikan efek tekanan osmotik Donnan.

Proteoglikan dalam tulang rawan tidak tersebar rata pada seluruh lapisan, namun pada lapisan permukaan terdapat kolagen banyak dan proteoglikan yang kurang, pada lapisan tengah konsentrasi proteoglikan meningkat dan tersebar lebih merata, sedangkan pada lapisan dalam distribusinya lebih bervariasi. Proteoglikan dan kolagen membentuk anyaman seperti yang ditunjukkan pada gambar 2.3.





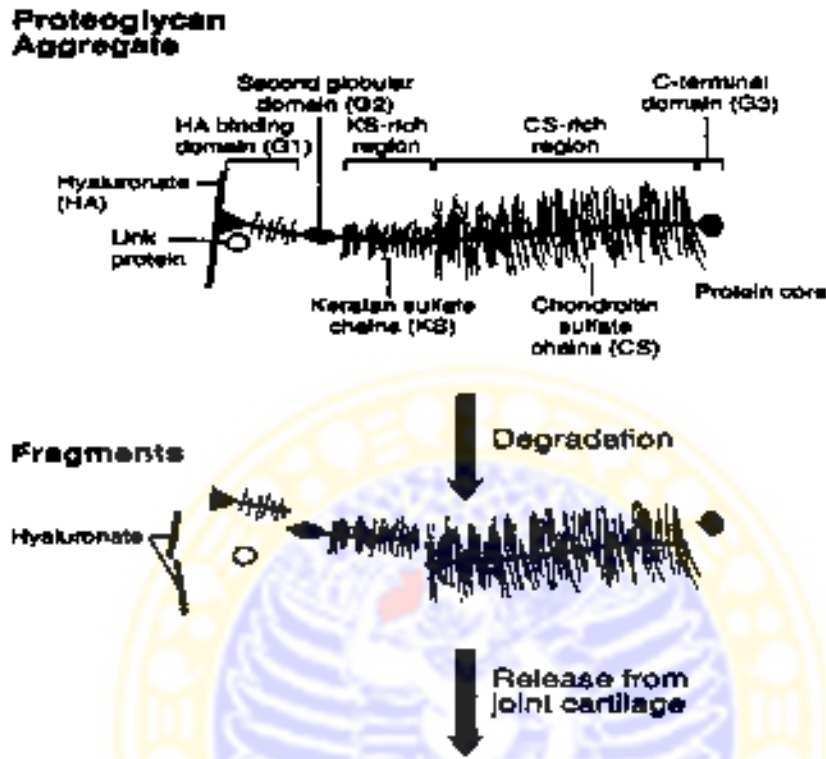
**Gambar 2.3 Anyaman kolagen dan proteoglikan**

**Keterangan:** Organisasi molekuler dari matriks tulang rawan sendi sebagai kumpulan serabut kolagen yang terikat oleh anyaman agregat maupun proteoglikan. Tekanan pembengkakan (*swelling pressure*) dari proteoglikan tetap mempertahankan serabut kolagen mengembang (dikutip dari : *Orthopaedic Basic Science*, 2nd ed. 2000)

Oleh sebab itu di dalam matriks ekstraseluler tulang rawan sendi, ukuran, kekakuan struktur, dan susunan molekuler dari proteoglikan yang berpotensi listrik yang terperangkap di antara susunan serabut kolagen sangat mempengaruhi sifat mekanik dari tulang rawan sendi.

Pada metabolisme fisiologik, terdapat sintesis dan perusakan (*degradation*) dari proteoglikan yang seimbang, namun bila terjadi gangguan pada beban ataupun terlepasnya mediator mediator tertentu, maka terjadi proses perusakan lebih besar. Perusakan dari proteoglikan akan melepaskan fragmen yang mengandung

glikosaminoglikan yang bebas, dapat sebagai ukuran kerusakan tulang rawan sendi, seperti tampak pada gambar 2.4

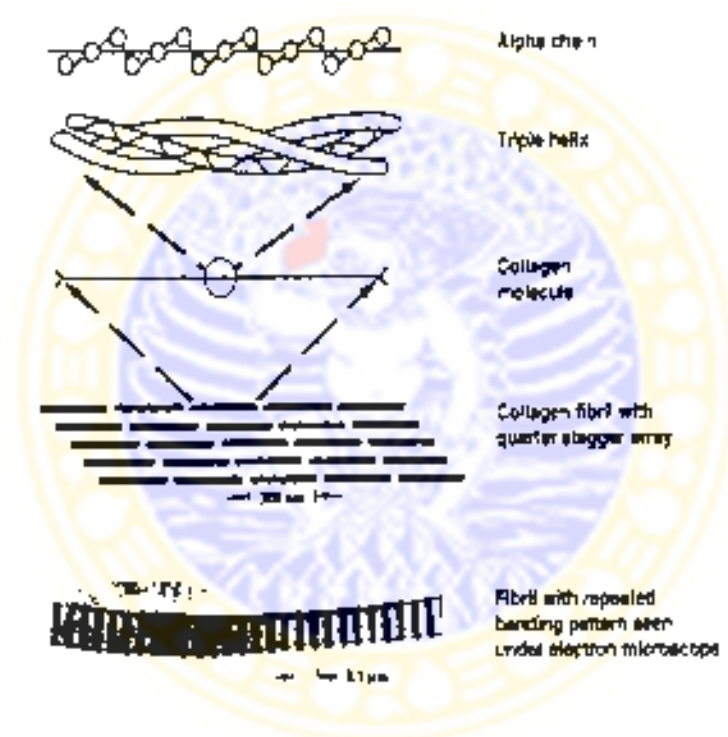


**Gambar 2.4 Pelepasan fragmen GAG akibat kerusakan proteoglikan**

**Keterangan:** Kerusakan dari agregasi proteoglikan, terutama pada daerah perbatasan antara domain G1 dan G2, melepaskan ikatan glikosaminoglikan (GAGs), yang dapat terlepas dari tulang rawan sendi. (Dikutip dari Orthopaedic Basic Science, Edisi 2, 2009)

Kolagen yang terdapat di dalam tulang rawan sendi kebanyakan adalah kolagen tipe II, bentuk lain yang terdapat di dalamnya adalah kolagen dengan molekul lebih kecil yaitu tipe V, VI, IX, X dan XI. Kolagen tipe II merupakan

makromolekul yang dominan dalam tulang rawan sendi, dan memberikan kapasitas tahan terhadap gaya regangan dan gesekan. Kolagen tipe II seperti halnya kolagen yang lain merupakan *triple helix* yang dibentuk oleh 3 (tiga) rantai polipeptida (rantai  $\alpha$ ), dan disintesis dari gen COL2A1. Pembentukan kolagen tipe II dimulai dengan dibentuknya sebagai *procollagen* yang mempunyai ujung  $-N$  dan  $-C$  propeptida, yang kemudian propeptida tersebut akan dikeluarkan pada saat kolagen berubah menjadi kolagen matang (*mature*) di dalam tulang rawan sendi. Gambar 2.5 menunjukkan susunan kolagen.



Gambar 2.5 Bentuk Kolagen

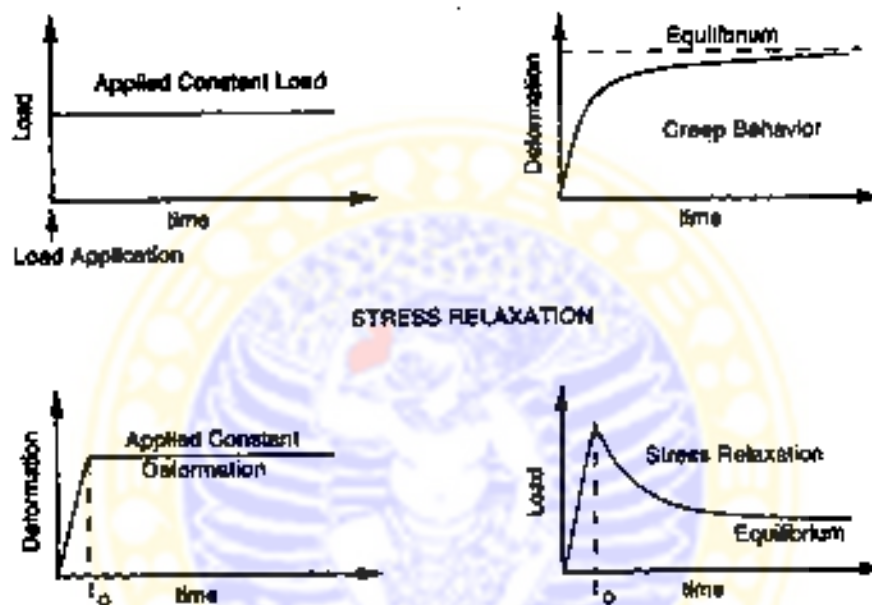
**Keterangan** Triple helix tersusun dari 3 rantai  $\alpha$  membentuk molekul prokolagen. Di luar sel ujung  $N$ - dan  $C$ - dilepaskan dan membentuk fibril kolagen (dikutip dari: Orthopaedic Basic Science, ed 2 2000)

Tulang rawan sendi khususnya sendi penyangga beban, menahan beban berat yang didapatkan secara statik, siklik, berulang ulang dalam jangka waktu yang lama. Oleh karena itu molekul strukturalnya yaitu proteoglikan, kolagen, dan protein lainnya harus tersusun sedemikian rupa sehingga membentuk matriks yang kuat, tahan terhadap bermacam stres yang besar. Sifat materialnya meskipun dalam arti kata matriks berupa jaringan yang kokoh namun dapat dikatakan pula bersifat ber rongga (*porous*), dapat ditembus (*permeable*) dan sangat lunak. Oleh karena itu sifat biomekanik tulang rawan sendi dapat dipandang sebagai material *biphasic*, terdiri dari fase padat (*solid phase*) dimana tidak ada aliran cairan, dan fase cairan (*fluid phase*) (termasuk ion yang larut di dalamnya), dimana terjadi aliran cairan. Permeabilitas tulang rawan sendi dibuktikan dengan adanya aliran molekul cairan yang keluar masuk tulang rawan sendi ke cairan sinovial, khususnya pada saat tekanan kompresi, terjadi peningkatan tekanan dalam interstitium ECM dan dalam keadaan ini cairan terpompa keluar dari jaringan tulang rawan sendi. Permeabilitas ini memungkinkan terjadinya difusi nutrisi dan oksigenasi dari tulang rawan sendi. (Mankin HJ, *et al.* 2000a).

Tulang rawan sendi bersifat viskoelastik (*viscoelastic*), artinya bahwa sifatnya bergantung waktu (*time-dependent*), bila diberi beban tekanan tetap atau bila terjadi deformasi atau perubahan bentuk yang konstan. Dalam arti kata lain bila stres kompresi yang tetap dibebankan pada tulang rawan sendi, maka perubahan bentuk akan meningkat dengan berjalannya waktu, akan terus berubah secara perlahan hingga suatu saat akan mencapai keseimbangan. Sebaliknya bila terjadi deformasi

atau perubahan bentuk dari jaringan tulang rawan sendi dan dipertahankan dalam *strain* yang konstan, terjadi peningkatan stres sampai puncaknya dan kemudian diikuti dengan proses relaksasi stres secara perlahan dan berakhir pada suatu keseimbangan.

Gambar 2.6 menunjukkan grafik beban pada tulang rawan sendi.



Gambar 2.6 Relaksasi Stres tulang rawan sendi

**Keterangan** Atas: Beban konstan akan menyebabkan deformasi secara perlahan dan berakhir pada suatu keseimbangan. Bawah: Deformasi yang dipertahankan konstan akan meningkatkan stres, yang diikuti relaksasi stres secara perlahan dan berakhir pada suatu keseimbangan. (dikutip dari: Orthopaedic Basic Science 2nd ed. 2000).

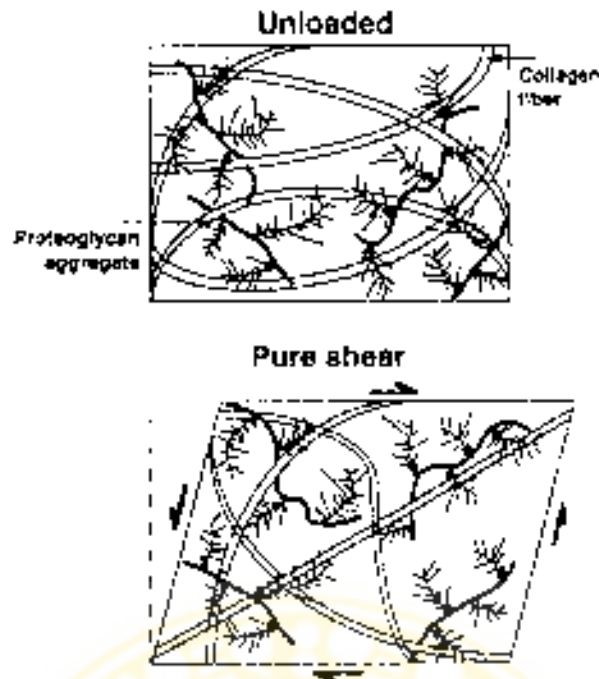


Terdapat 2 mekanisme yang menyebabkan viskoelastisitas tulang rawan sendi yaitu mekanisme *flow-dependent* (bergantung aliran) dan mekanisme *flow-independent* (tidak bergantung aliran)

Viskoelastik yang *flow-dependent* bergantung dari aliran cairan interstisiil dan tekanan yang didapat dari beban atau tekanan kompresi. Pada percobaan *in vitro* pada tulang rawan sendi normal keseimbangan dicapai setelah 2,5 - 6 jam, oleh sebab itu pada kenyataannya secara fisiologi sendi yang selalu bergerak berada di dalam beban dinamik, sehingga keadaan keseimbangan tidak akan pernah tercapai meskipun dalam keadaan tidur sekalipun.

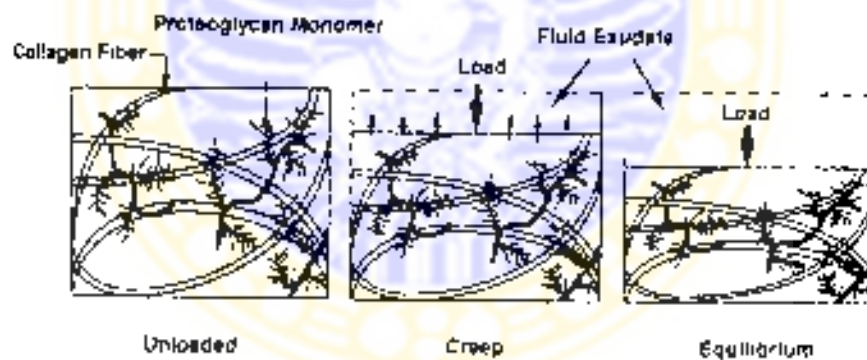
Viskoelastik *flow-independent* adalah yang terjadi pada gaya gesekan mumi, dimana tidak ada aliran cairan interstisiil oleh karena tidak ada perbedaan tekanan atau perubahan isi dari matriks ekstraseluler (Mankin HJ, *et al.* 2000a).

Gambar 2.7 menunjukkan viskoelastik *flow-independent* pada beban dengan gaya gesekan mumi, sedangkan gambar 2.8 menunjukkan beban dengan gaya beban kompresi



Gambar 2.7 Perubahan ECM pada stres gesekan

Keterangan: Stres gesekan (*shear stress*) yang murni menimbulkan deformasi tanpa diikuti perubahan volume dan perbedaan tekanan, tanpa adanya aliran cairan, terjadi perubahan konfigurasi diantara molekul ECM a) kolagen dan proteoglykan (dikutip dari Orthopaedic Basic Science, 2nd ed, 2000)



Gambar 2.8 Perubahan ECM pada stres tekanan

Keterangan: Stres kompresi konstan menimbulkan tekanan cairan intersusil, aliran cairan karena perbedaan tekanan, deformasi yang perlahan berubah dan berakhir pada suatu keseimbangan (dikutip dari Orthopaedic Basic Science, 2nd ed, 2000)

Beban gaya yang diterima oleh permukaan tulang rawan sendi diteruskan menyeberangi rongga sendi melalui lapisan cairan sendi yang tipis ke permukaan tulang rawan sebaliknya. Dengan demikian stress beban pada tulang rawan dipengaruhi oleh fungsi dan sifat cairan sendi, oleh karena cairan sendi atau cairan sinovial merupakan salah satu komponen material yang ikut berperan di dalam transmisi gaya pada sendi. Sesuai dengan tribologi, maka cairan sendi berperan di dalam fungsi friksi (*friction*), lubrikasi (*lubrication*) dan keausan pada interaksi kedua permukaan tulang rawan di dalam pergerakan sendi, selain berfungsi memberikan nutrisi pada tulang rawan sendi. ( Mow VC, *et al.* 2000).

Seperti diketahui cairan sendi merupakan cairan dengan viskositas tinggi yang diproduksi oleh sel sinovia pada lapisan sinovial, dan memiliki sifat atau menunjukkan aliran nonnewtonian (*nonnewtonian flow*). Cairan nonnewtonian memiliki sifat viskoelastik dan mempunyai koefisien viskositas ( $\mu$ ) yang tidak konstan, bergantung kepada *shear rate* ( $D$ ). Oleh karena sifat tersebut, cairan sendi berperan penting di dalam proses lubrikasi dengan cara (1) Sebagian konstituenya yang terserap ke tulang rawan berfungsi sebagai *boundary lubricant* (2) Menurunkan koefisien friksi antara kedua permukaan tulang rawan pada beban ringan (3) Menurunkan koefisien friksi antara permukaan gelas dan tulang rawan dari 0.02 ke 0.001 bila memakai *buffered saline* (4) Menurunkan koefisien friksi antara tulang rawan dan sinovia dari 0.4 ke 0.2 (5) Tidak mempunyai peran berarti pada beban tinggi. Terdapat 2 macam lubrikasi yaitu *fluid film* dan *boundary*, dimana *fluid film* khususnya berfungsi dalam keadaan beban biasa, sedangkan *boundary* berfungsi

dalam keadaan beban tinggi dan dalam waktu lebih lama. Namun secara rinci lubrikasi yang mana berperan pada keadaan beban pada sendi bergantung kepada bentuk sendi dan beban spesifik terhadap sendi itu sendiri. Pada kondisi patologik mekanisme lubrikasi di dalam sendi akan terganggu oleh karena sifat cairan sendi maupun tulang rawan berubah, dan akan memperberat kondisi patologiknya dan menjurus ke perubahan degenerasi. (Mow VC, *et al.*, 2000).

## 2.2 Epidemiologi dan Patologi Osteoarthritis

OA merupakan suatu penyakit sendi diarthrodial yang ditandai dengan terjadinya degenerasi tulang rawan sendi berupa kerusakan atau degradasi dari komponen matriks ekstraseluler baik kolagen, proteoglikan, maupun proses apoptosis dari kondrosit (Hashimoto S., *et al.*, 1998).

Prevalensi dari OA di daerah Malang ternyata lebih tinggi dibandingkan dengan di Amerika (Kalim H., *et al.*, 1999). Pada OA sekunder khususnya yang merupakan akibat dari gangguan biomekanik belum diteliti secara pasti. Terdapat kesan bahwa cidera lutut akibat trauma, baik trauma kecelakaan lalu lintas, trauma olah raga, maupun trauma pekerjaan sehari-hari dan lain sebagainya meningkat, dengan diikuti terjadinya kerusakan pada ligamen dan meniskus yang dapat menimbulkan gangguan biomekanik berupa instabilitas, yang pada akhirnya akan mengakibatkan timbulnya kerusakan ataupun degenerasi dari matriks ekstraseluler tulang rawan sendi dan terjadi OA sekunder. Demikian pula terjadinya insufisiensi dari diskus vertebralis yang disebabkan karena pekerjaan dengan posisi tertentu

ataupun adanya *spondylolists* yang menimbulkan *spondylolisthesis* mengakibatkan instabilitas khususnya translasi dari dua korpus vertebra dan menjurus ke arah terjadinya degenerasi dari *facet* tulang rawan sendi.

Penelitian pada trauma sendi yang ditujukan pada aktivitas atlet dan pekerja ditemukan bahwa risiko untuk terjadinya OA lutut lebih banyak pada pria dengan risiko relatif 3.46 dan pada wanita dengan risiko relatif 2.18 (keduanya dengan  $p < 0.05$ ) (Felson DT, 1995). Pekerja tambang mempunyai risiko lebih tinggi untuk terjadinya OA pada lutut dan tulang belakang, sedangkan pelaut mempunyai risiko lebih tinggi untuk terjadinya OA lutut dan jari jari tangan dibandingkan pekerja di belakang meja (Felson DT, 1995).

Patologi dari OA adalah gangguan dari tulang rawan sendi dan juga tulang subkondral. Masalah yang mendahului belum diketahui secara pasti, namun para ahli hingga saat ini mempunyai anggapan bahwa hal ini terjadi karena ketidakseimbangan antara proses anabolik dan katabolik yang utamanya dikontrol oleh sel kondrosit.

Selain itu OA ditandai dengan adanya kerusakan atau degradasi yang progresif dari komponen matriks ekstraseluler tulang rawan sendi yang disertai dengan faktor peradangan sekunder (Cicutani F; Spector TD, 1998).

Secara makroskopik tampak bahwa seluruh struktur sendi terkena yaitu mulai dari lapisan tulang rawan sendi, kapsul sendi yang menebal dan sampai pada melekatnya kapsul sendi dengan permukaan tulang yang mengalami perubahan bentuk di bawahnya. Lapisan sinovium sering menunjukkan tanda peradangan dan permukaannya tampak hipervaskuler serta mengalami perdarahan. Tulang rawan



sendi pada tahap permulaan secara mikroskopik didapatkan perubahan dari kondrosit yang mengalami proliferasi dan pengelompokan (*cloning*) disertai dengan perubahan biokimiawi, yaitu terjadi peningkatan kandungan air dalam ekstraseluler matriks. Konsentrasi proteoglikan menurun yang merupakan degradasi ekstraseluler matriks pada lapisan permukaannya, ditandai dengan terjadinya fibrilisasi dimana secara makroskopik tampak sebagai perlunakan. Pada keadaan yang berat terjadi hilangnya seluruh lapisan tulang rawan sehingga tampak tulang subchondral mengkilat yang diistilahkan sebagai gading yang dipoles (*eburnation*). Sebagai akibat hilangnya lapisan tulang rawan sendi maka terjadi pengerasan pada lapisan tulang di bawahnya (*subchondral*) berupa sklerosis dan selain itu akibat penekanan cairan sinovia melalui celah-celah tulang rawan yang terbentuk terjadi pembentukan kista pada daerah subkondral. Pada daerah tepi sendi timbul pembentukan tulang baru yang diliputi oleh tulang rawan *fibrous* maupun hialin yang disebut osteofit. Selain itu terdapat penebalan dari kapsel sendi dan melekat pada tulang dibawahnya yang mengalami perubahan bentuk. Pada gambaran histopatologi awal OA didapatkan selularitas yang meningkat yang lambat laun dengan bertambahnya derajat OA maka terjadi penurunan jumlah sel, peningkatan jumlah pengelompokan sel, dan penambahan jumlah garis bergelombang *side mark* (Andrew R, 1999; Mankin HJ, et al., 2000b). Secara mikroskopopik perubahan dini pada tulang rawan sendi terdapat persamaan antara OA manusia dan hewan coba. Selain terdapat pembengkakan matriks ekstraseluler oleh karena degenerasi *chondromucoid*, kondrosit pada OA menunjukkan peningkatan aktivitas sintesis termasuk diantaranya kolagen dan enzim

proteolitik, juga akan membentuk pengelompokan sel (*clones*). Disamping itu proliferasi kondrosit diikuti oleh fenomena *perilacunar dissolution* yang dikenal sebagai Weichselbaum *lacunar resorption*, yaitu proses resorpsi kondrosit yang diakibatkan pelepasan sitokin. Selain terjadi duplikasi atau penebalan dari *tidemark*, pada daerah tertentu ditemukan penurunan jumlah sel kondrosit, disertai gambaran nekrosis dan apoptosis (Hough AJ, Jr, 2001)

### 2.3 Metabolisme Tulang Rawan Sendi

Metabolisme tulang rawan sendi merupakan proses aktif yang melibatkan setiap komponen dari tulang rawan sendi. Oleh karena pertukaran zat bervariasi pada daerah permukaan sendi yang berlainan, maka *remodelling* yang berlangsung tidak sama satu area dengan yang lainnya. Demikian pula kecepatan pertukaran antara kolagen dan proteoglikan tidak sama. Rerata umur paruh glikosaminoglikan berkisar antara 150 - 300 hari, sedangkan untuk kolagen berkisar 15 - 30 hari. Kecepatan metabolisme kondrosit akan berubah sebagai respon terhadap adanya bermacam rangsangan. Kondrosit akan meningkatkan sintesis dari matriks ekstraseluler sebagai respon terhadap mediator biokimiawi. Proteoglikan, pH, konsentrasi kalsium lokal, hormon pertumbuhan, trauma atau rudapaksa, prostaglandin, tekanan O<sub>2</sub> dan lain lain, dapat merubah metabolisme kondrosit

Bila tulang rawan sendi diberi beban, maka tulang rawan akan bertindak sebagai bahan yang padat namun *resilien* atau elastis. Pada saat muatan beban, matriks ekstraseluler akan berubah bentuk, dan akan kembali ke bentuk asal bila

beban dihilangkan, dan pada saat itu pula terjadi reabsorpsi cairan sinovial masuk kembali ke matriks ekstraseluler, terjadilah rehidrasi dan nutrisi untuk kondrosit. (Dewire P and Einhorn TA, 2001).

Lane JM., *et al.* (1977) di dalam tulisannya telah membahas tentang metabolisme oksigen tulang rawan sendi sebagai berikut:

Telah diketahui bahwa di dalam tulang rawan sendi terdapat dua bentuk metabolisme yaitu aerobik dan anaerobik. Hal ini dibuktikan pada penelitian tentang konsumsi oksigen dan metabolisme glukosa atau laktat yang memberikan gambaran langsung tentang adanya ke dua jalur energi pada lingkungan yang normal di dalam tulang rawan sendi. Hal tersebut memungkinkan metabolisme akan berpindah dari satu ke yang lain bila lingkungan oksigen terganggu. Pada keadaan tekanan oksigen yang rendah, kondrosit tulang rawan sendi tampil mengikuti jalur energi glikolitik anaerobik dengan penggunaan glukosa tinggi, produksi laktat yang tinggi dan konsumsi oksigen yang rendah. Pada keadaan tekanan oksigen fisiologik normal, kondrosit mengikuti ke dua jalur metabolik baik aerobik maupun anaerobik. Penurunan penggunaan glukosa, penurunan produksi laktat, dan peningkatan konsumsi oksigen memperkuat adanya fenomena perpindahan sebagian besar metabolisme ke aerobik. Adanya dua jalur metabolik menimbulkan pertanyaan apakah semua kondrosit mengikuti fenomena tersebut atau apakah ada dua macam kelompok kondrosit yang berbeda.

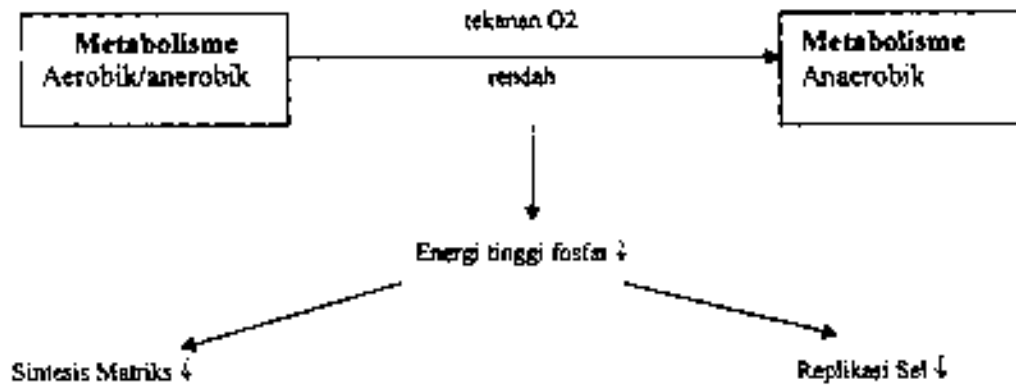
Tulang rawan sendi menunjukkan perbedaan karakteristik dari lapisan tangensial, transisional, radial dan basiler (lapisan kalsifikasi). Pada penelitian secara mikroskop

elektron menunjukkan bahwa kondrosit di daerah zona tengah, mempunyai persediaan glikogen lebih besar daripada zona yang lain. Bahwasanya makanan berdifusi dari arah permukaan, maka kondrosit pada lapisan zona yang paling dalam tentunya akan mempunyai konsentrasi metabolik dan kecepatan perputaran yang berbeda dibandingkan dengan kondrosit di daerah zona permukaan. Hal ini mendukung suatu hipotesis yang menyatakan bahwa populasi kondrosit terpisah oleh karena mengikuti jalur metabolisme yang berbeda, namun hanya sampai analisis zona yang memungkinkan. Kemungkinan lain adalah bahwa di dalam kondrosit yang sama terdapat campuran antara ke dua jalur metabolik.

Terdapat hubungan antara tingkat tekanan oksigen dengan jalur energi, sintesis matriks dan DNA replikasi. Data menunjukkan bahwa pada tekanan oksigen 1%, sintesis proteoglikan dan DNA tertekan dibandingkan dengan pada tekanan oksigen 21%. Juga terdapat perpindahan dari sebagian metabolisme (*partial*) ke metabolisme anaerobik pada keadaan tekanan oksigen yang rendah.

Pada penelitian *in vitro* lain menyebutkan bahwa kadar NO akan meningkat bila eksplan tulang rawan ditambahkan dengan IL- $\alpha$  dan TNF- $\alpha$ , baik dalam keadaan hipoksia (kadar O<sub>2</sub> 1%) maupun normoksia (kadar O<sub>2</sub> 20%). Namun dalam keadaan hipoksia, produksi NO<sup>•</sup> akibat IL-1 $\alpha$  dan TNF- $\alpha$  akan menurun secara bermakna. Pada keadaan reoksigenasi, eksplan yang hipoksia akan meningkatkan kembali produksi NO<sup>•</sup>. (Cernanec J, *et al.*, 2002).

Gambar 2.8 menunjukkan perubahan metabolisme dalam tekanan O<sub>2</sub> yang rendah pada tulang rawan sendi.



**Gambar 2.9** Bagau perubahan metabolisme kondrosit pada tekanan O<sub>2</sub> rendah

**Keterangan:** Bagau perubahan metabolisme tulang rawan sendi pada penurunan tekanan O<sub>2</sub> rendah. (Dikutip dari Lane JM et al. *Anaerobic and aerobic Metabolism in Articular Cartilage, The J of Rheumatology*; 1977)

Pada metabolisme anaerobik, produksi ATP kurang efisien. Satu molekul glukosa memberikan 2 ATP pada glikolisis anaerobik, sedangkan pada siklus asam sitrat pada metabolisme aerobik yang penuh akan memberikan 38 ATP. Perpindahan ke metabolisme anaerobik pada tekanan oksigen rendah dapat menyebabkan menurunnya persediaan energi tinggi fosfat, sedangkan diketahui ATP dan energi tinggi fosfat sangat dibutuhkan untuk sintesis proteoglikan dan replikasi DNA. Demikian pula hambatan sintesis kolagen pada metabolisme anaerobik berhubungan langsung dengan kekurangan oksigen atmosfer untuk hidrolisis dari sisa purin dan lisin, bukan berhubungan langsung dengan menurunnya energi tinggi fosfat.

Dari data disimpulkan bahwa keadaan hipoksia akan mengganggu metabolisme energi, replikasi sel dan homeostasis matriks. Jadi hipoksia tingkat tertentu yang terjadi pada sendi akan memberikan efek buruk pada metabolisme



kondrosit khususnya bila keadaan hipoksia bertahan dalam untuk waktu tertentu. Keadaan ini akan menurunkan daya regenerasi dari kondrosit yang mengalami gangguan. (Lane JM., *et al.*, 1977).

Oksigen yang berasal dari cairan sinovial masuk ke dalam tulang rawan sendi dengan menembus permukaan tulang rawan sendi. Oksigen cairan sinovial berasal dari kapiler membrana sinovia dengan cara transfer difusi. Cairan sinovial mengandung tekanan oksigen rendah dibandingkan dengan tekanan oksigen pada darah arteri (>90 mmHg). Tekanan oksigen pada cairan sinovial manusia berkisar antara 50 – 70 mmHg, sedangkan pada sendi lutut kelinci didapatkan berkisar 25 – 72 mm Hg. Lapisan paling dalam dari tulang rawan sendi yaitu lapisan tulang rawan kalsifikasi yang padat tidak dapat ditembus oleh gas maupun cairan. Tulang rawan sendiri dapat ditembus oleh oksigen meskipun distribusi di dalamnya tidak merata, dimana konsentrasi lebih tinggi pada daerah seluler dan periseluler dibandingkan dengan daerah yang mengandung banyak serabut atau fibril kolagen (Grimshaw MJ. and Mason RM., 2001).

Pada keadaan tertentu misalnya pada arthritis rematoid konsumsi oksigen di sinovium meningkat sehingga kemampuan pengiriman oksigen ke cairan sinovial menurun dan mengakibatkan pO<sub>2</sub> di cairan sinovial arthritis rematoid menurun (<27 mmHg), dibandingkan cairan sinovial normal. Hal ini memberikan konsekuensi penurunan tekanan oksigen yang masuk ke dalam tulang rawan sendi. Pada OA degenerasi tulang rawan sendi menyebabkan fibrilasi pada permukaannya, dan hal tersebut menimbulkan kemungkinan cairan sinovial yang menembus permukaan

tulang rawan sendi akan turun dengan konsekuensi terjadi penurunan kadar oksigen yang masuk ke dalam tulang rawan sendi. Pada penelitian menunjukkan bahwa tekanan oksigen memodulasi meningkatnya mRNA yang menandai molekul struktural, beberapa sitokin,  $\beta 1$  integrin, dan *integrin-linked* kinase pada kondrosit (Grimshaw MJ and Mason RM, 2001)

#### 2.4 Patogenesis Osteoarthritis

Pendapat para ahli tentang patogenesis OA berubah yang dikatakan sebagai penyakit "degeneratif" murni yang tidak dapat dielakkan dari perjalanan umur seseorang dengan prinsip "keausan" karena "pemakaian" terus menerus, maka sekarang pandangan berubah menjadi suatu proses metabolik aktif, yang dinamik termasuk kerusakan dan perbaikan, yang dipicu oleh bermacam tekanan maupun stres baik berupa biokimiawi maupun mekanik (Brandt KD., *et al.*, 1998).

Pembagian dan bermacam teori tentang patogenesis OA telah dirumuskan, diantaranya ada yang menyatakan bahwa OA adalah suatu proses di dalam sendi diarthrodial yang menunjukkan perbaikan dari bermacam jaringan di dalamnya, termasuk respon dari sinovia, adanya *remodeling* atau pembentukan osteofit oleh tulang subkondral, perubahan metabolisme kondrosit, dan reaksi kapsuler. Proses tersebut diakibatkan oleh gangguan pada sendi yang berupa radapaksa akut, gangguan biomekanik misalnya instabilitas, metabolisme abnormal, sumber genetik yang tidak diketahui, atau faktor lingkungan yang lain. Proses tersebut memberikan hasil antara lain suatu kelainan "degenerasi" tulang rawan sendi, yang secara klinis

menimbulkan keluhan atau disabilitas sendi yang dimasukkan kategori "dekompensasi" atau tidak menimbulkan keluhan yang dimasukkan sebagai kategori "kompensasi" (Brandt KD., *et al.*, 1998).

Teori lain (Nuki G., 1999) menyebutkan bahwa terjadinya OA disebabkan oleh karena dua hal prinsip yaitu:

- (1) Tulang rawan sendi yang mempunyai defek sebelumnya sehingga menimbulkan kegagalan dari sifat biomaterial tulang rawan yang secara langsung maupun tidak langsung menimbulkan keadaan OA, meskipun dalam keadaan beban normal. Keadaan ini misalnya pada defek dari gen pertama kolagen tipe II atau pada tulang rawan sendi *ochronotic* yang menyebabkan deposisi pigmen pada tulang rawan.
- (2) Kegagalan dari tulang rawan sendi yang normal merespon gaya fisik yang terjadi pada sendi, mengakibatkan kerusakan pada tulang rawan sendi itu sendiri. Pada konsep ini dibagi dalam gaya fisik yang langsung merusak matriks ekstraseluler atau gaya fisik yang mengakibatkan kondrosit merespon dengan mengeluarkan enzim degradatif dan berkembang menjadi respon perbaikan yang tidak adekuat.

Sejauh ini penelitian yang ada menunjukkan kerusakan enzimatik merupakan faktor kunci dari progresivitas penyakit. Hal demikian terjadi pada trauma mikro yang berulang atau trauma tunggal yang besar ataupun transmisi yang tidak normal dari suatu gaya mekanik, meskipun dalam intensitas normal (Pelletier JP, *et al.*, 2001).

Peran jalur enzimatik pada kerusakan matriks ekstraseluler tulang rawan sendi diperkirakan sebagai alur utama, dan kondrosit tampaknya merupakan sumber utama dari enzim yang bertanggung jawab terhadap kerusakan matriks ekstraseluler. Enzim yang diketahui berperan penting dalam patofisiologi OA adalah *metalloprotease*, *serine protease*, *thiol protease* dan *aggrecanase*. Metalloprotease yang banyak berperan adalah kolagenase, stromelisin dan gelatinase. Setiap enzim mempunyai peran utama di dalam proses degradasi seperti halnya kolagenase merusak kolagen tipe II, sedangkan stromelisin diketahui merusak protein inti proteoglikan termasuk ikatan HA (*hyaluronic acid*), dan mengaktifasi prokolagenase. Plasmin sebagai serine protease mengaktifasi kolagenase, demikian pula cathepsin D dan B sebagai thiol protease ikut berperan pula dalam proses destruksi kolagen dan proteoglikan (Pelletier JP, et al., 2001).

Di dalam perjalanan penyakit OA, secara umum dibagi atas tiga tingkat (Pelletier JP, et al., 2001), yaitu :

- (1) Tingkat I, proteoglikan matriks secara bertahap menghilang, serabut kolagen rusak, menyebabkan terganggunya integritas struktur dan fungsi dari jaringan tulang rawan. Kondrosit mempunyai peran penting dalam proses tersebut, karena memproduksi enzim proteolitik dalam jumlah besar terutama metalloprotease (MMP), *serine protease* dan *thiol protease*. Kerusakan proteoglikan menyebabkan kurang efektifnya daya perangkap molekul air, sehingga daya serap terhadap stres (*shock absorber*), khususnya terhadap stres mekanik berkurang.

- (2) Tingkat II, permukaan tulang rawan sendi tidak rata dan terjadi fibrilisasi, dan produk kerusakan tulang rawan sendi dilepaskan ke dalam cairan sendi dan difagositosis oleh makrofag dari lapisan sinovial, dan hal ini menimbulkan proses inflamasi. Faktor lain termasuk mikrokristal, dan neoepitop (antigen baru yang terbentuk dari rusaknya makromolekul), ikut pula berkontribusi di dalam hal memicu terjadinya proses peradangan.
- (3) Tingkat III, pada tingkat ini sel lapisan sinovial merupakan sel efektor *proinflammatory*, mengeluarkan enzim protease, dan sitokin yang meningkatkan proses katabolisme, merusak tulang rawan sendi dan disertai dengan proses peradangan.

Seperti yang diuraikan di atas, beberapa sitokin terutama *interleukin 1* (IL-1) dan TNF- $\alpha$  mempunyai potensi untuk meningkatkan transkripsi dan translasi dari metalloprotease yang konsekwensinya akan meningkatkan proteolisis ECM. Selain itu IL-1 dapat menghambat sintesis dari matriks ekstraseluler tulang rawan sendi meskipun dalam kadar yang rendah, sehingga dengan efek ganda tersebut IL-1 akan menyebabkan degradasi protein yang menjurus ke degenerasi ECM lebih besar (Poole AR, 1995). Sebaliknya *insulin like growth factor-1* (IGF-1) dan *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) dapat menghambat efek dari IL-1, dan memicu sintesis matriks ECM, walaupun demikian keduanya tidak banyak berperan pada sendi OA (Poole AR, 1995).



Peran  $\text{NO}^*$  (*nitric oxide*) sebagai radikal bebas dalam proses degradasi tulang rawan diperkirakan sebagai mediator secara langsung (*direct*) maupun tidak langsung (*indirect*) terhadap kerusakan ECM, dengan cara menghambat sintesis dari proteoglikan yang mekanismenya belum diketahui (Morales, 1995).  $\text{NO}^*$  yang disintesis oleh enzim *nitric oxide synthase* dari asam amino L-arginin, dapat bereaksi secara cepat dengan anion superoksida membentuk peroksinitrit, yang kemudian dalam reaksi selanjutnya akan membentuk radikal hidroksil (Stamler JS *et al.*, 1992). Selain itu  $\text{NO}^*$  mempengaruhi sel kondrosit di dalam proses antara lain:

- (1) Menghambat sintesis kolagen dan proteoglikan
- (2) Memodulasi pembentukan dan aktivitas enzim metalloprotease
- (3) Meningkatkan suseptibilitas atau kerentanan terhadap kerusakan akibat oksidan lain.
- (4) Menghambat *polimerase actin* dan *β1 integrin-dependent signaling*
- (5) Menyebabkan apoptosis kondrosit

IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  dan  $\text{NO}^*$  merupakan pemeran penting dalam proses kerusakan tulang rawan sendi. Selain perubahan stres biomekanik, produk degradasi tulang rawan seperti halnya fragmen fibronektin merupakan sinyal yang akan memicu kondrosit memproduksi sitokin IL-1, TNF- $\alpha$ , dan iNOS. Proses ini juga merupakan proses otokrin dan parakrin bagi kondrosit dalam mengatur metabolismenya. Dengan adanya proses umpan balik tersebut, kondrosit memproduksi enzim proteolitik MMP dan iNOS. Enzim MMP umumnya merupakan peran utama yang akan merusak komponen matriks ekstraseluler terutama proteoglikan dan kolagen, sedangkan iNOS

sel, sehingga oksasi NO<sup>2</sup> yang akan mempengaruhi kondisi sel seperti tersebut di atas. Oleh karena telah disebutkan pada bab 1, patofisiologi terjadinya OA, masih banyak hal yang belum. Penelitian menunjukkan bahwa jaringan sendi yang terlibat tidak hanya tulang namun juga jaringan lainnya yang berinteraksi satu dengan yang lain (Klein, MK, Howell, DS, 2001). Respon kondrosit terhadap gaya biomekanik, termasuk pada degradasi matriks diperlihatkan pada gambar 2.10.

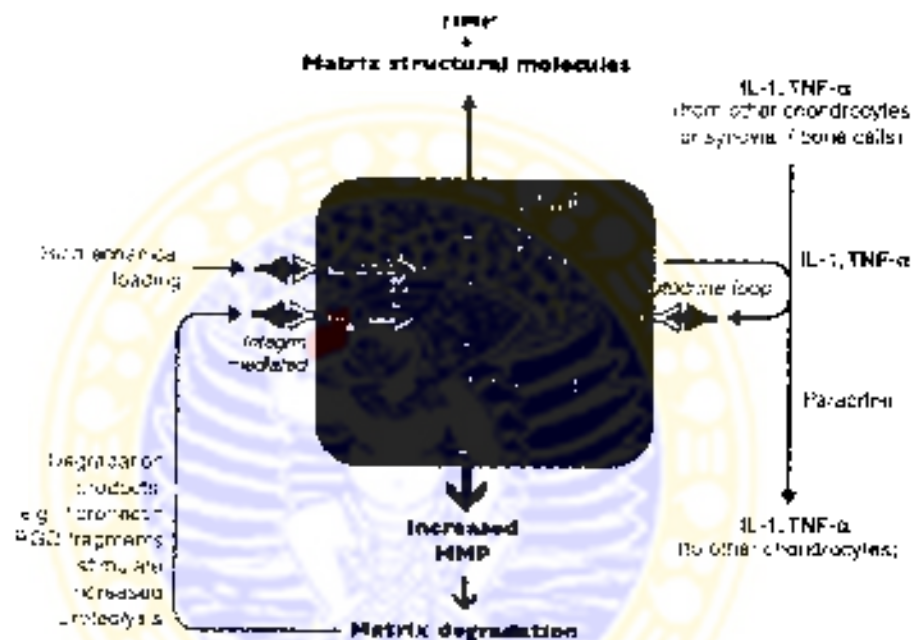


Figure 2.10: Response of chondrocytes to mechanical loading. Mechanical loading stimulates matrix degradation, which produces

Gambar 2.10: Respon kondrosit terhadap gaya biomekanik, sitokin dan produk degradasi matriks ekstraseluler.

Ketertarikan lain tentang gaya biomekanik, fragmen produk degradasi ECM akan memicu kondrosit untuk mengeluarkan IL-1 dan TNF- $\alpha$  yang juga merupakan proses sitokin dan parakrin. Kemudian kondrosit akan mengeluarkan MMP-1, MMP-13, dan MMP-13 dikumpul dan *Matrix metalloproteinase diagnosis and treatment of osteoarthritis* (Klein, MK, 2001).

Selain peran enzim degradatif di dalam proses degradasi protein pada ECM yang telah ditunjukkan oleh para ahli, telah dibuktikan pula bahwa kondrosit dapat membentuk hidrogen peroksida yang merupakan sumber terbentuknya radikal hidroksil, namun hingga kini belum ada fakta yang membuktikan bahwa radikal bebas mempunyai peran yang berarti di dalam proses degradasi ECM pada sendi OA secara *in vivo* (Poole AR, 1995).

## 2.5 Peran Gangguan Biomekanik Sendi Diarthrodial dalam patogenesis OA

Faktor mekanik atau biomekanik dapat menyebabkan perubahan bentuk maupun struktur dari bahan biologik *in vivo*, termasuk diantaranya adalah tulang rawan sendi. Efek perubahan ini disebut "Hukum Wolff" dan banyak dipelajari dalam proses "*remodelling*" tulang. Pada akhir-akhir ini penelitian menunjukkan bahwa bila bentuk beban mekanik dari sendi tersebut dirubah, misalnya dengan cara immobilisasi ataupun dengan melakukan kegiatan yang berlebihan pada *in vivo*, maka terjadi perubahan yang berarti dari komposisi, struktur molekul, dan sifat mekanikal dari tulang rawan sendi. (Cawston TE, 1998).

Perubahan ini tampaknya "*reversible*" dan oleh karenanya mewakili suatu proses yang dinamik dari kondrosit untuk mempertahankan homeostasis. Pada keadaan tertentu *in vivo*, misalnya sendi lutut yang diinduksi dengan cara transeksi ligamentum *cruciatum* (ACL) terjadi instabilitas sendi ataupun dengan pengangkatan meniskus medial menjadi diskongruensi sendi, maka perubahan tersebut menjadi "*irreversible*". Perubahan yang terjadi adalah kerusakan dari struktur mikro,

gangguan metabolisme kondrosit dan komposisi biokimiawi, serta perubahan penurunan sifat menahan beban dan material dan tulang rawan sendi. Hal yang terakhir tersebut di atas menyebabkan sendi menuju keadaan yang disebut OA. (Setton L.A., *et al* 1999)

Banyak penelitian *in vitro* yang mempelajari tentang efek rangsang mekanik pada aktivitas metabolik dari kondrosit. Hingga kini tidak dapat dipungkiri bahwa gangguan lingkungan mekanik seperti stres, ketegangan, tekanan, aliran cairan interstitial, kondisi fisikokimiawi, dan efek elektrokinetik, dapat merubah metabolisme kondrosit secara bermakna. Ini berarti bahwa stres yang menyebabkan deformasi ECM akan menyebabkan aliran cairan dan ion, serta perubahan medan listrik. Hal ini mempengaruhi nutrisi dan sinyal transduksi kondrosit serta deformasi kondrosit sendiri, yang secara langsung mengontrol aktivitas metabolik kondrosit. Bagaimanapun juga hingga saat ini jalur sinyal transduksi yang dipakai oleh kondrosit untuk merespon perubahan lingkungan mekanik dari matriks ekstraseluler dalam mengontrol kejadian sintesis yang spesifik termasuk ekspresi gen, secara rinci belum diketahui (Mow V.C., *et al.*, 1995). Akan tetapi penelitian yang sama menyatakan bahwa perubahan tekanan atau biomekanik pada kondrosit secara *in vitro* menimbulkan sinyal mekanoelektrokimia, dimana aliran cairan interstitial dan ion pada ECM merupakan pembantar sinyal mekanik pada tulang rawan. Hal ini mempengaruhi perubahan bioaktivitas dan kondrosit. (Mow V.C., *et al.*, 1999). Penelitian lain menyebutkan bahwa kondrosit menerima dan merespon perubahan bentuk dan volumenya akibat perubahan mekanik pada periseluler matriks sebagai

sinyal-sinyal yang mengatur aktivitas biologik dan ekspresi gennya. (Guilak F., *et al.*, 1999.) Peneliti lain ( Tanaka S, *et al.*, 1998), menyebutkan bahwa protein kinase C (PKC) suatu enzim yang diaktivasi oleh hidrolisis inositol fosfolipid, merupakan enzim yang banyak berperan sebagai transduksi sinyal pada bermacam proses fisiologik, juga terlibat di dalam gangguan metabolisme kondrosit akibat stres mekanik. Meskipun peran sebenarnya dari PKC belum diketahui secara pasti, namun pada penelitian *in vitro* dengan memakai stres regangan secara siklik dan amplitudo tinggi yang dibebankan pada kondrosit menunjukkan penurunan sintesis proteoglikan dan hambatan terhadap aktivitas PKC. Selain itu pemberian aktivator PKC pada model transeksi ACL menghambat terjadinya progresivitas osteoarthritis. Dari dua data diatas dinyatakan bahwa PKC berperan di dalam patogenesis OA (Tanaka S, *et al.*, 1998).

Seperti diketahui tulang rawan sendi tidak mempunyai jonjot saraf dan pembuluh darah, sehingga rangsang (*impulses*) yang pada jaringan lain mengatur proses yang terjadi di tubuh, di dalam tulang rawan sendi rangsang tersebut tidak bisa memberikan informasi. Demikian pula respon imun seluler maupun humoral tampaknya tidak terjadi di tulang rawan sendi oleh karena monosit dan imunoglobulin, keduanya dikeluarkan dari jaringan berdasarkan ukurannya, sedangkan diketahui pula bahwa porus permukaan tulang rawan sendi ukurannya sangat kecil (lebih kurang 50Å) hanya dapat dilalui oleh molekul dengan ukuran kurang dari 20 kd. Oleh karena itu secara teoritis kondrosit akan menerima informasi sangat terbatas dengan melalui mekanisme baku yaitu melalui jalur neural, limfatik,



atau humoral, tetapi akan menerima informasi dengan melalui perubahan stres dan keregangan yang terjadi pada membran sel sebagai akibat perubahan gaya fisik yang terjadi pada jaringan matriks ekstraseluler (Mankin HJ, *et al.*, 1994).

Pada keadaan gangguan biomekanik sendi lutut akibat transeksi ACL akan mengakibatkan instabilitas sendi ke arah anterior yang lazim disebut instabilitas anterior. Derajat instabilitas anterior akan meningkat bila transeksi dikombinasi dengan pengangkatan meniskus (menisektomi) yang medial dan telah dibuktikan bahwa menisektomi medial meningkatkan lebih kurang 10% kelenturan ke anterior pada pemberian gaya 200 N di tibia (Shoemaker *and* Markolf, 1986). Telah diketahui pula bahwa meniskus memberikan fungsi stabilitas pada sendi lutut dengan cara meningkatkan kongruensi antara kondilus femur dan permukaan tibia yang relatif lebih rata. Pada penelitian menunjukkan bahwa pengangkatan meniskus (menisektomi) yang disertai dengan insufisiensi ACL menyebabkan peningkatan instabilitas atau translasi ke anterior sebesar 20% hingga 30%. (Woo SL-Y., *et al.* 2001). Sebagai akibat dari instabilitas tersebut akan timbul gaya mekanik yang berlebihan pada jaringan di dalam sendi termasuk gaya pada tulang rawan sendi. Peningkatan gaya mekanik dapat juga ditimbulkan oleh kontraksi otot pada saat pergerakan fisiologik dan aktivitas sehari hari (Woo SL-Y., 1995).

Gaya beban dan pergerakan pada sendi menunjukkan adanya rangsang secara luas terhadap respon metabolik di dalam tulang rawan. Imobilisasi atau pengurangan beban mengakibatkan penurunan dari isi dan sintesis GAG (*glycosaminoglycan*), sedangkan peningkatan beban dinamik dalam batas fisiologik akan menyebabkan

peningkatan dari isi dan sintesis GAG. Pelepasan komponen proteoglikan telah digunakan sebagai alat ukur dalam menentukan derajat atau tingkat kerusakan tulang rawan *in vitro* karena stres mekanik. Selain itu pada penelitian stres mekanik terhadap tulang rawan secara *in vitro* menunjukkan kematian sel kondrosit melalui proses apoptosis. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat sinyal yang menghubungkan antara rangsang mekanik dengan aktivasi rantai proses apoptosis. Salah satu kemungkinan adalah melalui jalur terbentuknya nitrik oksid ( $\text{NO}^*$ ), atau perubahan sitoskeleton pada stres mekanik, yang kemudian memicu terjadinya apoptosis.

Kematian sel kondrosit tampaknya berkaitan dengan degradasi atau kerusakan tulang rawan. Mengingat bahwa di dalam jaringan tulang rawan sendi tidak terdapat makrofag, maka dapat dipastikan tidak terjadi mekanisme fagositosis sel mati atau *apoptotic bodies*. Keadaan ini mengakibatkan kemungkinan sisa atau jejas *apoptotic bodies* kondrosit yang tertinggal dapat menyebabkan bertambahnya kerusakan jaringan dan berdampak terhadap perbaikan jaringan tulang rawan selanjutnya. (D'Lima DD, *et al.*, 2001)

## 2.6. Radikal Hidroksil sebagai Radikal Bebas Oksigen (*Reactive Oxygen Species = ROS*) terbentuk pada stres oksidatif.

Pengertian radikal bebas dalam ilmu kimia yaitu atom atau molekul (kumpulan atom atau senyawa) yang dapat menerima elektron, dan atomnya atau gugus luarnya memiliki elektron yang tidak berpasangan (*unpaired electron*). Oleh karena itu radikal bebas cenderung untuk mencari pasangan, dengan cara menarik

elektron dari senyawa lain sehingga bersifat magnetik dan sangat reaktif. Oleh sebab itu radikal bebas dapat berikatan dengan molekul lain pada sel misalnya protein, lemak tidak jenuh, DNA, dan dapat merusak sel tubuh. Radikal bebas dimasukkan di dalam golongan oksidan, oleh karena mempunyai kemiripan yaitu bersifat menerima elektron. Walaupun demikian tidak semua oksidan merupakan radikal bebas, dengan pengertian lain bahwa radikal bebas adalah oksidan tetapi tidak setiap oksidan adalah radikal bebas. Oksidan sendiri di dalam tubuh manusia berasal dari proses biologik normal (fisiologis), atau dari proses peradangan, namun oleh karena suatu sebab oksidan timbul dalam jumlah berlebihan. Di dalam keadaan proses fisiologi adanya oksidan diredam oleh proteksi tubuh dengan memproduksi antioksidan yang memadai. Pada keadaan tertentu timbul ketidak-seimbangan antara oksidan dan anti oksidan, dan keadaan ini disebut "*oxidative stress*". Radikal bebas merupakan suatu oksidan yang berbahaya, oleh karena selain reaktivitasnya yang tinggi juga mempunyai kecenderungan untuk membentuk radikal baru yang bila menjumpai molekul lain akan terbentuk suatu reaksi rantai (*chain reaction*). Reaksi rantai tersebut akan dapat berhenti bila radikal bebas tersebut dapat diredam (*quenched*). (Halliwell B and Gutteridge JMC, 1999).

Radikal hidroksil terbentuk dari pengaruh radiasi, melalui reaksi Fenton dimana hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) bereaksi dengan logam transisi  $Fe^{++}$  dan  $Cu^{++}$ , atau melalui reaksi Haber-Weiss, dimana radikal bebas oksigen (*superoxide*) bertemu dengan hidrogen peroksida dengan perantara logam  $Fe^{3+}$  dan  $Cu^{2+}$ . Hidrogen peroksida sendiri terbentuk dari reaksi superoksid dengan enzim *superoxide*

*dismutase* (SOD) dan ion  $\text{Cu}^{2+}$ . Kemampuan radikal hidroksil adalah membentuk reaksi rantai dengan abstraksi satu atom hidrogen dari membran sel dan terjadilah peroksidasi lipid yang selanjutnya menyebabkan terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa antara lain, malondialdehid (MDA), 9-hidroksi-nonenal, etana, dan pentana, yang kesemuanya memiliki daya perusak yang tinggi terhadap molekul sel. Radikal hidroksil sendiri sebagai salah satu bentuk radikal bebas berasal dari oksigen (lazim disebut ODFR atau *Oxygen derived free radicals*) dan telah dibuktikan dapat merusak proteoglikan dengan mengadakan fragmentasi dari rantai polipeptidanya (Dean RT, *et al.*, 1984), serta merusak makromolekul asam hialuronat yang merupakan tulang punggung proteoglikan (Kvam BJ, *et al.*, 1995).

Diketahui bahwa keadaan iskemia temporer yang diikuti dengan reoksigenisasi merupakan sumber terbentuknya radikal bebas melalui jalur oksidasi xanthin. Dalam hal ini adenosin trifosfat secara progresif dirusak selama iskemia dan mengeluarkan hipoxanthin, yang kemudian berfungsi sebagai substrat untuk xantin oksidase. Enzim ini berasal dari dehidrogenase yang dibentuk oleh *protease calcium-dependent* selama iskemia, dan pada saat reperfusi darah, maka spesies aktif oksigen akan terbentuk dan bereaksi dengan  $\text{H}_2\text{O}_2$  membentuk  $\text{OH}^\bullet$  (Baker MS, *et al.*, 1989; McCord JM, *et al.*, 1985; Granger DN, *et al.*, 1986).

## 2.7 Lipid peroksidasi menggambarkan stres oksidatif.

Lipid peroksidasi merupakan salah satu proses yang menggambarkan terjadinya stres oksidatif pada suatu jaringan, karena merupakan suatu rantai reaksi

yang terjadi sebagai konsekuensi dari terbentuknya radikal bebas dalam sel atau jaringan. Mekanisme tentang radikal bebas merusak sel telah disebutkan oleh Halliwell dan Gutteridge, 1989, yang secara garis besar mekanisme tersebut yaitu :

- (1) Bereaksi dengan asam nukleat, nukleotida, polisakarida, protein dan non protein thiol
- (2) Berikatan kovalen dengan komponen-komponen membran (protein, lemak, enzim, sistem reseptor dan transport)
- (3) Mengawali reaksi lipid peroksidasi

Lipid peroksidasi pertama kali diperkenalkan oleh Tapel (1962), sebagai gangguan oksidatif pada asam lemak tidak jenuh (*PUFA / polyunsaturated fatty acid*) (Halliwell B, Gutteridge JMC, 1999).

Membran sel dan organel sel mengandung banyak PUFA, yang sensitif terhadap serangan radikal bebas oleh karena mengandung dua atau lebih ikatan ganda karbon-karbon. Lipid peroksidasi pada umumnya dibagi dalam tiga fase yaitu fase permulaan (*initiation*), fase propagasi atau penggandaan (*propagation*) dan fase akhir (*termination*).

Setelah terjadi penarikan atom hidrogen yang mempunyai satu elektron dari ikatan C-H oleh radikal bebas pada fase permulaan, maka terdapat elektron yang tidak berpasangan tertinggal pada atom karbon, sehingga terbentuklah asam lemak radikal. Asam lemak radikal ini yaitu suatu radikal dengan pusat karbon (*carbon-centered radicals*), dengan mudah bereaksi dengan oksigen membentuk radikal asam lemak dengan berpusat pada oksigen (*oxygen-centered radicals*) yang disebut radikal lemak



peroksi atau *lipid peroxy radical* ( $\text{LOO}^\bullet$ ). Radikal lemak peroksi ini dapat menarik hidrogen dari PUFA di dekatnya membentuk hidroperoksid lemak (*lipid hydroperoxide*). Fase ini disebut fase propagasi dimana terjadi reaksi dari radikal peroksid dengan PUFA yang lain membentuk hidroperoksid dan radikal lemak yang baru, sehingga mempertahankan jumlah radikal di dalam reaksi berantai tersebut. Keterlibatan lipid peroksidasi di dalam proses patologik selain akibat bahan kimia yang toksik, telah banyak diketahui antara lain dalam arterosklerosis, diabetes, dan juga terjadi pada proses stres hipoksia reperfusi. (Comporti M, 1993).

Peroksidasi lemak melibatkan dekomposisi oksidatif n-3 dan n-6 PUFA (*polyunsaturated fatty acid*) dari membran fosfolipid dan menghasilkan komposisi kompleks *lipid hydroxyperoxide* dan produk akhir aldehidik antara lain MDA (malondialdehid), dan hidroksinonal. Pada OA didapatkan kecendrungan banyak mengandung n-6, sedangkan pada tulang rawan normal banyak mengandung n-9. (Tiku ML, *et al.* 2000.) Lipid hidroksiperoksid merupakan radikal bebas lemak yang dapat merusak senyawa lemak lain.

Beberapa radikal seperti halnya  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^\bullet$ , dan radikal berintikan karbon seperti  $\text{CCl}_4$  disebut mempunyai potensi untuk mengoksidasi PUFA, namun radikal hidroksil ( $\text{OH}^\bullet$ ) mempunyai reaktivitas lebih tinggi dan merupakan radikal yang dikatakan sebagai pencetus lipid peroksidasi. dengan reaksi



Salah satu produk dari oksidasi lemak/peroksidasi lipid adalah malondialdehid (MDA), terutama yang berasal dari asam lemak yang memiliki lebih

dari dua ikatan karbon, seperti halnya asam *linolenic*, *arachidonic*, dan *docosahexaenoic*. Oleh sebab itu MDA lazim dipakai sebagai indikator untuk stres oksidatif (Halliwell B and Gutteridge JMC, 1999).

Pada umumnya sel mempunyai mekanisme pertahanan menghadapi radikal bebas dengan cara melalui jalur non enzimatik maupun enzimatik seperti halnya :

- (1) Antioksidan, dimana menghambat pembentukan radikal bebas atau me non-aktifkan radikal bebas, sebagai contoh adalah vitamin E, vitamin A, dan vitamin C dan glutathion yang berada di sitosol.
- (2) Mengikat ion ion yang berfungsi menyimpan dan mengangkut/transport protein (mis. *Transferrin*, *ferritin*, *lactoferrin*, *ceruloplasmin*), dimana diketahui bahwa ion Fe (besi) dan Cu (tembaga) dapat mengkatalisator terbentuknya radikal bebas. Maka dengan mengikat ion tersebut dapat memperkecil terbentuknya  $\text{OH}^\bullet$ .
- (3) Enzim yang bertindak sebagai penghambat sistim pembentukan radikal bebas (dapat disebut juga antioksidan) dengan merusak anion hidrosiperoksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dan superoksid ( $\text{O}_2^-$ ). Enzim ini berada ditempat yang dekat dengan proses pembentukan oksidan, yaitu antara lain:
  - (a) Katalase, berada diperoxisom, merusak/menetralisir  $\text{H}_2\text{O}_2$
  - (b) Superoksid dismutase (SOD), yang dapat merubah superoksid radikal ( $\text{O}_2^-$ ) dengan reaksi  $2 \text{O}_2^- + 2 \text{H} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ . Golongan superoksid dismutase ini dapat berupa *manganese-superoxide*

*dismutase* (MnSOD) yang berada di mitochondria dan *copper-zinc-superoxide dismutase* (CuZnSOD) yang berada di sitosol

(c) Glutation peroksidase (GSH) juga melindungi dengan cara mengkatalisasi perusakan radikal bebas, misalnya  $2 \text{OH}^{\bullet} + 2 \text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$  dimana GSSG (glutation homodimer) adalah glutation yang teroksidasi.

(Cotran, *et al.* 1999).

Mekanisme pertahanan terhadap radikal bebas tersebut diatas dilakukan secara bertahap oleh organisme aerobik, yaitu garis pertama adalah pertahanan terhadap spesies oksigen dalam hal ini termasuk superoksid dismutase (SOD), katalase, glutation (GSH) peroksidase. Garis kedua melibatkan substansi kimia yang memperkecil terjadinya proses peroksidasi dari membran lemak. Termasuk golongan ini adalah *α-tocopherol* (vitamin E), dan sistim yang menghambat regenerasi terus menerus, bentuk ikatan membran dari GSH peroksidase, dan Fosfolipase A2. (Comporti M, 1993).

## 2.8 Penelitian kerusakan tulang rawan dengan hewan coba.

Model hewan coba dapat didefinisikan sebagai kelompok hewan homogen yang mempunyai persamaan biologik, dapat dirangsang untuk terjadinya proses biologik secara percobaan, dapat dipakai untuk penelitian ilmiah yang dengan segala keterbatasan bisa menyerupai penyakit pada manusia. Pada penelitian kerusakan tulang rawan khususnya pada OA, hewan coba berguna untuk mempelajari tentang

perubahan struktural dalam jaringan tulang rawan sendi, menentukan seberapa banyak faktor resiko yang dapat menyebabkan perubahan tersebut, dan akhirnya juga dapat mengevaluasi hasil pemberian obat-obatan. Oleh karena kesulitan mendapatkan jaringan sendi dengan OA pada manusia, dimana terdapat kelainan yang sukar untuk diteliti secara berurutan, maka penggunaan hewan coba merupakan salah satu cara yang dapat dipakai untuk melihat proses yang terlibat sejak dimulainya penyakit, baik tentang perubahan-perubahan morfologi, biokimiawi, metabolik, biologi molekulernya di dalam tulang rawan sendi. Sebagai contoh penelitian tentang bagaimana keseimbangan antara sintesis dan degradasi tulang rawan mempengaruhi progresivitas dari penyakit. (Brandt, K.D., 1999).

Terdapat beberapa cara untuk melakukan degradasi tulang rawan yang dapat dipakai sebagai model penyakit OA pada hewan coba, (Smith MM, Ghosh P, 2001), yaitu :

- (1) Menggunakan beberapa zat kimiawi yang disuntikkan secara intraartikuler yang menimbulkan perubahan patologik yang menyerupai OA. Misalnya dengan menyuntikkan cairan garam fisiologik 3 kali sehari intraartikuler pada sendi kelinci menimbulkan penurunan agregasi proteoglikan, penyuntikan dengan cairan garam 10% sebanyak 5 kali sehari menyebabkan hiperptasia sinovial, hipertrofi tulang rawan, dan pembentukan osteofit setelah 2 bulan. Pemakaian kortikosteroid intraartikuler dengan dosis tinggi pada tikus dan kelinci, akan menimbulkan artropati eksperimental, dan efek perusakan tulang rawan

(*chondrodestructive*) ini menimbulkan pertanyaan di dalam pemakaian kortikosteroid pada klinik yang sampai saat ini masih kontroversial, karena dalam penelitian lain *triamcinolone* salah satu bentuk kortikosteroid menurunkan pembentukan fibrilasi dan osteofit pada OA, tanpa menimbulkan kerusakan pada sendi marmut.

Pemakaian proteolitik enzim lazim juga digunakan untuk degradasi tulang rawan sendi seperti halnya papain, tripsin, hyaluronidase dan kolagenase pada hewan uji tikus kecil, tikus besar maupun kelinci. Beberapa penemuan didapat dari penelitian dengan metoda ini antara lain bahwa *ultrasound* dapat merangsang pertumbuhan tulang rawan setelah terjadi artropati stadium awal akibat papain. Demikian juga hyaluronan dengan berat molekul besar dapat mencegah kehilangan glikosaminoglikan dari tulang rawan kelinci yang dirangsang dengan papain.

Intraartikuler *monosodium iodoacetate* penghambat glikolisis seluler dipakai juga sebagai agen untuk merangsang perubahan tulang rawan menjadi OA pada sendi sendi ayam, tikus, marmut, kelinci dan kuda. Perubahan yang terjadi adalah perombakan dari proteoglikan. Bahan lain yang dipakai dalam golongan yang sama adalah *Copper II bisglycinate*. Bahan lain yang digunakan adalah sitokin spesifik seperti misalnya interleukin-1 (IL-1), pada kelinci dan tikus. Beberapa bahan lainnya yang digunakan adalah *zymosan*, *carrageenan* yang menimbulkan sinovitis



akut sehingga tidak memberikan gambaran OA melainkan artropati peradangan.

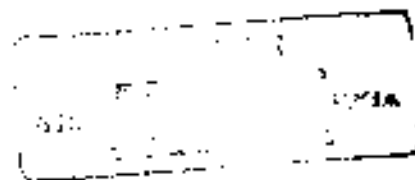
Penyuntikan intraartikuler dengan partikel tulang rawan (*autogenous*), menimbulkan degenerasi tulang rawan sendi pada hewan coba kelinci dan kuda, yang diakibatkan interaksi antara makrofag sinovial dengan partikel imunogenik.

- (2) Imobilisasi dari anggota gerak atau sendi sampai lebih kurang 5 - 6 minggu dapat menimbulkan perubahan artropati berupa penipisan lapisan tulang rawan sendi, keretakan hidrasi, penurunan isi proteoglikan, perubahan struktur proteoglikan, penurunan sintesis proteoglikan dan meningkatkan jumlah dan sintesis kolagen. Namun perubahan yang terjadi tidak serupa dengan apa yang terjadi pada tulang rawan OA, dimana pada kondrosit OA membentuk kelompok (*clones*) dan tetap aktif sampai tahap akhir, tetapi pada imobilisasi sendi terjadi nekrosis kondrosit, sehingga metoda ini tidak banyak digunakan lagi. Penelitian dengan metoda ini sering digunakan pada tikus, kelinci dan anjing.
- (3) Pada beberapa hewan coba tertentu terjadi perubahan tulang rawan secara spontan misalnya pada beberapa jenis anjing, tikus, marmut dan kerbau. Perubahan tersebut diakibatkan terdapat kelainan sendi berupa diskongruensi yang di dapat secara kongenital.
- (4) Transeksi atau pemotongan ligamentum *cruciatum* anterior (ACL), merupakan metoda yang sering dilakukan pada hewan coba kelinci dan

anjing. Model instabilitas yang ditimbulkan serupa dengan instabilitas yang terjadi dan umum didapatkan pada kasus penderita dijumpai diklinik.

Perubahan stres mekanik akibat instabilitas merupakan penyebab utama terjadinya degenerasi tulang rawan sendi, terutama beban gesekan (*shear stress*). Selain itu instabilitas sendi akan meningkatkan beban atau stres pada tulang rawan dengan adanya kontraksi otot yang berlebihan pada saat pergerakan dan aktivitas di dalam usaha untuk mengimbangi instabilitas sendi. (Woo SL-Y., *et al* 1995)

- (5) Menusektomi baik yang medial maupun lateral merupakan metoda yang lazim juga dipakai pada hewan coba kelinci, marmut, anjing dan domba. Meniskus mempunyai fungsi mekanika yang penting oleh karena ikut mendistribusikan hingga 50% beban sendi, dan menambah stabilitas sendi. Oleh sebab itu perubahan beban mekanik berupa stres berlebihan pada fokus atau titik tertentu menyebabkan degenerasi tulang rawan dan berakhir pada OA.
- (6) Metoda lain yang dipakai dengan cara melakukan aktivitas lari dan mendaki diatas *treadmill* pada hewan coba kelinci selama 5 hari. Pengurangan berat badan dengan cara osteotomi dan amputasi pada anjing. Perlukaan tulang rawan sendi dipakai untuk mewakili pasca trauma OA.



Penggunaan hewan coba sebagai model penelitian mempunyai keterbatasan bahwa struktur tulang rawan hewan coba tidak sepenuhnya sama dengan tulang rawan pada manusia. Analisis perbandingan antara tulang rawan sendi hialin pada manusia dan hewan coba eksperimen menunjukkan perbedaan seperti misalnya susunan anisotropik, tebal lapisan (zona), ukuran sel, massa matriks tiap sel, termasuk juga jaringan-jaringan lain disekitarnya seperti tulang rawan kalsifikasi (*calcified cartilage*), tulang subkondral. Sebagai contoh tebal tulang rawan pada kondilus femur manusia (~2-3 mm) lebih tebal 10 kali daripada tulang rawan kelinci (~200-300µm), pada manusia ketebalan zona tangensial menempati 2-3% daripada total ketebalan tulang rawan, sedangkan pada kelinci dewasa menempati 10% dari seluruh ketebalan tulang rawan. Sedangkan lapisan zona transisional perbedaannya adalah 5% pada manusia, 10% pada kelinci. Zona radial perbedaannya adalah 92% pada manusia, 80% pada kelinci. Namun diantara tulang rawan sendi manusia dan tulang rawan sendi kelinci terdapat perbedaan lebih sedikit daripada bentuk kondrosit. Sebagai contoh bahwa pada manusia maupun kelinci di lapisan zona tangensial, kondrosit berbentuk pipih, dan lonjong, dikelilingi oleh anyaman serabut kolagen yang halus dan pada daerah tersebut mengandung sedikit proteoglikan. Perbedaannya hanyalah kondrosit pada manusia bentuknya lebih lonjong, sedangkan pada kelinci lebih pipih.

**BAB 3****KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS****3.1 Kerangka Konsep****3.1.1 Gangguan Biomekanik Sendi dan Kerusakan ECM**

Patogenesis dari OA sekunder salah satunya dimasukkan dalam kategori kegagalan tulang rawan sendi normal dalam merespon terhadap gaya fisik yang terjadi pada ECM, yang mengakibatkan terjadinya ketidak-seimbangan pada proses sintesis atau anabolisme dan proses degradasi atau katabolisme dari komponen ECM antara lain proteoglikan.

Transeksi ACL menyebabkan timbulnya keadaan instabilitas sendi lutut, dan bila disertai dengan pengangkatan meniskus medial, maka instabilitas akan meningkat sebesar lebih kurang 10% hingga 30% (Schoemaker SC, Markolf KL, 1986., Woo SL-Y, 2001). Telah diketahui bahwa transeksi ACL dan menisektomi secara terpisah keduanya mengakibatkan sendi lutut mengalami proses degenerasi menjadi OA sekunder (Woo SL-Y, 1995).

Teori menyebutkan bahwa kemungkinan instabilitas menimbulkan gaya fisik meningkat akibat peningkatan kontraksi otot sebagai kompensasi terhadap instabilitas. Hal ini diikuti dengan penurunan modulus regangan, modulus tekanan dan kenaikan permeabilitas hidraulik dari ECM, yang kesemuanya menyebabkan deformasi matriks (Mankin HJ. *et al.*, 1994). Deformasi matriks tersebut akan menimbulkan perubahan tekanan hidrostatis, aliran cairan, ion dan tekanan osmotik,

serta deformasi sel kondrosit pula. Perubahan keadaan tersebut menyebabkan terjadinya perubahan lingkungan mekanik pada sel kondrosit. Tekanan hidrostatik akan menyebabkan perubahan dalam pompa membran  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , atau melalui efek langsung pada sitoskeleton. Aliran cairan, aliran ion dan tekanan osmotik akan mempengaruhi perubahan pH, mempengaruhi peningkatan beberapa aktivator seperti sitokin, faktor pertumbuhan, dan mempengaruhi perubahan potensial listrik. Semua perubahan tersebut secara bersama bertindak sebagai mekanisme transduksi sinyal terhadap sel kondrosit dalam mengontrol aktivitas metaboliknya. Demikian pula halnya dengan kondrosit yang pada penelitian memakai mikroskop *confocal scanning laser* akan mengalami perubahan bentuk atau deformasi, perubahan bentuk sel ini disalurkan ke organel intraseluler dengan melalui mikrofilamen. Mikrofilamen seperti *vinculin*, *talin*,  $\alpha$ -*actinin*, *gelsolin* akan berasosiasi dengan protein. Selanjutnya mikrofilamen yang berasosiasi dengan protein ini dihubungkan dengan ECM oleh integrin, dan diteruskan sebagai sinyal yang akan mengatur ekspresi gen dalam sel. Kemungkinan lain perubahan bentuk sel tersebut akan diteruskan ke dalam sinyal intraseluler melalui aktivasi dan inaktivasi regangan rantai ion pada membran plasma sel yang diterjemahkan sebagai "*second messenger*" seperti halnya siklik AMP atau  $\text{Ca}^{++}$  (Mow VC, *et al.*, 1995).

Adanya sinyal tersebut akan mempengaruhi metabolisme kondrosit yang berperan sebagai regulator dalam homeostasis dan ECM. Dengan adanya sinyal tersebut akan terjadi peningkatan sintesis enzim degradatif oleh kondrosit yang mengakibatkan

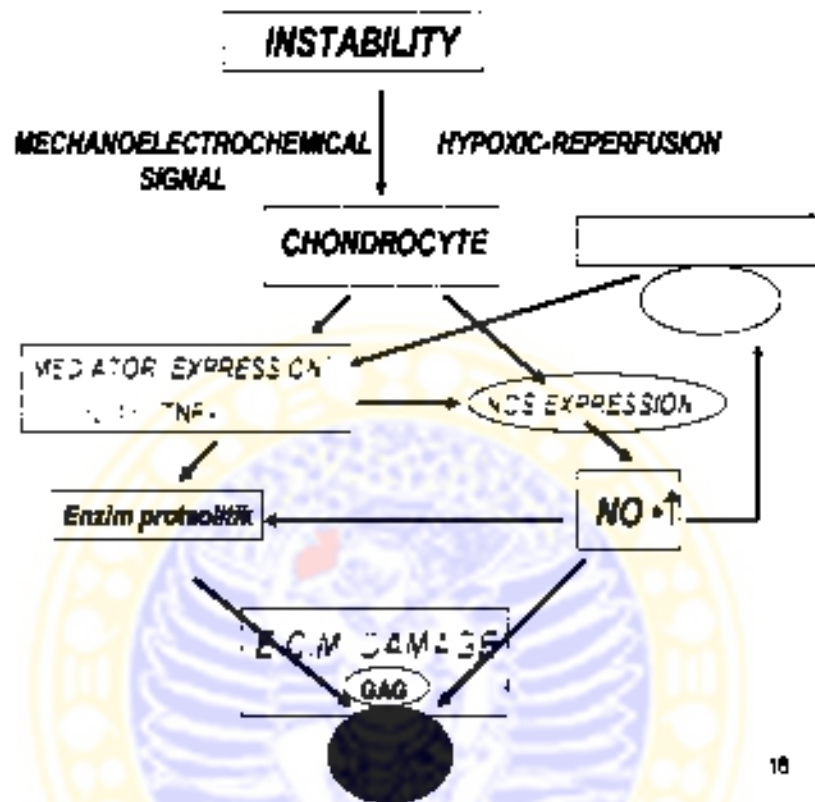


terjadinya proses katabolisme dari ECM termasuk degradasi dan proteoglikan dan kolagen (Mow *et al.*, 1995).

*Pro-inflammatory Cytokines* IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  merupakan mediator yang berperan penting di dalam proses kerusakan matriks ekstraseluler IL-1 mula mula dibentuk oleh sel selaput sinovia yang kemudian masuk ke dalam matriks ekstraseluler melalui difusi cairan sinovial dan meningkatkan ekspresi enzim proteolitik pada gen di kondrosit dalam hal ini metalloprotease. Namun kondrosit sendiri dengan adanya sinyal mekanoelektrokimia akan mengeluarkan [L-] yang secara simultan akan lebih meningkatkan ekspresi dari enzim metalloprotease. Selain itu IL-1 mempengaruhi pula meningkatnya ekspresi iNOS oleh kondrosit. Peningkatan ekspresi iNOS ini dapat juga disebabkan oleh karena adanya sinyal mekanoelektrokimia. Peningkatan iNOS akan menyebabkan meningkatnya pembentukan NO $^+$ , dimana secara bersama-sama dengan enzim metalloprotease akan merusak matriks ekstraseluler ( Pelletier JM, 1998 )

Pada penelitian menunjukkan bahwa tulang rawan mempunyai sifat viskoelastik, yang terdiri dari dua macam yaitu viskoelastik bergantung-aliran (*flow-dependent viscoelasticity*), didapatkan pada stres kompresi (*compression stress*), dan viskoelastik tidak bergantung-aliran (*flow-independent viscoelasticity*), yang didapatkan pada stres gesekan (*shear stress*). Pada stres kompresi mula mula terjadi peningkatan tekanan di dalam matriks ekstra seluler (ECM), yang diikuti difusi cairan ECM keluar kemudian terjadi keseimbangan Pada stres gesekan volume/isi cairan ECM tidak berubah dan terjadi pemberhentian aliran cairan ECM. Kadaan ini

akan memperburuk keadaan nutrisi di dalam tulang rawan sendi termasuk nutrisi kondrosit (Mankin HJ., 2000). Gambar 3.1 menggambarkan konsep kerusakan ECM akibat gangguan biomekanik instabilitas.



**Gambar 3.1. Bagan gangguan biomekanik instabilitas menimbulkan kerusakan ECM**

**Keterangan :** Instabilitas menimbulkan perubahan mekanik, biokimia dan aliran ion yang merupakan sinyal mekano-elektrokimia bagi kondrosit yang akan mengekspresikan sitokin IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  serta iNOS. Kedua sitokin dan NO $^+$  yang diproduksi dan iNOS meracu kondrosit mengeluarkan enzim proteolitik yang merusak ECM. NO $^+$  akan menghambat sintesis ECM, menyebabkan apoptosis dan kematian sel kondrosit. Tanda pangah terputus warna hijau merupakan hipotesis penelitian ini yang akan dibuktikan.

### 3.1.2 Gangguan biomekanik instabilitas menimbulkan terjadinya stres oksidatif dan kerusakan tulang rawan sendi

Radikal bebas oksigen *ROS*, diduga merupakan penyebab dari bermacam-macam penyakit pada manusia. Sel yang berperan di dalam radang sendi seperti halnya makrofag, netrofil, limfosit dan sel endotelial secara *in-vitro* mempunyai kemampuan untuk menghasilkan *ROS* dan merusak biomolekul seperti lipid, DNA, protein, karbohidrat, proteoglikan, dan glikosaminoglikan. Pada beberapa percobaan menunjukkan bahwa olah raga pada sendi lutut manusia yang mengalami peradangan, menjadikan tekanan di dalam sendi meningkat melebihi tekanan perfusi kapiler di sinovia, dan ini menyebabkan keadaan hipoksia pada jaringan sendi. Keadaan ini akan diikuti tekanan yang normal pada saat pergerakan selesai. Pada proses tekanan yang meningkat di atas nilai ambang yang diikuti dengan tekanan normal, maka akan terjadi proses hipoksia temporer yang diikuti oleh proses reperfusi jaringan mengakibatkan terbentuknya radikal bebas, yang merusak lemak (*lipids*), dan IgG di dalam sendi. Hal ini konsisten dengan hipotesis yang menyatakan bahwa radang sinovia yang terus menerus diakibatkan hipoksia reperfusi karena olah raga melalui peran dan *ROS* (Blake DR, *et al.*, 1989). Disebutkan di dalam penelitiannya bahwa terjadi penurunan tekanan oksigen di cairan sinovia hingga 33%, pada saat kontraksi isometrik otot *quadriceps*. Dengan meningkatnya hipoksia, terjadi pergeseran metabolisme sel kondrosit ke anaerobik dengan peningkatan pemecahan purin dan terbentuknya xantin dan hipoxantin.

Pembentukan radikal bebas oksigen dimulai dari keadaan hipoksia dimana oksigen terbatas untuk keperluan memproduksi ATP. Dalam hal ini enersi dalam sel turun dan tidak dapat mempertahankan jumlah ion yang cukup menembus membran hingga terjadi penumpukan ion kalsium. Keadaan ini mengakibatkan aktivasi protease merubah xanthin dehidrogenase menjadi xanthin oxidase. Dalam waktu bersamaan, penurunan ATP mengakibatkan peningkatan dari konsentrasi AMP, yang kemudian dikatabolisasi menjadi adenosin, inosin dan akhirnya menjadi hipoxanthin. Seperti halnya dengan xanthin, hipoxanthin merupakan substrat punn yang dapat dioksidasi oleh enzim xanthin oksidase dengan adanya oksigen pada saat reperfusi atau reoksigenasi. Dengan terjadinya oksidasi maka akan terbentuk radikal bebas superoksida. Pembentukan radikal hidroksil dimulai setelah terbentuknya superoksida yang kemudian bereaksi dengan superoksida dismutase dan ion  $\text{Cu}^{2+}$  menjadi hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida melalui reaksi Fenton dan reaksi Haber-Weiss akan membentuk radikal hidroksil (McCord JM, 1985., Granger DN, *et al.*, 1986).

Gangguan biomekanik instabilitas sendi menyebabkan terjadinya peningkatan tekanan pada permukaan tulang rawan khususnya pada saat pergerakan. Tekanan ini diteruskan ke dalam jaringan ECM tulang rawan sendi, melalui komponen kolagen, proteoglikan, jaringan periseluler dan menyebabkan deformasi kondrosit. Tekanan yang berlebihan menimbulkan tekanan pembengkakan (*swelling pressure*) yang meningkat pula di dalam matriks periseluler, sehingga keadaan ini selain menyebabkan deformasi kondrosit, kemungkinan juga akan menyebabkan keadaan aliran transport oksigen terganggu dan menimbulkan hipoksia kondrosit. Keadaan

hipoksia akan diikuti dengan proses reperfusi pada saat tekanan menjadi normal kembali. Dengan demikian terjadi stres oksidatif dan pembentukan radikal bebas oksigen, yang diantaranya adalah radikal hidroksil.

Alur konsep gangguan biomekanik instabilitas menimbulkan stres oksidatif dan menyebabkan kerusakan tulang rawan sendi dapat dilihat pada gambar 3.2

### 3.1.3 Hubungan stres instabilitas, radikal hidroksil, nitrik oksid dan kerusakan ECM.

Radikal hidroksil merupakan salah satu bentuk radikal bebas oksigen yang paling reaktif, dapat merusak lemak, protein, DNA, karbohidrat. (Pierre JL, 1995). Selain itu radikal hidroksil dapat memicu terjadinya peroksidasi lemak (*lipid peroxidation*) pada keadaan proses hipoksia-reperfusi (Comporti M, 1993). Radikal hidroksil dapat merusak juga proteoglikan, kolagen, asam hialuronat, dan protein lain seperti fibronectin, elastin, laminin (Baker MS, 1994).

Selain merusak proteoglikan dan kolagen dari ECM dengan fragmentasi rantai polipeptida, radikal bebas dapat menimbulkan apoptosis pada sel bila kapasitas antioksidan ditampai (Stoian I., *et al.*, 1996). Pada OA ditemukan penurunan selularitas dari tulang rawan sendi yang diasosiasikan dengan ditemukannya sel kondrosit yang mengalami apoptosis dan produksi radikal bebas  $\text{NO}^*$ . Kedua fenomena ini diperkirakan timbul oleh karena radikal bebas  $\text{NO}^*$  dapat menimbulkan apoptosis kondrosit dan terdapat interaksi antara apoptosis dengan degradasi ECM. (Hashimoto S., *et al.*, 1998). Diketahui bahwa  $\text{NO}^*$  dapat membentuk radikal hidroksil melalui reaksi dengan superoksida membentuk peroksinitrit (Stamler JS., *et*



*al.*, 1992). Beberapa peneliti lain sebelumnya telah menunjukkan bahwa kondrosit mempunyai kemampuan untuk memproduksi radikal bebas oksigen seperti halnya superoksida, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil (Roughley PJ., *et al.*, 1992).

Radikal bebas oksigen (ROS) memicu kerusakan makromolekul sel yaitu melalui peroksidasi lipid, perusakan DNA dan inaktivasi enzim, serta dapat memicu terjadinya apoptosis sel termasuk kondrosit (Stojan I., *et al.*, 1996; Hashimoto S., *et al.*, 1998). Selain itu radikal bebas oksigen yang dihasilkan melalui jalur enzimatik oksidasi xantin dan hipoxantin, secara model *in vitro* telah dibuktikan merusak jaringan tulang rawan hidung sapi (*bovine nasal cartilage*). Kerusakan tulang rawan tersebut dapat dihambat secara kuat oleh antioksidan superoksida dismutase. Fenomena lain telah dibuktikan bahwa radikal bebas oksigen juga mengaktifkan enzim proteolitik menyebabkan kerusakan tulang rawan lebih berat. (Burkhardt H., *et al.*, 1986). Sebelum penelitian di atas, telah dibuktikan pula secara *in vitro* bahwa dua macam radikal bebas oksigen yaitu radikal hidroksil dan superoksida dapat merusak proteoglikan dengan mudah, dengan cara merusak rantai polipeptida (Dean RT., *et al.*, 1984). Radikal hidroksil sebagai salah satu dari radikal bebas oksigen, dalam penelitian secara *in vitro* terbukti berperan dalam degradasi matriks tulang rawan (Shingu M., *et al.*, 1994). Secara *in vitro* pula radikal bebas oksigen dapat merusak bermacam makromolekul termasuk di dalamnya adalah makromolekul asam hialuronat yang merupakan tulang punggung dari proteoglikan kompleks (Kvam BJ., *et al.*, 1995). Peneliti lain juga telah membuktikan secara *in vitro* bahwa radikal hidroksil menyebabkan fragmentasi dari polisakarida yang terkandung dalam

proteoglikan (Schiller J., *et al.*, 1998). Efek dari beban mekanik terhadap NO<sup>•</sup> dan ekspresi gen protein matriks secara *in vitro* menunjukkan peningkatan kadar NO<sup>•</sup> yang ikut mempengaruhi pengaturan ekspresi gen protein matriks (Lee MS, *et al.*, 2002). Selain itu produksi NO yang berlebihan, akan bereaksi dengan oksidan lain seperti halnya O<sub>2</sub><sup>-</sup>, akan menghambat sintesis matriks dan meningkatkan proses kerusakan tulang rawan sendi (Abramson SB, *et al.*, 2001; Abramson SB, 2001a). Dari semua teori di atas telah diungkapkan bahwa di dalam proses patogenesis OA yang ditandai dengan adanya perusakan proteoglikan sebagai salah satu komponen dari ECM, disebabkan karena terbentuknya aktivator sitokin dan enzim degradatif/proteolitik. Selain itu secara *in vitro* telah dibuktikan pula kerusakan ECM disebabkan karena pengaruh radikal hidroksi. Hubungan secara *in vivo* antara gangguan biomekanik instabilitas, radikal hidroksi, nitrik oksid dan kerusakan ECM tulang rawan sendi pada penelitian ini dapat dilihat pada gambar 3.3

#### 3.1.4 Kerusakan Proteoglikan menyebabkan Osteoarthritis

Proteoglikan merupakan makromolekul yang kompleks yang terdiri dari protein inti yang berikatan secara memanjang dengan rantai polisakarida (glikosaminoglikan). Proteoglikan disebut juga protein-polisakarida atau mukopolisakarida. Secara garis besar terdapat tiga macam glikosaminoglikan dalam tulang rawan yaitu : khondroitin sulfat, keratan sulfat, dan dermatan sulfat. Sebagian besar dari proteoglikan merupakan molekul besar dengan kumpulan glikosaminoglikan dan protein inti yang disebut *aggrecan*. Bersama dengan kolagen, kumpulan *aggrecan* yang berikatan dengan asam hialuronat membentuk suatu jalinan

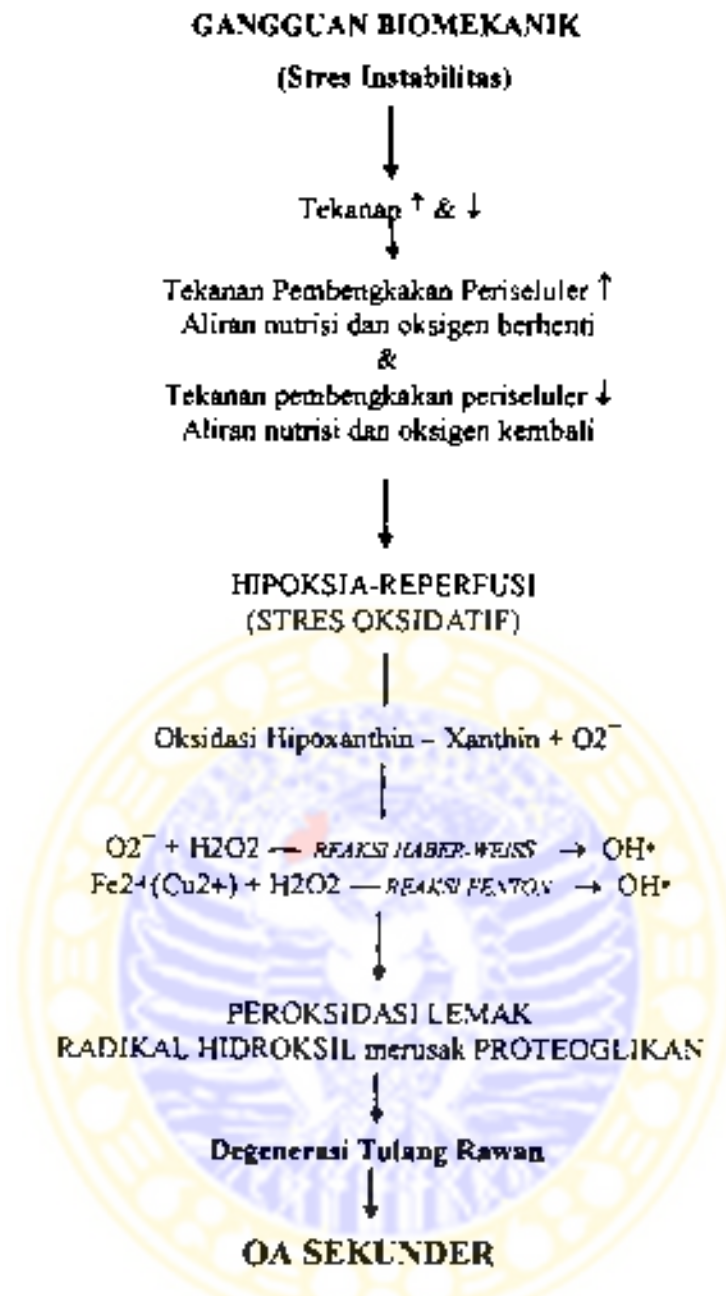
organisasi molekul matriks tulang rawan yang kuat. (Mankin HJ, *et al.*, 1994). Kerusakan proteoglikan yang diakibatkan oleh radikal bebas oksigen terjadi pada ikatan glikosidik glikosaminoglikan (Schiller J., *et al.*, 1998). Terjadinya ketidakseimbangan antara sintesis dan kerusakan proteoglikan, selain akibat radikal bebas, juga pengaruh aktivasi enzim proteolitik dan hambatan sintesis oleh IL-1 dan TNF- $\alpha$ , mengarah ke degradasi ECM dan terjadinya OA.

Seperti diketahui bahwa proteoglikan merupakan komponen penting dari matriks tulang rawan sendi, oleh sebab itu kerusakan proteoglikan akibat enzim proteolitik ataupun lainnya akan menyebabkan degenerasi tulang rawan dan mengarah ke OA. Hal ini dibuktikan terjadinya pelepasan GAG yang meningkat pada OA sekunder akibat beban berlebihan yang diukur dengan 1-9 DMMB (D'Lima DD, *et al.*, 2001).

Dari uraian di atas dapat disimpulkan suatu pendapat ilmiah bahwa gangguan biomekanik berupa instabilitas sendi dapat menyebabkan peningkatan tekanan dalam sendi yang mengakibatkan selain terjadinya deformasi kondrosit, juga mengakibatkan stres oksidatif pada kondrosit. Oleh karena terjadi proses hipoksia-reperfusi pada saat pergerakan dan istirahat. Terjadinya penurunan ATP akibat hipoksia menumbulkan hipoxantin yang akan dirubah oleh xantin oksidase menjadi xantin dan superoksida pada saat reperfusi. Superoksida kemudian bereaksi dengan *super oxide dismutase* (SOD) dan ion  $\text{Cu}^{++}$  membentuk hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) yang kemudian melalui reaksi Fenton membentuk radikal hidroksil. Selain itu superoksida yang terbentuk akan bereaksi dengan  $\text{H}_2\text{O}_2$  melalui reaksi Haber-Weiss membentuk radikal hidroksil pula. Radikal hidroksil yang terbentuk akan

menyebabkan peroksidasi PUFA (*Polyunsaturated fatty acid*) dan juga merusak komponen ECM terutama proteoglikan dan kolagen, yang dibuktikan secara *in vitro*. Kerusakan tersebut mengakibatkan degenerasi ECM yang mengarah ke OA sekunder. Pada gambar 3.2 menunjukkan alur konsep penelitian yang diterangkan sebagai berikut: Pada saat tekanan meningkat akibat translasi kedua permukaan tulang rawan, terjadi tekanan periseluler meningkat dan pemberhentian aliran nutrisi dan oksigen di matriks ekstraseluler, menyebabkan kondrosit dalam keadaan hipoksia temporer. Pada saat tekanan kembali normal, terjadi aliran nutrisi dan oksigen kembali, menyebabkan keadaan reperfusi kondrosit. Hal ini menimbulkan proses hipoksi reperfusi kondrosit dengan hasil radikal oksigen yang kemudian menyebabkan terjadinya stres oksidatif berupa peroksidasi lemak.

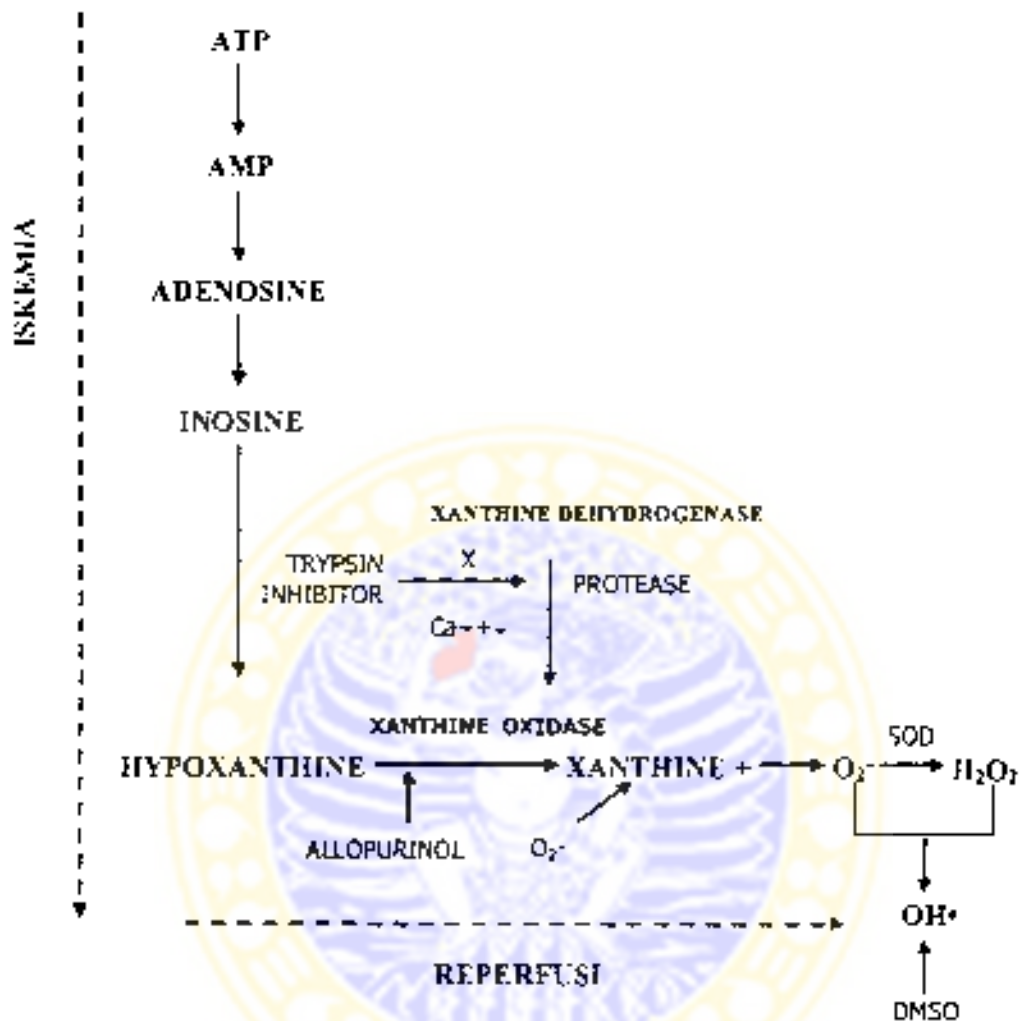




**Gambar 3.2** Alur konsep stres instabilitas menyebabkan kerusakan proteoglikan

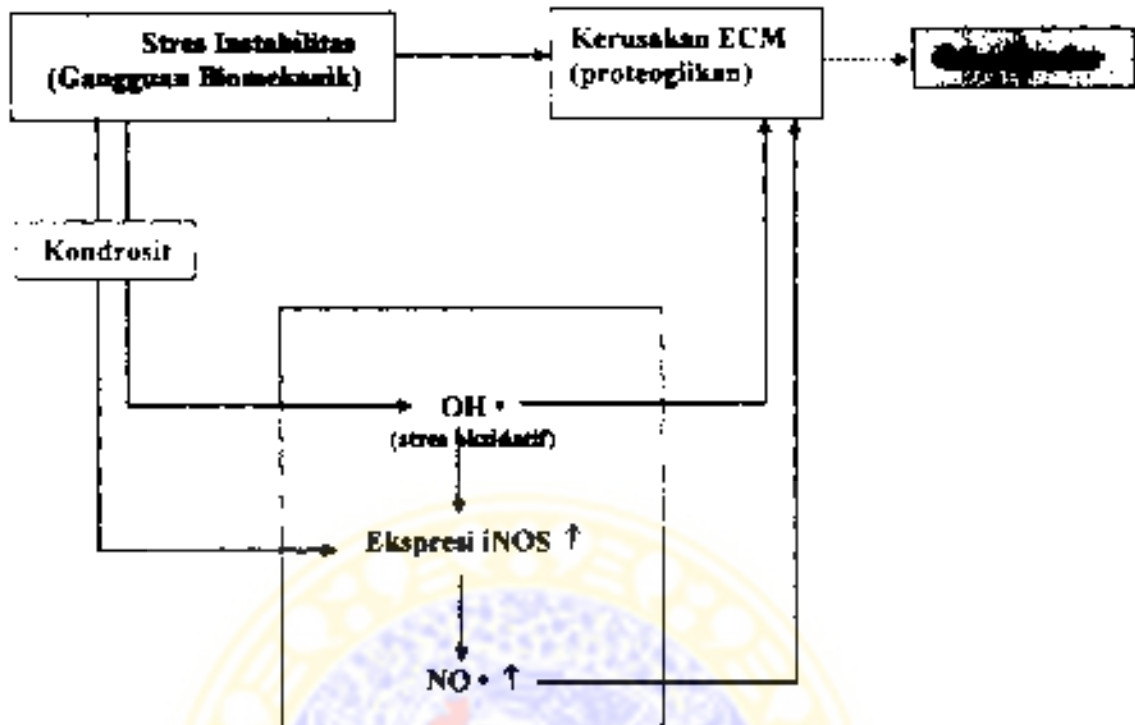
**Keterangan:** Kerangka alur konsep penelitian tentang gangguan biomekanik instabilitas, terjadinya stres oksidatif, pembentukan radikal hidroksil, peroksidasi lemak, kerusakan proteoglikan dan terjadinya OA Sekunder





Gambar 3.3 Iskemia/hipoksi reperfusi injury

Keterangan: Mekanisme pembentukan radikal hidroksi pada keadaan iskemia dan reperfusi (Granger N, et al, 1986)



**Gambar 3.4 Kerangka Konsep Penelitian**  
**Hubungan stres instabilitas, OH•(stres oksidatif), NO• dan kerusakan ECM**

Keterangan  
 Stres oksidatif menggunakan parameter MDA dan SOD  
 Kerusakan proteoglikan (ECM) menggunakan parameter GAG  
 Nitrik oksid. menggunakan parameter iNOS  
 Stres instabilitas merupakan sinyal mekanik bagi kondrosit yang mengekspresikan iNOS. Kemudian iNOS akan memproduksi NO• dan merusak proteoglikan  
 Selain itu stres instabilitas akan menimbulkan proses hipoksi reperfusi yang memproduksi radikal hidroksi (OH•) dan menimbulkan stres oksidatif berupa peroksidasi lemak (MDA dan SOD). Dan OH• memacu peningkatan ekspresi iNOS

### 3.2 Hipotesis

Berdasarkan kerangka konsep pada uraian di atas, dapat dirumuskan hipotesis penelitian sebagai berikut :

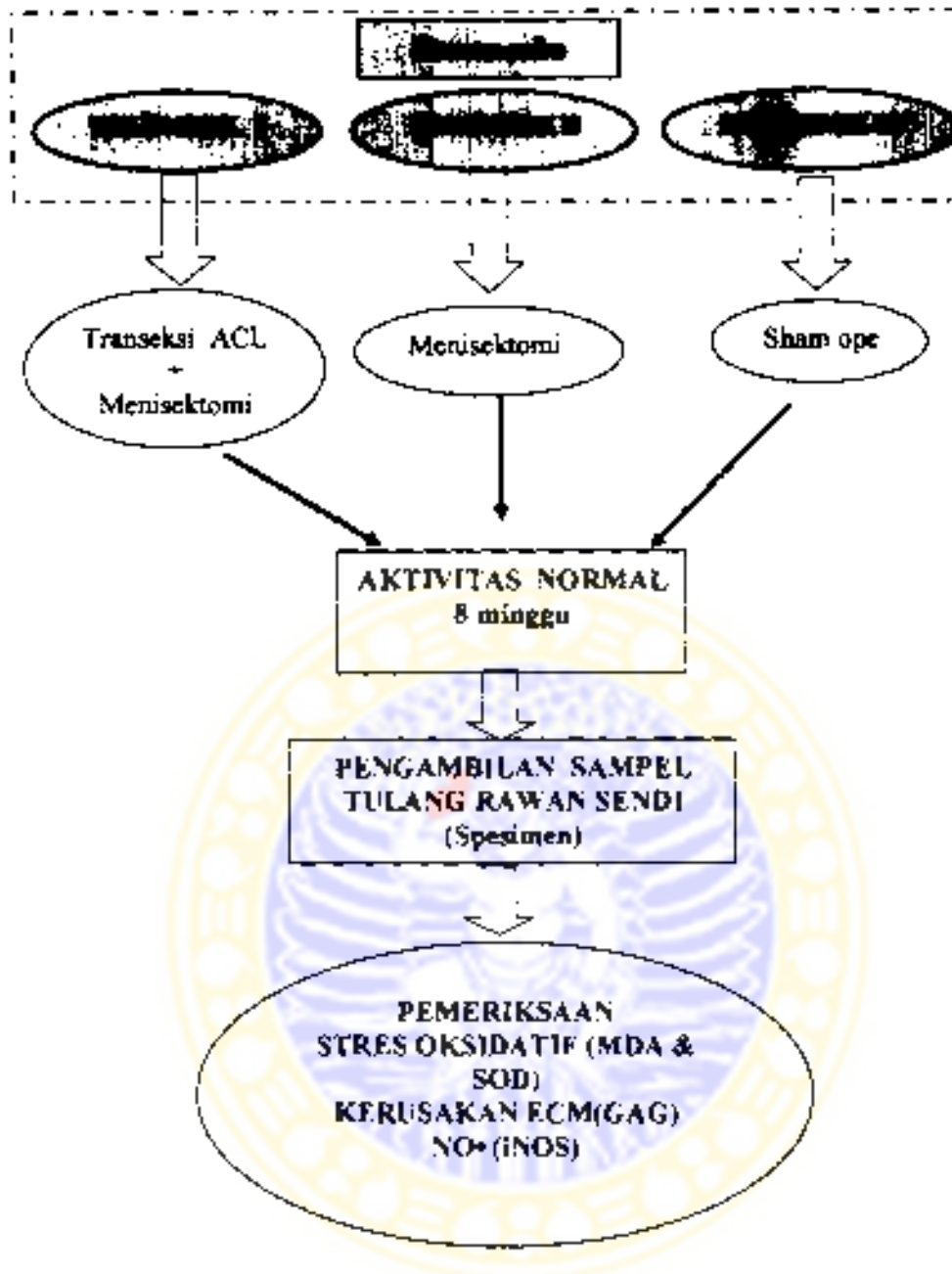
Stres oksidatif akibat oksigen radikal berperan dan sebagai faktor penyebab dalam patogenesis kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi yang mengalami gangguan biomekanik instabilitas, dan mengakibatkan OA sekunder.

Pembuktian hipotesis tersebut dilakukan melalui pengujian beberapa sub-hipotesis, yaitu:

- (1) Derajat instabilitas sendi berpengaruh terhadap derajat kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi.
- (2) Derajat instabilitas sendi berpengaruh terhadap derajat stres oksidatif pada tulang rawan sendi.
- (3) Stres oksidatif merusak proteoglikan tulang rawan sendi, secara *in vivo*.
- (4) Mekanisme peran stres oksidatif terhadap kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi, melalui jalur pengaruh langsung dan berpengaruh tidak langsung melewati ekspresi iNOS yang meningkat.
- (5) Gangguan biomekanik instabilitas sendi terhadap proses patogenesis kerusakan proteoglikan secara non enzimatis, mekanismenya melewati dua jalur : (a) kondrosit - ekspresi iNOS - kerusakan matriks, dan (b) kondrosit - oksidatif stres - kerusakan matriks

**BAB 4****METODE PENELITIAN****4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian dilakukan dengan cara eksperimental, rancangan yang digunakan adalah *Randomized Control-Group Posttest Design*, memakai kelinci sebagai hewan coba. Perlakuan berupa gangguan biomekanik sendi, yaitu instabilitas sendi, dengan cara lutut hewan coba dijadikan tidak stabil (instabil) dengan kategori derajat berat dan sedang. Hewan coba dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kelompok pertama, perlakuan instabilitas berat, dengan melakukan transeksi atau pemotongan ACL (*anterior cruciate ligament*) dan pengangkatan meniskus medial (*medial menisectomy*), kelompok kedua, perlakuan instabilitas sedang dengan melakukan pengangkatan meniskus medial saja; dan kelompok ketiga, tanpa perlakuan (sebagai kontrol), dengan melakukan operasi membuka sendi dan menjahit kembali (*Sham operation*). Pemilihan obyek penelitian untuk pelaksanaan pengelompokan dan pemberian perlakuan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) atau *Randomize Completely Design (RCD)*, mengingat hewan coba dan bahan penelitian dapat dikatakan mendekati homogen. Dengan desain ini dimungkinkan setiap hewan coba berpeluang sama untuk mendapatkan suatu perlakuan tertentu ataupun sebagai kontrol. Dipilihnya hewan coba kelinci, oleh karena merupakan hewan coba yang baku bagi percobaan perlakuan pada sendi (Smith MM, Ghosh P, 2001). Selain itu mudah didapat dengan umur, jenis kelamin, berat badan yang tidak jauh berbeda, dan tehnik operasi lebih mudah



Gambar 4.1 Rancangan Penelitian



#### 4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan di Laboratorium MIPA Universitas Brawijaya Malang.

Waktu penelitian dilakukan selama 5 bulan, yaitu bulan Juli 2002 sampai dengan Nopember 2002.

#### 4.3 Sampel dan Replikasi

Obyek penelitian berupa hewan coba kelinci, jenis kelamin betina, dengan umur, dan berat badan tidak jauh berbeda. Kelinci ditentukan pada keadaan masa pertumbuhan tulang dewasa (*skeletally mature*), yaitu pada umur di atas 2 bulan. Dalam penelitian eksperimental, besar sampel setara dengan jumlah ulangan. Mengingat tujuan utama dalam penelitian ini adalah membuktikan ada tidaknya pengaruh gangguan biomekanik terhadap proses stres oksidatif, yang mengakibatkan kerusakan pada matriks, maka jumlah ulangan dapat dihitung berdasarkan tingkat ketelitian data, dengan mempertimbangkan kestabilan ragam galat. Untuk mencapai tujuan tersebut analisis data dilakukan dengan F-tes, melalui ANOVA, sehingga perhitungan jumlah ulangan dapat ditentukan dengan merujuk pada derajat bebas galat (db-galat) atau *degrees of freedom error (df-error)*, yaitu data cukup teliti apabila ragam galat stabil dan akan tercapai dengan db-galat > 15.

dilakukan secara acak terhadap seluruh individu kelinci (18 ekor). Teknik randomisasi dengan prosedur sebagai berikut :

- (1) Membuat nomor untuk setiap perlakuan misalnya A1,A2,A3,A4,A5,A6 untuk perlakuan transeksi ACL dan memsektomi, B1,B2,B3,B4,B5,B6 untuk perlakuan memsektomi saja, C1,C2,C3,C4,C5,C6 untuk kontrol.
- (2) Melakukan undian terhadap nomor tersebut, untuk urutan randomisasi perlakuan dan ulangan, diperoleh seperti pada baris kedua Tabel 4.2.
- (3) Membuat nomor kelinci 1 s/d 18, kemudian nomor tersebut dilakukan undian seperti pada prosedur (2), diperoleh seperti pada baris ketiga Tabel 4.2
- (4) Dengan demikian kelinci terpilih pertama (yaitu kelinci nomor 9) diperlakukan dengan C5, terpilih ke dua (kelinci nomor 2) dengan perlakuan A4, dan seterusnya

**Tabel 4.2 Tahap Randomisasi ( Pengacakan )**

Randomisasi	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Perlakuan	C5	A4	C3	B3	A1	C6	C1	B7	A2	B4	C2	A5	B6	C4	C6	B1	A6	A2
Nomor kel no	5	2	14	6	1	16	6	15	7	12	5	4	18	11	17	3	10	13

#### 4.4 Variabel penelitian dan definisi operasional variabel

Sehubungan dengan hipotesis yang hendak dibuktikan dalam penelitian ini yaitu adanya peran stres oksidatif dalam patogenesis kerusakan tulang rawan sendi akibat gangguan biomekanik instabilitas, maka variabel yang akan diperiksa adalah

unsur yang berpengaruh di dalam jalur non enzimatik. Variabel penelitian terdiri dari variabel bebas, variabel kendali dan variabel tergantung.

Variabel bebas yaitu:

- (1) Tindakan operasi transeksi ACL dan menisektomi (instabilitas berat)
- (2) Tindakan operasi menisektomi (instabilitas sedang)
- (3) Tindakan operasi *Sham* (kontrol)

Variabel kendali yaitu:

- (1) Karakteristik yang melekat pada hewan coba kelinci

Variabel tergantung yaitu:

- (1) Unsur  $\text{NO}^*$  (radikal nitrik oksid) yang diukur dengan indikator iNOS (*inducible nitric oxide synthase*).
- (2) Stres oksidatif diukur dengan indikator MDA (malondialdehid) dan SOD (superoksid dismutase).
- (3) Kerusakan tulang rawan sendi diukur dengan indikator GAG (glikosaminoglikan).

Unsur enzim proteolitik metalloprotease tidak diperiksa mengingat secara teoritis enzim ini berada di dalam jalur enzimatik yang tidak mempengaruhi jalur non enzimatik, namun sebaliknya jalur non enzimatik mempengaruhi jalur enzimatik.

#### 4.4.1 Variabel Bebas

Dalam penelitian eksperimental, variabel bebasnya adalah perlakuan, sehingga variabel bebas pada penelitian ini adalah gangguan biomekanik instabilitas. Hewan coba kelinci dalam keadaan mendekati homogen mengenai jenis kelamin,

umur, dan berat badannya, kemudian dari 18 ekor kelinci ( $n=18$ ) dibagi ke dalam 3 kelompok berdasarkan macam perlakuan, yaitu :

- (1) Kelompok pertama terdiri dari 6 kelinci, diperlakukan dengan transeksi ACL dan medial menisektomi pada lutut belakang sebelah kiri.

Kelompok ini berdasarkan teori dikategorikan sebagai kelompok dengan instabilitas berat (gangguan biomekanik derajat berat).

- (2) Kelompok kedua terdiri dari 6 kelinci, diperlakukan dengan menisektomi saja pada lutut belakang sebelah kiri.

Kelompok ini dikategorikan sebagai kelompok dengan instabilitas sedang (gangguan biomekanik derajat sedang).

(Shoemaker SC, Markolf KL, 1986; Woo SL-Y, *et al.*, 2001)

- (3) Kelompok ketiga terdiri dari 6 kelinci tanpa perlakuan, dengan melakukan operasi lutut sebelah kiri dengan membuka rongga sendi saja (operasi menurut Sham), sebagai kontrol

#### 4.4.2 Variabel Kendali

Variabel kendali adalah variabel yang dikendalikan oleh peneliti agar obyek penelitian berupa hewan coba kelinci dalam keadaan homogen. Pengendalian yang dilakukan dalam penelitian ini adalah dengan cara eksklusi dan inklusi, dimana hewan uji yang memenuhi syarat dimasukkan (inklusi) sebagai sampel penelitian dan yang tidak memenuhi syarat dikeluarkan (eksklusi) dari sampel. Variabel kendali dalam penelitian ini meliputi :

- (a) Kelinci jenis *New Zealand*
- (b) Jenis kelamin, dipilih kelinci berjenis kelamin betina.
- (c) Umur, pemilihan umur kelinci ditentukan pada keadaan masa pertumbuhan tulang dewasa (*skeletally mature*), yaitu pada umur 2 bulan sampai dengan 5 bulan.
- (d) Berat badan, dipilih yang dalam keadaan seragam, yaitu 3 (tiga) kilogram dengan standard deviasi 10%
- (e) Kelinci dalam keadaan sehat
- (f) Makanan, selama proses penelitian, makanan yang diberikan dalam keadaan seragam.

#### 4.4.3 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian eksperimental adalah merupakan respon obyek penelitian terhadap perlakuan yang diberikan. Dalam penelitian ini respon yang diamati setelah 8 minggu aktivitas normal dari saat perlakuan, meliputi :

- (a) Stres oksidatif, diukur dengan indikator MDA (malondialdehid) diperiksa dengan tes Asam Thio Barbiturik dan SOD (superoksid dismutase) diperiksa dengan metoda Oberley (Favier AE, 1995).
- (b) Derajat kerusakan tulang rawan sendi, diukur dengan indikator glikosaminoglikan (GAG) khondroitin sulfat dengan memakai pemeriksaan imunohistokimia, dan pemeriksaan DMMB (*dimethylmethylene blue*) (Little C. *et al.*, 1997; Caterson B, *et al.*, 1995)





- (c) NO<sup>+</sup> sebagai radikal nitrogen yang berperan pada jalur non enzimatis diukur dengan kadar iNOS dengan metode pemeriksaan imunohistokimia. (Gabrowski, *et al.*, 1997; Studer R, *et al.*, 1999)

#### 4.5 Bahan Penelitian

Bahan penelitian adalah tulang rawan sendi lutut kiri yang diambil dari hewan coba kelinci dengan cara operasi aseptis dengan pembiusan umum. Pengambilan bahan penelitian dengan memotong bagian ujung bawah tulang paha (*femur*) dan bagian ujung atas tulang tungkai bawah (*tibia*). Tulang rawan diambil dari sendi lutut kiri (tungkai belakang) pada hewan coba kelinci yang telah diberikan perlakuan yaitu transeksi ACL+ menisektomi, menisektomi saja dan kontrol (*Sham operation*).

#### 4.6 Instrumen Penelitian

Peralatan dan bahan yang digunakan adalah :

1. Kandang , ukuran 0,6 x 1 m, bahan bambu.
2. Peralatan :

- 2.1. Tindakan pembedahan

Peralatan instrumen operasi bedah dasar

Peralatan anestesi umum.

Lampu operasi

Meja operasi

- 2.2. Pemeriksaan MDA dan SOD:

Alat penggenus gigi (*portable*)

**Senrifuse (Heraeus Sepatech Labofuge 200)**

*Spectrophotometer (Hitachi U-2000, double beam)*

Mikropipet (0,1 – 20  $\mu$ l, 20 – 50  $\mu$ l., 50 – 200  $\mu$ l, 200 – 1000  $\mu$ l)

*Water bath (Precistern)*

*White & Yellow tips (Biorad)*

Neraca analitik (O Haus)

pH meter ( Jerway pH meter 3310)

Vortek

### 2.3. Pemeriksaan imunohistokimia:

*Mikroskop optiphot – 2 (Nikon) epicopic-fluorescence*

*Gelas slide*

Mikropipet (0,1 - 20  $\mu$ l) dan (200 - 1000 )

*Blue & White tips*

Inkubator 37° C (Edelstahl – Rostfrei)

### 3. Bahan kimia :

#### 3.1 Larutan bahan kimia untuk pemeriksaan MDA

TCA (Trichloro Acetic Acid) (Merek)

HCl ( Hydrochloric Acid) (Merek)

NaOH (Natrium Hidroksid) (Merek)

Thiobarbiturate Acid (Sigma)

#### 3.2. Larutan bahan kimia untuk pemeriksaan SOD

Xanthin (Sigma)

**Xanthin Oxidase (Sigma)**

**NBT (*NitroBlue Tetrazolium*) (Sigma)**

**PBS (*Phosphate Buffer Saline*) (Merck)**

### **3.3. Larutan bahan kimia pemeriksaan imunohistokimia**

**ItoGenex™ Mouse-on Mouse Iso-IHC Kit**

***Biotin conjugated Anti-Proteoglikan & Di-4S***

***iNos Polyclonal Antiserum***

### **3.4. Larutan bahan kimia pemeriksaan glycosaminoglycan**

**Reagen pemulas 1,9 dimethyl-methylene blue (dalam *inorganic buffer* yang mengandung *surfactans* dan *stabiliser*.)**

**Reagen disosiasi mengandung garam chaotropic larutan propan-1-ol.**

***Standard sulphated glycosaminoglycan* mengandung chondroitin-4-sulfated**

**Larutan sodium nitrit steril (5%)**

**Larutan asam asetat steril (33%)**

**Larutan ammonium sulphamate steril (12,5%)**

## **4.7 Prosedur Penelitian**

### **4.7.1 Perlakuan untuk Model Osteoarthritis**

OA dibuat dengan 2 cara perlakuan yaitu cara pertama dengan melakukan menisektomi medial pada lutut hewan coba kelinci dan cara yang kedua dengan

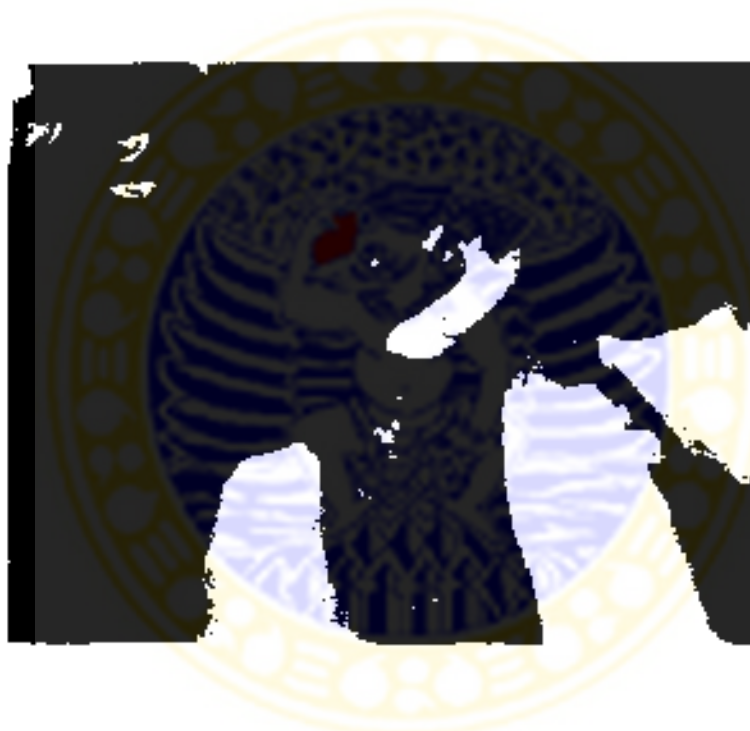
melakukan transeksi *anterior cruciatum ligementum* (ACL) dan menusektomi medial secara bersamaan. Perbedaan antara kedua perlakuan adalah terjadinya gangguan instabilitas yang lebih besar pada perlakuan yang kedua dibanding dengan yang pertama. Selain kedua perlakuan tersebut dilakukan tindakan operasi "buka-tutup" atau "*Sham operation*" pada lutut yang dijadikan kontrol.

Persiapan pada perlakuan pertama dan kedua adalah sama yaitu hewan coba kelinci dipuasakan selama 6 jam. Pembedahan umum pada setiap hewan coba yang menjalani operasi, dilakukan dengan cara pemberian *sulfax atropin* 12,5 mg, *dormicum* 1 mg, dan *ketalar* 50 mg; lebih kurang 10 – 15 menit sebelum operasi. Kedua tungkai dipersiapkan dengan mencukur terlebih dahulu daerah operasi sampai batas pertengahan paha dan tungkai bawah. Didalam pembiusan umum kemudian kedua tungkai dibersihkan dengan larutan Hibiscrub, disusul dengan larutan yodium 3%, alkohol 70% dan larutan povidone iodine (Betadin), lalu kedua tungkai ditutup dengan kain penutup operasi steril.

Operasi dilaksanakan dengan teknik baku operasi steril. Pada kedua perlakuan dan kelompok kontrol, kesemuanya dilakukan insisi parapatelar medial melalui seluruh lapisan dinding sendi sampai pada lapisan sinovial. Setelah diyakini masuk kedalam rongga sendi, meniskus medial diidentifikasi, dilakukan pemotongan secara tajam dengan pisau skalpel dan meniskotom, dimulai pada ujung anterior (kaudal) lalu sepanjang tepi medial sampai ujung posterior (kranial) dari meniskus medialis. Perdarahan dirawat dengan koagulasi, luka dicuci dengan larutan NaCl 0.9 % steril, dan luka ditutup lapis demi lapis. Pada kelompok perlakuan kedua setelah dilakukan

menisektomi dilanjutkan dengan mengidentifikasi dan memutuskan atau transeksi ligamentum cruciatum anterior (ACL) secara tajam, dilanjutkan dengan prosedur yang sama dengan di atas. Pada kelompok kontrol setelah insisi dilanjutkan dengan penutupan luka kembali lapis demi lapis dengan merawat perdarahan. Luka ditutup kasa steril, dibalut tidak terlalu ketat namun rapat untuk menghindari terpaparnya luka operasi, mencegah infeksi. Pasca operasi diberikan antibiotik Injeksi sesuai dengan berat badan.

Pengambilan meniskus medial diperlihatkan pada gambar 4.2

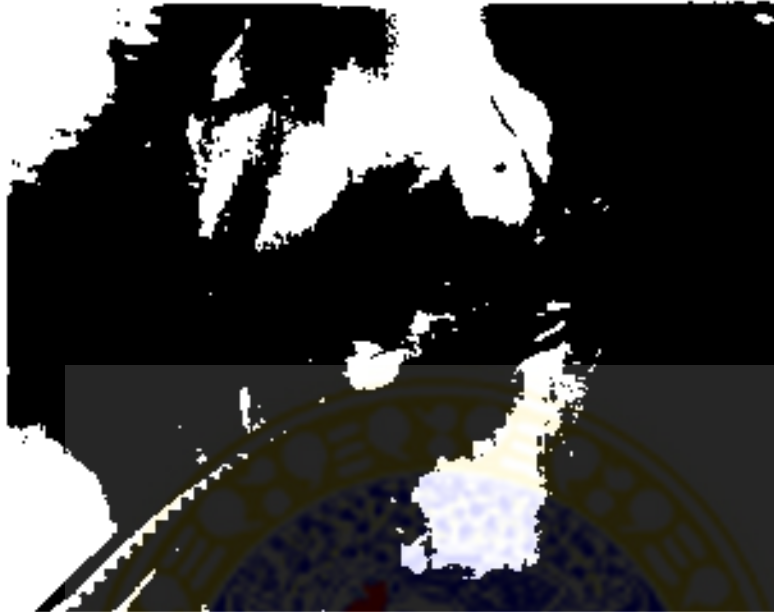


**Gambar 4.2** Menisektomi *medial* lutut kiri hewan coba kelinci

**Keterangan:** insisi medial, parapatelar, patera di dislokasikan ke lateral, tibia diputar ke *lateral* meniskus secara horizontal, dibersihkan dari arah depan ke arah belakang lutut. (rektor hewan coba 8333)



Tindakan transeksi ACL diperlihatkan pada gambar 4.3



**Gambar 4.3** Transeksi ACL

**Keterangan:** Transeksi ACL dengan cara mengidentifikasi dan membebaskannya dengan menyusupkan klem dibawahnya, kemudian dipotong seluruhnya dengan pisau *scalpel* (hewan coba nomor 2A4)

#### **4.7.2** Pasca Perlakuan

Pasca bedah, luka diobservasi sampai minggu kedua untuk melihat kemungkinan terjadinya infeksi. Adanya infeksi ditandai dengan timbulnya tanda radang sampai timbulnya cairan baik serous maupun purulen. Bila terjadi infeksi maka hewan coba dikeluarkan dari data koleksi

Pasca bedah setiap hewan coba dimasukkan kedalam kandang dengan ukuran 0,6 x 1 meter dan melakukan aktivitas normal hingga 8 minggu, dengan pemberian

makanan baku yang sama yaitu susu pop satu cangkir, sawi hijau 2 tkat, wortel besar 5 batang, sekali sehari, dimulai pada hari yang sama pasca bedah. Setiap hari setiap hewan uji dilepaskan dari kandang selama lebih kurang 3 jam dan dibiarkan bergerak bebas dilapangan.

#### 4.7.3 Pengambilan Sampel Spesimen

Delapan minggu setelah perlakuan dilakukan operasi ulangan dengan metoda yang sama seperti pada operasi yang pertama. Bahan sampel pemeriksaan, yaitu tulang rawan pada permukaan sendi lutut kiri yang telah diberikan perlakuan sebelumnya, diambil dari kelompok pertama dan kedua, demikian pula diambil dari lutut kiri kelompok ketiga (kontrol).

Cara pengambilan sampel dengan melakukan blok eksisi, memotong tulang femur di atas kondilus dan tibia di bawah tuberositas. Seluruh lapisan tulang rawan sendi pada daerah kontak ke-dua permukaan tulang rawan baik dari kondilus femur, maupun tibia dipreparasi, dibersihkan dari jaringan lunak. Permukaan tulang rawan daerah kondilus femur dipersiapkan untuk pemeriksaan MDA dan SOD, sedangkan tulang rawan dari tibia dipersiapkan untuk pemeriksaan GAG baik secara DMMB (*dimethylmethylene blue*) maupun imunohistokimia, dan juga untuk pemeriksaan imunohistokimia iNOS.

Selama penelitian berlangsung hewan coba dirawat dengan baik, dan selanjutnya pada pasca bedah kedua hewan coba kelinci diterminasi dengan cara disembelih dan dikonsumsi sebagai makanan manusia

#### 4.7.4 Pemeriksaan MDA (Malondialdehid) dengan metoda assay ( Tes Asam Thio Barbiturik )

Tulang rawan pada permukaan kondilus femur setelah dipreparasi langsung digerus dengan alat penggerus gigi sampai menjadi bubuk halus, dan kemudian ditimbang sampai mencapai berat 10 mg.

Bubuk tulang rawan kemudian dicuci dengan larutan 10 Mm Tris lalu ditimbang kembali dan dihomogenisasi dalam mortal yang diletakkan dalam termos yang berisi es. Ditambahkan 6,125 ml. larutan Tris. Diambil 1 ml homogenat, ditambah 100  $\mu$ l TCA, 250  $\mu$ l HCl lalu disentrifus 1500 rpm, pada suhu 27°C, selama 15 menit. Supernatan disaring dengan *glass wool* lalu ditambah 100  $\mu$ l Na-Thio sebagai pembanding tabung yang satunya tanpa diberi Na-Thio. Kemudian dipanaskan dalam *waterbath* 100° C selama 10 menit, lalu dibaca pada panjang gelombang 531 nm dengan spektrometri. Data yang diperoleh adalah kuantitatif

#### 4.7.5 Pemeriksaan SOD dengan metoda Oberley (1985)

Tulang rawan sendi digerus dengan alat penggerus gigi dan dicuci dengan pelarut untuk SOD (5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1 mM PMSF + 0,01 M EDTA) dihomogenisasi dalam mortal yang diletakkan dalam termos yang berisi es. Ditambah 3 ml pelarut untuk SOD, disonikasi selama 5 menit lalu disentrifus 3400 rpm, 6° C, 10 menit. Diambil 1 ml. supernatan dan diencerkan 10 kali, kemudian ditambah dengan reagen : 0,05 M *Buffer Fosfat*, 0,005 M EDTA, *aquabides*, 25 X 106 *Xanthine*, 25 unit *Xanthine Oxidase* dan 30 mg. NBT. Setelah itu dipanaskan

dalam *waterbath* 30° C selama 10 menit; dan kemudian dibaca pada panjang gelombang 580 nm. Data yang diperoleh adalah kuantitatif.

#### 4.7.6 Pemeriksaan Glikosaminoglikan (GAG) dengan imunohistokimia metoda peroksidase dengan *counterstaining* Mayer Hematoxylin, antibodi anti GAG

Sampel tulang rawan dilakukan dekalsifikasi (memakai EDTA 0,5 molar), pada pH 7,2, selama 3 minggu dengan suhu 4°C., kemudian dibilas dengan PBS (*phosphate buffer saline*), satu kali dalam 24 jam, lalu dipotong dengan *cryotom* setebal 4 – 6 mikron. Sediaan lalu dilakukan pengecatan secara imunohistokimia dengan memakai antibodi *Biotin conjugated Anti-Proteoglikan Δ Di-4S*.

##### Metoda:

- (1) Inkubasi *slide* pada Chondroitinase ABC selama 30 menit; 37°
- (2) Cuci dengan PBS pH 7,4 – 3X selama 5 menit
- (3) Inkubasi *slide* pada *peroksida black* selama 30 menit, pada suhu ruang.
- (4) Aspirasi serum, *block* dari *slide* dengan *tissue*.
- (5) Tetesi dengan Biotin *conjugated* Anti-Proteoglikan Δ Di-4S, inkubasi selama semalam pada 4° C ( 1 : 100 ).
- (6) Cuci dengan PBS pH 7,4 3X selama 5 menit.
- (7) Tetesi dengan AEC substrat. inkubasi 3 menit – 10 menit
- (8) Cuci dengan di[2O 3X selama 5 menit

- (9) Tetesi dengan Mayer Hematoxilen 3 menit
- (10) Cuci dengan air mengalir selama 5 menit.
- (11) *Mounting* dengan *Supermount* & *Mounting Medium*.
- (12) Amati dibawah Mikroskop cahaya 20 – 40X.

Data yang diperoleh berupa data kualitatif, tidak dimasukkan ke dalam penghitungan data, namun sebagai data pembanding.

#### **4.7.7 Pemeriksaan Glikosaminoglikan (GAG) dengan DMMB**

##### *(dimethylmethylene blue)*

Preparat tulang rawan sendi dihaluskan dengan penggerus gigi sampai menjadi bubuk dan ditimbang seberat 10mg. ditambah dengan GuHCl 4M (Guanidin HCl 4 molar) dan kemudian dilakukan sentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, dan terakhir supernatan 50  $\mu$ l., kemudian ditambah akuades steril 50 $\mu$ l. ditambah 1ml *Blyscan Dye Reagent*. lalu dimasukkan ke vorteks 30 menit (proses ini mempromosikan agregasi GAG dengan zat warna). Setelah itu di sentrifus 20.000 rpm selama 10 menit dalam suhu ruangan. Supernatan dibuang dengan cara *tapping* pada kertas *issue* (dengan perhatian agar pellet jangan sampai terbang) Kemudian ditambahkan 1 ml. *Blyscan dissociation reagent* masukkan vorteks 20 menit dan dibaca pada spektrofotometer pada gelombang 648 nm. Data yang diperoleh berupa data kuantitatif.



#### 4.7.8 Pemeriksaan kadar iNOS dengan imunohistokimia metoda peroksidase *counterstaining Mayer Hematoxylin*, antibodi anti iNOS

Prosedur yang dilakukan sama halnya dengan pemeriksaan imunohistokimia GAG, namun yang dipakai sebagai antibodi adalah iNOS *Polyclonal Antiserum*.

Metoda :

- (1) Penyiapan *labelling* Antibodi, dilarutkan 1 ml. *Polyclonal* Antibodi ( pAb ) anti Rabbit iNOS dalam 10 ml. *Biotin labelling reagent*, campurkan dengan vortek dan inkubasi untuk 30 menit pada suhu ruang.
- (2) Inkubasi *slide* pada *Peroxide Block* selama 5 menit pada ruang temperatur.
- (3) Cuci dengan PBS pH 7,4 3X selama 5 menit.
- (4) Inkubasi *slide* pada *power Block reagent*, selama 30 menit pada temperatur ruang.
- (5) Keringkan dengan *tissue* ( Aspirasi *Power Block Reagent* ).
- (6) Tetesi dengan Antibodi berlabel ( pAb Anti iNOS ) dalam: *Power Block* ( 1 : 100 ), inkubasi semalam pada 4 °C.
- (7) Cuci dengan PBS pH 7,4 3X selama 5 menit.
- (8) Inkubasi dalam Streptavidin – Horseradish Peroxide ( SA-HRP ) selama 30 menit.
- (9) Cuci dengan PBS pH 7,4 3X selama 5 menit.
- (10) Tetesi dengan AEC Substrat, inkubasi 3 menit – 10 menit.

- (11) Cuci dengan dH<sub>2</sub>O 3X selama 5 menit.
- (12) Tetesi Mayer Hematoxilen *counterstain*, inkubasi selama 3 menit.
- (13) Cuci dengan air mengalir selama 5 menit.
- (14) *Mounting* dengan *Super Mount R Mounting Medium*.
- (15) Amati pada Mikroskop cahaya 100 – 200X.

Data yang diperoleh berupa data kualitatif, dihitung secara semikuantitatif. Sediaan ditentukan dahulu daerah yang akan dihitung (*counting area*) dengan berdasarkan melihat pewarnaan yang paling banyak pada pembesaran 100x. Daerah yang akan dihitung dibagi 5 wilayah lapangan pandang dan masing masing wilayah dihitung setiap wilayahnya dengan 5 kotak kamar hitung. Penghitungan kadar iNOS intraseluler (iNOS sel) berdasarkan sel kondrosit yang berwarna merah. Sedangkan penghitungan kadar iNOS matriks ekstraseluler berdasarkan densitas warna merah dengan memakai standar skor. Pengamatan dilakukan secara *single blind*, oleh dua pengamat dengan hasil tidak berbeda bermakna.

#### 4.8 Metoda Analisis Data

Analisis data dilakukan untuk menguji hipotesis penelitian berdasarkan data empirik hasil percobaan.

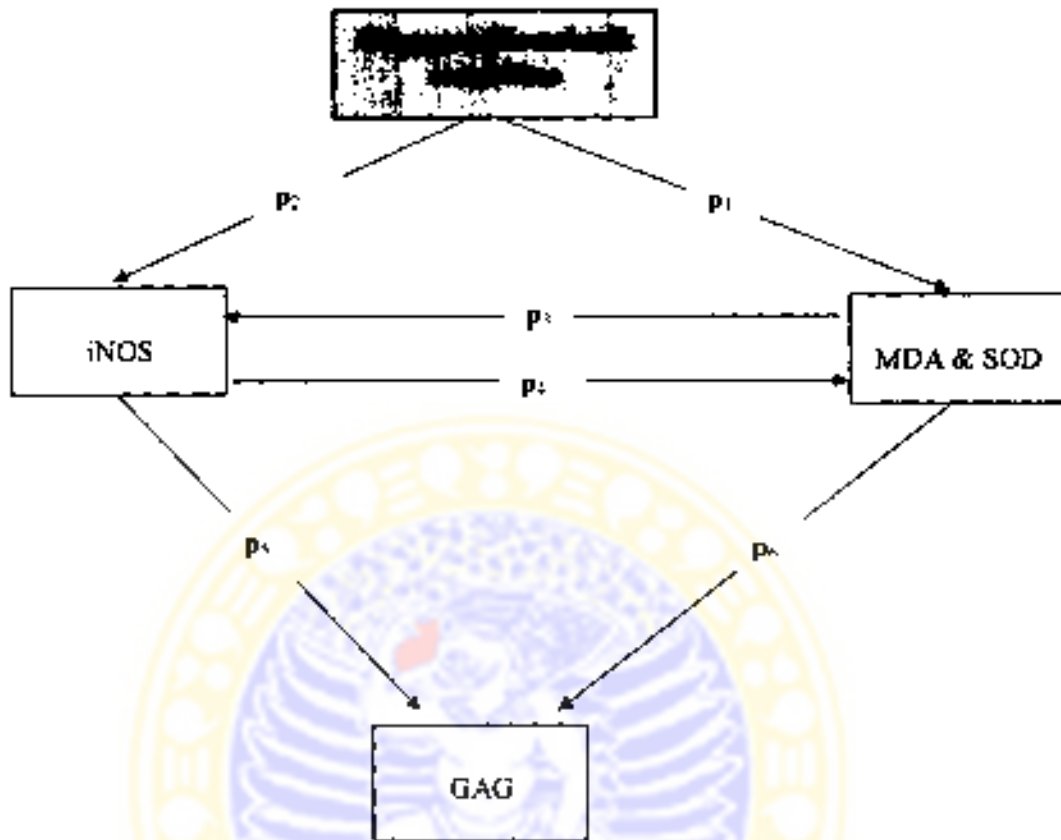
- (a) Pengujian subhipotesis 1 : Derajat berat ringannya gangguan biomekanik instabilitas sendi berpengaruh terhadap derajat kerusakan proteoglikan

tulang rawan pada sendi; digunakan *F-test* melalui ANOVA. Bilamana bermakna, dilanjutkan dengan uji-BNJ (HSD-test).

- (b) Pengujian subhipotesis 2 : Terdapat pengaruh derajat gangguan biomekanik instabilitas sendi terhadap derajat stres oksidatif; digunakan *F-test* melalui ANOVA. Bilamana bermakna, dilanjutkan dengan uji-BNJ (HSD-test).
- (c) Pengujian subhipotesis 3 : Stres oksidatif berperan dalam kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi, secara *in vivo*; digunakan analisis korelasi dan analisis jalur (*Path analysis*)
- (d) Pengujian subhipotesis 4: Mekanisme peran stres oksidatif terhadap kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi, melalui jalur pengaruh langsung dan berpengaruh tidak langsung melewati ekspresi iNOS yang meningkat; digunakan analisis jalur.
- (e) Pengujian subhipotesis 5: Gangguan biomekanik instabilitas sendi terhadap proses kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi, mekanismenya melewati dua jalur : (a) kondrosit - ekspresi iNOS - kerusakan matriks, dan (b) kondrosit - stres oksidatif - kerusakan matriks; digunakan analisis jalur. Model hipotetik yang akan diuji untuk pembuktian hipotesis 4 dan 5 diberikan pada Gambar 4.2

Didalam pengujian model hipotetik tersebut digunakan model yang sesuai dengan konsep dan teori yang ada. Namun demikian akan dipilih satu

model yang memenuhi analisis jalur dengan koefisien *path* yang paling besar dan sesuai dengan konsep dan teori yang ada.



**Gambar 4.4 Model Hipotetik untuk Pengujian Hipotesis 4 dan 5**

**Keterangan :**

$p_1$  - Koefisien *Path* pengaruh langsung, misal  $p$  adalah pengaruh langsung Gangguan Biomekanik terhadap stres oksidatif

Koefisien *Path* yang signifikan menunjukkan bahwa jalur pengaruh tersebut ada dan nyata

Besar kecilnya Koefisien *Path* menunjukkan besar kecilnya kontribusi pengaruh dan tanda ( + atau - ) menunjukkan arah pengaruh

**BAB 5****ANALISIS HASIL PENELITIAN**

Bab ini memuat data hasil penelitian dan analisis hasil penelitian yang sesuai dengan tujuan dan hipotesis. Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel, grafik dan foto atau gambar yang disusun sesuai dengan analisis data hasil penelitian. Pemeriksaan untuk variabel MDA dengan uji Asam Thio Barbiturik, variabel SOD dengan pemeriksaan uji metoda Oberley, dan variabel GAG dengan pemeriksaan DMMB (*dimethylmethylene blue*). Sedangkan pemeriksaan untuk variabel iNOS dan GAG dengan pemeriksaan imunohistokimia. Pengukuran variabel iNOS (intraseluler dan matriks) dilakukan dengan cara menghitung luasan tertentu (wilayah pandang mikroskop) dengan instrumen kamar hitung (merujuk subbab 4.7.8). Pada penelitian ini pengamatan dilakukan oleh dua orang, sehingga perlu diuji keajegan hasil pemeriksaan. Uji keajegan dilakukan dengan uji Mann Whitney. Hasilnya menunjukkan bahwa antar pengamat memberikan hasil yang sama, baik untuk iNOS seluler maupun matriks (*p value* masing masing adalah 0,462 dan 0,673), selengkapnya disajikan pada Lampiran 12. Dengan demikian maka hasil pengamatan dari dua pengamat bersifat ajeg, sehingga data penelitian dapat dijamin tingkat ketelitiannya.



### 5.1 Analisis patologi dan histopatologi

Pengamatan secara gross makroskopis didapatkan permukaan tulang rawan sendi yang berbeda antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan M maupun AM. Pada kelompok kontrol permukaan tulang rawan sendi tampak licin mengkilap, sedangkan pada kelompok M dan AM permukaan tulang rawan sendi tampak tidak mengkilap (buram) dan tidak licin (kasar). Beberapa sediaan menunjukkan kehilangan hampir seluruh lapisan tulang rawan (mendekati eburnasi). Pengamatan lain pada kelompok AM dan M menunjukkan lebih banyak mengandung cairan sendi dibandingkan kontrol. Fenomena di atas memperlihatkan terjadi kerusakan tulang rawan sendi yang disertai peradangan dan diikuti produksi cairan sinovia bertambah.



32

**Gambar 5.1** Permukaan tulang rawan sendi perlakuan AM

**Keterangan:** Tampak eburnasi pada kondilus femur medial dan permukaan kasar pada tibia medial (Hewan coba nomor 4A5)

Analisis histopatologi pada semua sediaan ditugaskan untuk melihat ada tidaknya fibrilasi, fisura pada permukaan tulang rawan (merujuk gambar 5.19), nekrosis ataupun apoptosis, terjadinya *cloning*, adanya *lacunar resorption* kondrosit, serta penebalan *int zone* yang semuanya merupakan tanda histopatologi OA tulang rawan sendi.



Gambar 5.2 Pengecatan sediaan M dengan imunohistokimia poliklonal antibodi anti *rabbit* Caspase3 pembesaran 200 X

- Keterangan: **A** - menunjukkan apoptosis kondrosit  
**B** - menunjukkan cloning kondrosit  
**C** - menunjukkan Weibel-Palade lamellar receptor  
**D** - menunjukkan duplikasi membran dan triemark

Kecmporan tanda tersebut menunjukkan histopatologi OA (Hwan et al, 2019).

Pada gambar 5.2 tampak apoptosis kondrosit, terbentuknya Weichselbaum lacunar resorption dan cloning pada lapisan dalam serta penebalan tide mark.

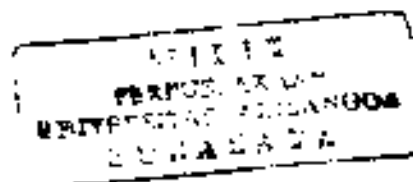
Untuk menilai adanya apoptosis secara nyata dibuat pembesaran 1000X, dengan pengecatan imunohistokimia terhadap pAb anti *rabbit* Caspase 3 seperti tampak pada gambar 5.3.



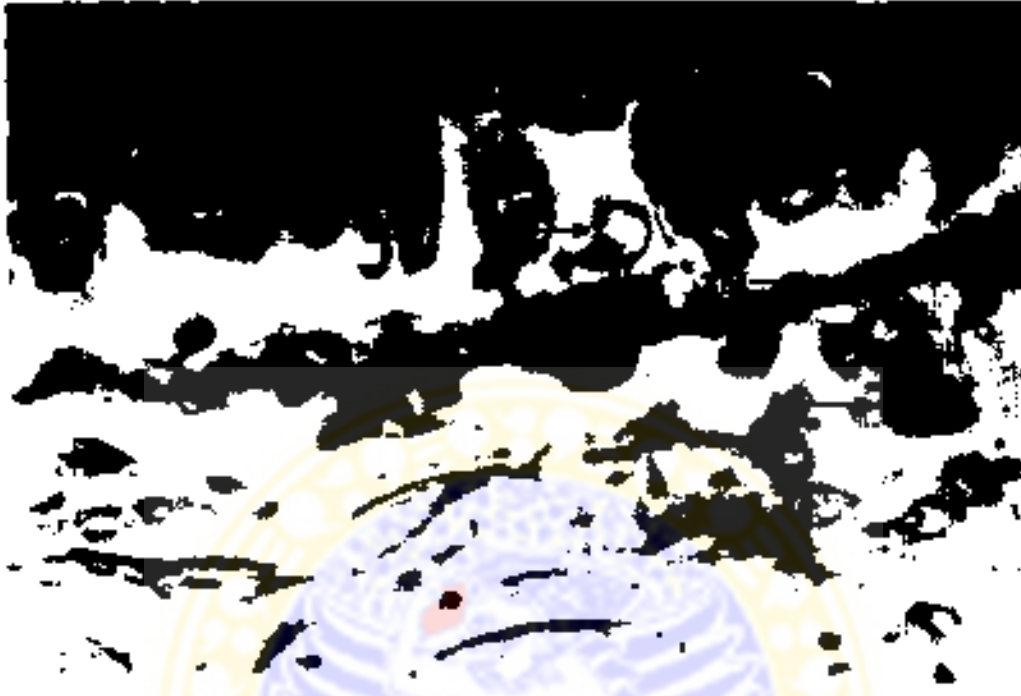
**Gambar 5.3** Sediaan M dengan pengecatan imunohistokimia poliklonal antibodi anti *rabbit* Caspase 3, pembesaran 1000X

Keterangan: A → menunjukkan apoptosis kondrosit  
N → menunjukkan sel kondrosit normal  
(Hwn coba no 1886)

Dari gambar 5.3 tampak gambaran apoptosis dari kondrosit warna merah kecoklatan dengan ditandai adanya kondensasi khromatin, densitas nukleus



meningkat, dan sel kondrosit menciut (*shrinkage*), sehingga lacuna tampak kosong. Di sampingnya tampak gambaran sel kondrosit normal.



**Gambar 5.4 Sediaan AM dengan pengecatan HE, pembesaran 200X**

**Keterangan:** A → Gambaran sel kondrosit mengalami nekrosis yang di akibatkan stres oksidatif. Tampak gambaran penebalan dari *territorial matrix* (TM), dan *lacunar resorption* Weichselbaum (W). (Hwn coba no. 10A6)

Dari uraian gambar di atas jelas bahwa sediaan AM dan M menunjukkan tanda histopatologik OA, dengan demikian jelas bahwa pada perlakuan AM dan M akan membawa perubahan struktur tulang rawan sendi ke arah terjadinya OA.

Pada pembesaran 1000X dengan pengecatan HE tampak dengan dengan jelas gambaran nekrosis kondrosit, yang menggebung dan mengalami lisis



**Gambar 5.5 Sediaan AM dengan pengecatan HE pembesaran 1000X**

**Keterangan:** • Nekrosis sel kondrosit dengan ditandai pengembangan dan lisis dari sel (Hwn coba no. 11/46)

Dari hasil pengamatan di temukan jumlah sel apoptosis lebih banyak daripada sel nekrosis pada setiap kelompok perlakuan. Sel apoptosis AM lebih banyak daripada M, demikian pula apoptosis kelompok M lebih banyak daripada kontrol. Demikian juga sel nekrosis pada kelompok AM lebih banyak dari kelompok M, dan nekrosis sel kelompok M lebih banyak dibandingkan kelompok kontrol (merujuk lampiran 13). Sesuai dengan teori, maka nekrosis dapat disebabkan oleh karena stres oksidatif radikal bebas, sedangkan apoptosis disebabkan oleh karena efek  $\text{NO}^*$ .



## 5.2 Analisis deskriptif data hasil penelitian

Hasil analisis deskriptif seluruh variabel penelitian selengkapnya disajikan pada Lampiran I. Nilai rerata (*mean*) dan standar deviasi setiap variabel pada masing-masing kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel 5.1.

**Tabel 5.1 Nilai mean dan Standard deviasi**

Kelompok Perlakuan	Variabel				
	MDA	SOD	GAG	iNOS Sel	iNOS Matriks
K	37.805 ± 27.138	22.805 ± 4.233	18.997 ± 2.499	1.363 ± 0.882	0.1367 ± 0.045
M	92.212 ± 21.857	21.504 ± 0.852	36.105 ± 9.133	8.005 ± 0.859	2.252 ± 0.716
AM	114.336 ± 28.501	16.808 ± 3.289	42.103 ± 7.812	10.913 ± 1.179	3.0817 ± 0.431

**Keterangan:** Setiap variabel nilai mean lebih besar dari SD. Terdapat perbedaan nilai mean bermakna antara perlakuan dan kontrol, kecuali pada variabel SOD  
 K kontrol, M: merisektomi, AM: transeksi ACL+merisektomi  
 Satuan untuk MDA adalah µg/ml (ppm), satuan untuk SOD adalah unit aktivitas/ml., satuan untuk iNOS sel adalah jumlah rerata sel per lapangan pandang, satuan untuk iNOS matriks adalah rerata skor densitas ekspresi iNOS per lapangan pandang, satuan untuk GAG adalah µg/ml. (ppm).

### 5.3 Pemeriksaan Asumsi

Hasil penelitian bersifat *valid* bilamana data yang dihasilkan berkualitas. Data yang mengandung percilan (*outliers*) dikatakan tidak berkualitas. Hasil analisis deskriptif pada Tabel 5.1 menunjukkan bahwa untuk semua variabel  $SD < \text{rerata}$ , berarti data tidak mengandung percilan.

Analisis yang digunakan dalam penelitian ini adalah ANOVA, korelasi dan analisis jalur (*Path Analysis*). Asumsi yang diperlukan untuk berbagai analisis tersebut adalah data berdistribusi normal. Hasil pemeriksaan normalitas data disajikan pada Lampiran 2. Variabel GAG, MDA dan SOD pada uji Kolmogorov-smirnov menghasilkan *p-value* lebih besar dari  $\alpha = 5\%$ , dengan demikian dikatakan berdistribusi normal. Sedangkan untuk variabel iNOS *p-value* yang dihasilkan lebih kecil dari  $\alpha = 5\%$ , akan tetapi masih mendekati 5%, sehingga dapat dikatakan data mendekati distribusi normal. Dengan demikian asumsi yang diperlukan terpenuhi, sehingga hasil analisis bersifat *valid*.

### 5.4 Pengaruh Gangguan Biomekanik terhadap MDA, SOD, GAG dan iNOS

Hasil analisis data menggunakan ANOVA selengkapnya disajikan pada Lampiran 5. Nilai *mean* dan *p-value* setiap variabel disajikan pada Tabel 5.2.

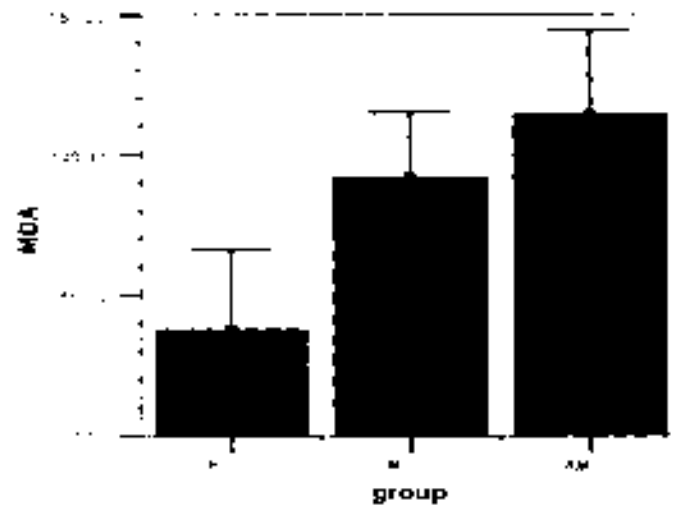
**Tabel 5.2 Pengaruh perlakuan terhadap variabel (nilai *mean*, standar deviasi dan nilai *p*).**

Kelompok Perlakuan	Mean $\pm$ SD				
	MDA	SOD	GAG	iNOS Sel	iNOS Matriks
K	37.805 $\pm$ 27.138	22.805 $\pm$ 4.231	18.997 $\pm$ 2.490	1.363 $\pm$ 0.882	0.1367 $\pm$ 0.045
M	92.212 $\pm$ 21.857	21.504 $\pm$ 0.852	36.105 $\pm$ 9.133	8.005 $\pm$ 0.859	2.252 $\pm$ 0.716
AM	114.336 $\pm$ 28.501	16.808 $\pm$ 3.289	42.103 $\pm$ 7.812	10.913 $\pm$ 1.179	3.0817 $\pm$ 0.433
<i>p</i> -Value	0.001	0.012	0.001	0.001	0.001

**Keterangan:** Data menunjukkan bahwa terdapat pengaruh yang sangat bermakna dari derajat gangguan biomekanik terhadap variabel bajik MDA, iNOS sel maupun iNOS matriks, dan GAG. (*p* value  $\leq$  0,001) Namun derajat gangguan biomekanik mempunyai pengaruh yang lebih kecil terhadap variabel SOD (*p* value 0,012).  
K: kontrol, M: menisektomi, AM: transeksi ACL+menisektomi

#### 5.4.1 Variabel MDA

Dari ANOVA hasil penelitian pengaruh gangguan biomekanik terhadap MDA, tampak perbedaan pengaruh yang sangat bermakna (*p*  $\leq$  0,001) di antara ketiga perlakuan, tampak pada gambar grafik 5.6.



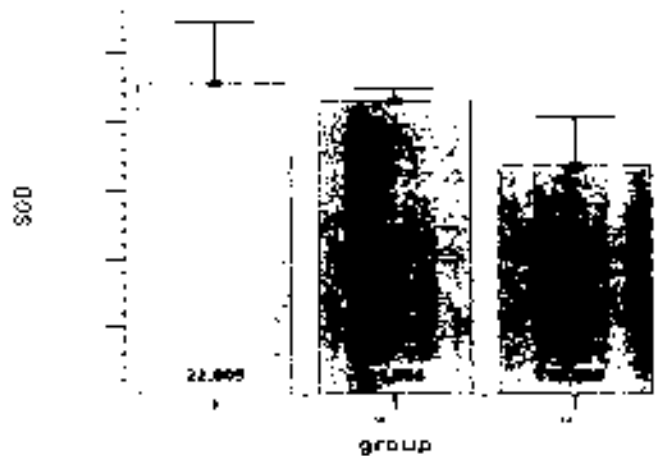
Gambar 5.6 Kadar MDA pada setiap perlakuan

**Keterangan:** K: Kontrol; M: Memesektomi; AM: Transeksi ACL + memesektomi  
Terdapat perbedaan yang nyata antara perlakuan AM dan M terhadap K

Dari hasil analisis Tukey (tabelan 6.2) terdapat perbedaan yang bermakna dari konsentrasi MDA antara perlakuan transeksi ACL + memesektomi (AM) dengan kontrol (K), dan perlakuan memesektomi (M) dengan kontrol (K). Namun perbedaan tersebut tidak begitu nyata antara perlakuan AM dan M.

#### 5.4.2 Variabel SOD

ANOVA menunjukkan terdapat perbedaan yang cukup bermakna dari pengaruh gangguan biomekanik terhadap SOD ( $p = 0.0121$ ) seperti tampak pada gambar 5.7.



Gambar 5.7. Nilai SOD pada setiap perlakuan

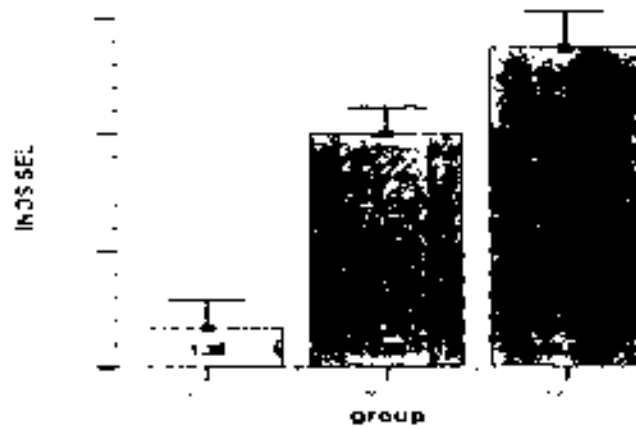
Keterangan: M = Meksikam, AM = Meksikam + AM, AMU = Meksikam + AM + Urea. Nilai SOD tertinggi pada kelompok Meksikam.

Menariknya, pada kadar SOD tertinggi pada kelompok Meksikam, nilai SOD juga lebih rendah pada kelompok Meksikam + AM, sedangkan terendah pada kelompok Meksikam + AM + Urea. Tidak banyak perbedaan antara kelompok M dan AM.

### 5.1.5. Variabel iNOS

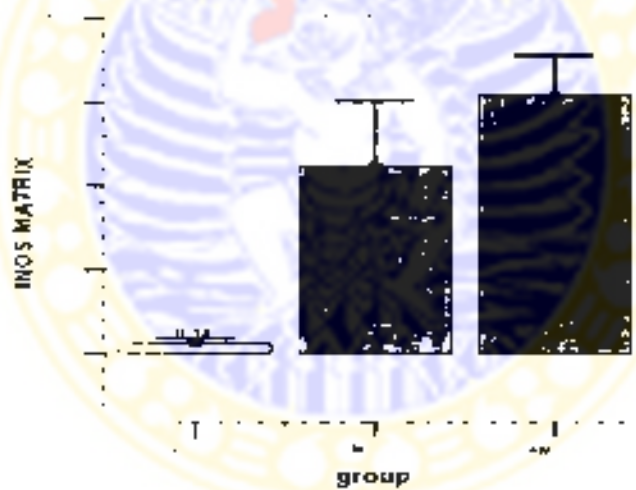
Urea dan iNOS di ukur dengan metoda pengukuran immunohistokimia dengan menggunakan anti iNOS dari Mayer. Hasilnya menunjukkan bahwa iNOS kemudian diukur secara semikuantitatif. Hasil ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan yang sangat bermakna ( $p < 0,001$ ) terhadap iNOS seperti pada tabel 5.2 dan terlihat pada gambar 5.8 dan gambar 5.9.





Gambar 5.8 Densitas iNOS sel pada setiap perlakuan

Keterangan: Grafik perbandingan nilai intensitas iNOS sel pada kelompok K, AM dan M. Keterangan: K= kelompok KAM dan M



Gambar 5.9 Densitas iNOS matriks pada setiap perlakuan

Keterangan: Grafik perbandingan nilai intensitas iNOS matriks pada kelompok K, AM dan M. Keterangan: K= kelompok KAM dan M

Dari pengamatan pemeriksaan imunohistokimia secara kualitatif pengaruh dari gangguan biomekanik instabilitas terhadap iNOS, menunjukkan bahwa ekspresi iNOS baik intraseluler maupun ekstraseluler meningkat secara bermakna ( $p \leq 0,001$ ) pada gangguan biomekanik dengan derajat lebih berat, yang berarti ekspresi tampak lebih nyata pada kelompok AM berurutan kemudian kelompok M dan kelompok K, seperti yang ditunjukkan pada gb. 5.10, gb. 5.11, gb. 5.12, gb. 5.13 dan gb. 5.14.

Pada gambar dibawah ini menunjukkan bahwa ekspresi iNOS yang ekstra seluler lebih banyak terdapat di daerah periseluler dengan disertai tanda pengelompokan sel yang merupakan salah satu ciri dari degenerasi tulang rawan sendi atau OA.

Pada daerah *high focal stress* tampak densitas iNOS lebih tebal dan banyak pada tepi sentra kerusakan tulang rawan sendi. (gb. 5.14).

Analisis histopatologi lainnya pada sediaan imunohistokimia iNOS tampak pula sel kondrosit yang mengalami nekrosis dan apoptosis, dimana pada pengamatan menunjukkan hal tersebut lebih banyak pada kelompok AM dan M. Selain itu sediaan menunjukkan adanya Weichselbaum *lacunar resorption* pada setiap kelompok disertai tanda pengelompokan sel kondrosit (*cloning*).

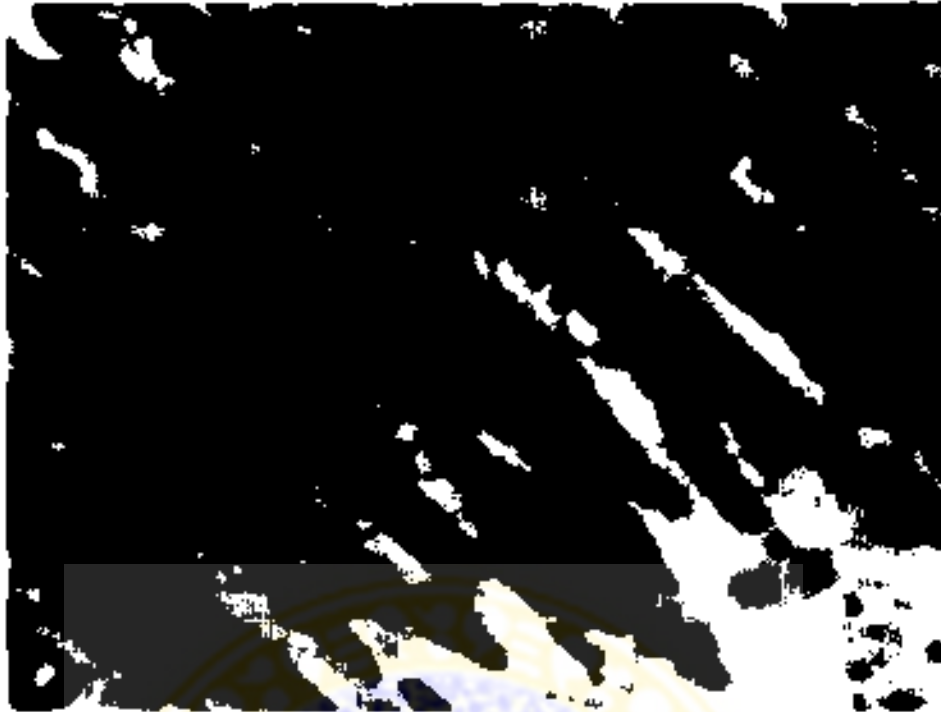
Ekspresi iNOS lebih condong tampak lebih banyak pada daerah zona dalam (*radial*) dan zona tengah (*transitional*). Dalam pengamatan ternyata jumlah densitas iNOS intraseluler tidak berbeda dengan densitas ekstraseluler.





**Gambar 5.10 Sediaan tulang rawan sendi pada kontrol (iNOS)**

**Keterangan:** dengan pengecatan imunohistokimia memakai metoda peroksidase dengan *Lowenstein Mayer Hematoxylin* Antibodi anti iNOS. pembesaran 100x dengan mikroskop Nikon Pada kelompok kontrol tidak tampak ekspresi iNOS. yang dapat dikenali dengan warna merah kecoklatan Tampak lapisan tulang rawan sendi terbagi dalam A zona permukaan, B zona tengah, C zona dalam, D. *zone mark* dan E. zona kalsifikasi, dengan susunan sel kondrosit teratur tanpa pengelompokan (Hewan coba no 9CS)



**Gambar 5.11** Sediaan tulang rawan sendi dengan perlakuan kontrol (iNOS)

**Keterangan:** Pada sediaan kontrol dengan pengecatan imunohistokimia antibodi anti iNOS dengan pembesaran 200x, pada tanda panah tampak sedikit area sekilas ekspresi iNOS berwarna merah kecoklatan  
I → ekspresi iNOS yang tidak jelas (Hewan coba no 9C5)



**Gambar 5.12** Sediaan tulang rawan sendi dengan perlakuan menisektomi (iNOS)

**Keterangan:** Sediaan dengan pembesaran 200x imunohistokimia antibodi anti iNOS. Tampak ekspresi iNOS dengan petanda warna merah kecoklatan baik yang terdapat di intraseluler, maupun ekstraseluler matriks. Tampak pula pengelompokan sel yang tidak nyata.

A → Ekspresi iNOS intraseluler

B → Ekspresi iNOS ekstraseluler

C → Weichselbaum lacunar resorption

(Hewan coba no. 15B2)





**Gambar 5.13** Sedimen tulang rawan sendi pada perlakuan transeksi ACL + menisektomi (iNOS)

**Keterangan:** Ekspresi iNOS baik intraseluler maupun ekstraseluler, tampak lebih nyata dibandingkan kelompok M (merusektomi) (Fig 5.12) pada pembesaran 200x. Ekspresi iNOS banyak terdapat di tepi sentral kerusakan di kelompok AM (ACL transeksi & menisektomi). Tampak pula pengelompokan sel lebih nyata.

- A → penutupan ekspresi iNOS periseluler ekstraseluler
- B → penutupan ekspresi iNOS intraseluler
- C → gambaran kondrosit yang mengalami nekrosis (Hewan coba no. 7A3)



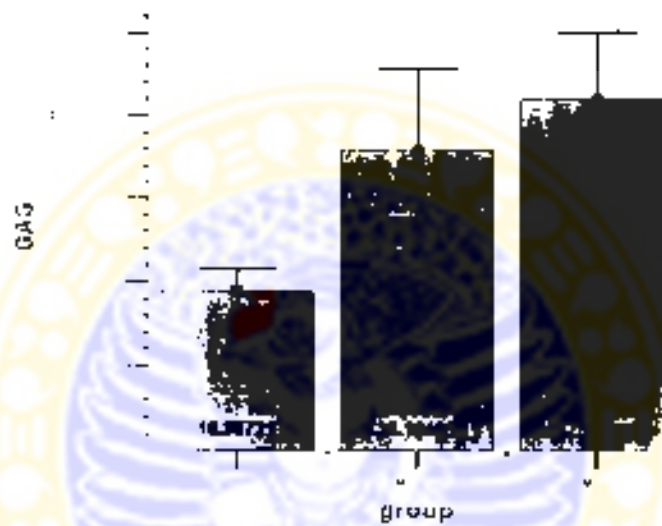
**Gambar 5.14** Sediaan tulang rawan sendi pada perlakuan transeksi ACL + menisektomi (iNOS).

**Keterangan:** Sediaan menunjukkan fura (celah) dan fibrilasi yang terjadi di daerah stres terbesar (*high focal stress*), pada kelompok AM (transeksi ACL & menisektomi). Ekspresi iNOS tidak nyata pada daerah kerusakan di daerah *High Focal Stress*, namun terlihat di tepi kerusakan.  
 A → ekspresi iNOS lebih nyata di tepi sentral kerusakan  
 B → celah yang lebih bentuk pada daerah stres terbesar (lewan coba no. 2A4)

Dari gambar di atas menunjukkan bahwa ekspresi iNOS meningkat sesuai dengan derajat beratnya gangguan instabilitas sendi. Namun tampak ekspresi iNOS lebih nyata pada daerah tepi dari sentra kerusakan tulang rawan sendi.

#### 5.4.4. Variabel GAG

Hasil uji t-test menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ( $p < 0,001$ ) dengan nilai p-value yang lebih kecil dari nilai  $\alpha$  ( $p < \alpha$ ) atau  $\alpha > p$  seperti tampak pada tabel 5.15 berikut ini.

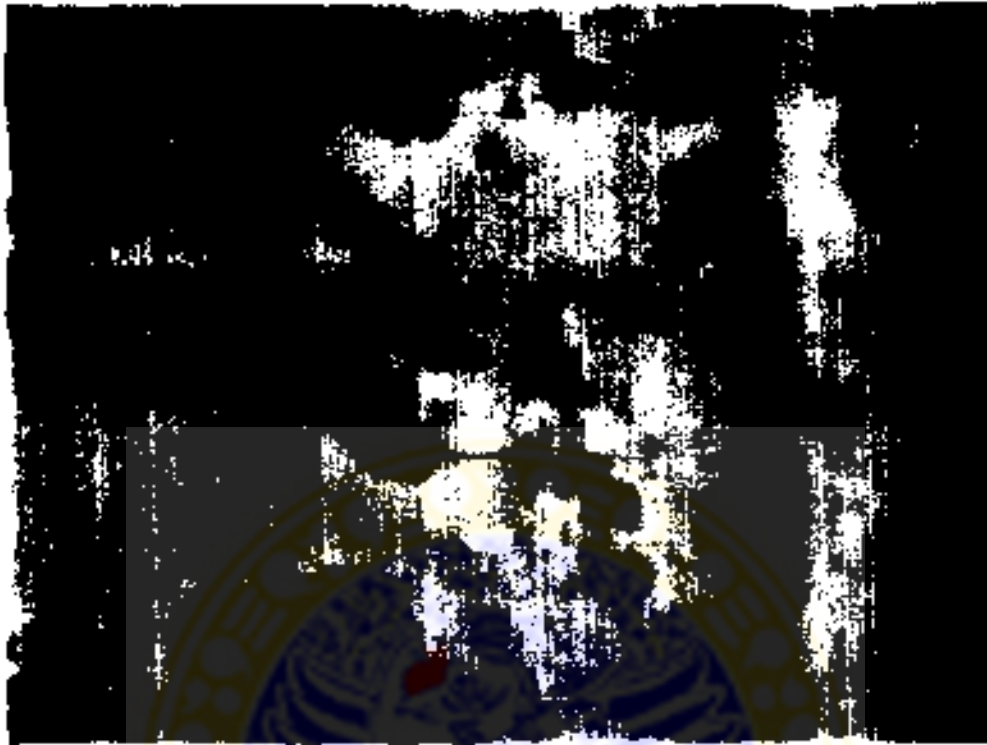


Gambar 5.15. Kadar GAG pada setiap perlakuan

Kemungkinan yang terjadi adalah karena sel AM di grup M2 memiliki sel yang lebih sedikit, sehingga mengakibatkan perbedaan kadar GAG pada selompok sel. Perbedaan yang signifikan ( $p < \alpha$ ) dan  $\alpha > p$  menunjukkan bahwa sel AM di grup M2 memiliki sel yang lebih sedikit, sehingga mengakibatkan perbedaan M1 > M2 > M.

Hal yang sama juga terjadi pada M dan M1 mempunyai perbedaan yang lebih kecil dan tidak signifikan, dapat dikatakan sel baik berbeda nyata.

Hal ini menunjukkan kualitas dengan amolus tekukur metil sta peroksidase ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dan metil sta peroksidase. Nilai hematosypher antibour anti GAG ditapakan hasil penelitian pada nilai  $p < 0,05$  (7, 8, 18, 5, 9).



**Gambar 5.16** Sediaan tulang rawan sendi pada perlakuan kontrol (GAG)

**Keterangan:** Pengamatan imunohistokimia metoda peroksidase dengan *counterstaining* Mayer Hematoxylin Antibodi anti GAG (kondroitin sulfat). pembesaran 200x Sediaan kontrol dengan gambaran ekspresi GAG dengan petanda warna merah kecoklatan baik intraseluler maupun ekstraseluler, dengan arti kata lain terjadi sintesis dan gradasi dari GAG yang seimbang  
A → sintesis GAG intra seluler  
B → degradasi atau pelepasan GAG ekstraseluler (Hewan coba no 11C4)



**Gambar 5.18** Sediaan tulang rawan sendi pada perlakuan transeksi ACL + menisektomi (GAG)

**Keterangan:** Sediaan dengan pengecatan intunohistokimia *carotol-ironing* Mayer Hematoxylin antibodi anti GAG, pembesaran 200x. Gambaran ekspresi GAG yang berada di matriks ekstraseluler lebih nyata

**A** → Ekspresi GAG ekstra seluler lebih nyata

**B** → Ekspresi GAG intraseluler

**C** → Pengelompokan sel *leucocytes* Hewan coba no. 10A61





Dari keempat gambar tersebut di atas menunjukkan penebalan pewarnaan merah kecoklatan yang lebih nyata dibentuk oleh antibodi anti GAG pada perlakuan AM dan M dibandingkan dengan K. Selain itu tampak kerusakan dari permukaan tulang rawan, khususnya di daerah *high focal stress* pada perlakuan AM. Densitas dari ekspresi GAG lebih banyak di periseluler khususnya pada kelompok AM. Gambaran ekspresi GAG tampak lebih banyak didapatkan pada zona dalam (zona radial) dan gambaran tersebut terlihat densitasnya lebih tebal pada daerah *high focal stress*. Pada sediaan kelompok kontrol dan kelompok M didapatkan Weichselbaum *lacunar resorption* yang sesuai dengan gambaran OA yang dini. Selain itu dalam pengamatan histopatologi tampak tidak ada perbedaan densitas GAG intraseluler dan ekstraseluler antar setiap kelompok, dimana pada kelompok AM didapatkan densitas tertinggi diikuti oleh kelompok M dan K.

Pada analisis histopatologi lainnya didapatkan pengelompokan sel lebih banyak pada kelompok AM dibandingkan dengan M maupun kontrol, selain itu terlihat gambaran kondrosit yang mengalami apoptosis dan nekrosis di beberapa daerah zona dalam, dimana lebih banyak terlihat pada kelompok AM dan M.

### 5.5 Hubungan antara MDA dengan GAG dan iNOS.

Hubungan antar variabel di dalam penelitian ini dianalisis dengan korelasi. Hasil analisis korelasi selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 4. Korelasi antara variabel MDA, dengan GAG dan iNOS disajikan pada Tabel 5.3.

**Tabel 5.3 Koefisien Korelasi (r) antara MDA, iNOS dan GAG.**

	MDA	iNOS sel	iNOS matriks	GAG
MDA		0.779 (0.000)	0.736 (0.001)	0.585 (0.011)
iNOS sel	0.779 (0.000)		0.899(0.000)	0.870 (0.000)
iNOS matriks	0.736 (0.001)	0.899 (0.000)		0.813 (0.000)
GAG	0.585 (0.011)	0.870 (0.000)	0.813 (0.000)	

Keterangan : Angka dalam tanda kurung adalah *p* - value

Bila melihat tabel 5.2 terdapat pengaruh yang sangat bermakna dari tingkat atau derajat gangguan biomekanik instabilitas terhadap ekspresi iNOS ( $p \leq 0,001$ ), dan kadar MDA ( $p \leq 0,001$ ), dan terdapat pengaruh yang bermakna pula dari derajat gangguan biomekanik instabilitas terhadap kerusakan glikosaminoglikan ( $p \leq 0,001$ ).

Tabel 5.3 di atas menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang sangat bermakna antara iNOS sel maupun iNOS matriks dengan GAG, yang berarti ada hubungan erat antara ekspresi iNOS baik intra maupun ekstra seluler dengan kerusakan glikosaminoglikan. ( $p \leq 0,001$ ), yang menandakan terdapat hubungan yang erat antara ekspresi iNOS dengan kerusakan tulang rawan.

Tabel 5.3 menunjukkan pula terdapat hubungan yang sangat bermakna antara MDA dan iNOS ( $p \leq 0,001$ ), menandakan stress oksidatif mempunyai hubungan erat

dengan ekspresi iNOS. Namun pada analisa korelasi ini belum dapat ditentukan apakah hubungan tersebut secara timbal balik ataukah searah.

Selain itu tabel 3.3 juga menunjukkan hubungan yang bermakna antara MDA dengan GAG ( $p = 0,011$ ), akan tetapi kurang erat dibandingkan hubungan antara MDA dengan iNOS. Oleh karena itu, perlu dianalisa lebih lanjut apakah hubungan MDA dengan GAG mempunyai peran di dalam jalur pengaruh gangguan biomekanik instabilitas terhadap kenaikan GAG secara langsung atau tidak langsung.

### 3.6 Jalur hubungan Gangguan Biomekanik ke kerusakan Tulang Rawan

Berdasarkan kerangka teori dan konsep pada Bab 3, peningkatan gangguan biomekanik berpengaruh meningkatkan iNOS dan MDA (stres oksidatif). Peningkatan iNOS dan stres oksidatif akan mengakibatkan peningkatan kerusakan tulang rawan (GAG). Peningkatan stres oksidatif tersebut dapat dilihat dari peningkatan MDA dan penurunan SOD. Hal ini dapat diperjelas sebagai berikut:

- (a) Pengaruh gangguan biomekanik terhadap MDA adalah positif (+)
- (b) Pengaruh gangguan biomekanik terhadap SOD adalah negatif (-)
- (c) Pengaruh gangguan biomekanik terhadap iNOs adalah positif (+)
- (d) Pengaruh MDA terhadap GAG adalah positif (+)
- (e) Pengaruh SOD terhadap GAG adalah negatif (-)
- (f) Pengaruh iNOs terhadap GAG adalah positif (+)

Penyelidikan dan pengujian jalur pengaruh gangguan biomekanik terhadap kerusakan tulang rawan dilakukan dengan analisis jalur (*path analysis*). Ada 6

model hipotetik yang diuji, hasil analisis selengkapnya disajikan pada Lampiran 8. Ringkasan hasil pengujian beberapa model tersebut dijelaskan pada uraian berikut.

### 5.6.1 Model I

Pada model hipotetik I, jalur pengaruh yang diuji adalah:

- (a) Gangguan biomekanik berpengaruh ke MDA, SOD, iNOS dan GAG secara langsung (*direct effect*)
- (b) Stress oksidatif (MDA dan SOD) berpengaruh timbal balik dengan iNOS
- (c) MDA, SOD dan iNOS berpengaruh ke GAG secara langsung (*direct effect*).

Hasil analisis terhadap Model I dapat dijelaskan sebagai berikut. Pengaruh gangguan biomekanik terhadap iNOS sel, SOD dan GAG adalah positif, sedangkan terhadap MDA adalah negatif, dengan koefisien masing-masing secara berturut-turut 8.612, 2.801, 0.914 dan -37.270. Jalur-jalur tersebut yang pengaruhnya signifikan adalah dari gangguan biomekanik ke iNOS sel ( $p < 0.05$ ).

Pengaruh SOD dan iNOS sel ke GAG adalah positif, sedangkan MDA adalah negatif, dengan koefisien path masing-masing secara berturut-turut 3.371, 0.551 dan -0.099. Jalur pengaruh yang bermakna adalah dari iNOS sel dan MDA ke GAG.

Secara teoritis seharusnya pengaruh gangguan biomekanik ke SOD adalah negatif demikian juga SOD ke GAG, tetapi hasil penelitian ini menghasilkan sebaliknya, yaitu pengaruhnya positif. Secara teoritis pengaruh MDA ke GAG adalah positif, tetapi hasil penelitian ini menunjukkan negatif.



Pengaruh gangguan biomekanik terhadap iNOS matriks, SOD dan GAG adalah positif, sedangkan terhadap MDA adalah negatif, dengan koefisien masing-masing secara berturut-turut 2.757, 1.487, 10.313 dan - 3.310. Jalur-jalur tersebut yang pengaruhnya bermakna adalah dari gangguan biomekanik ke iNOS matriks ( $p < 0.05$ ).

Pengaruh SOD dan iNOS matriks ke GAG adalah positif, sedangkan MDA adalah negatif, dengan koefisien path ( $\beta$ ) masing-masing secara berturut-turut 4.262, 0.655 dan - 0.080.

Secara teoritis seharusnya pengaruh gangguan biomekanik ke SOD adalah negatif demikian juga SOD ke GAG, tetapi hasil penelitian ini menghasilkan sebaliknya, yaitu pengaruhnya positif. Secara teoritis pengaruh MDA ke GAG adalah positif, tetapi hasil penelitian ini menunjukkan negatif.

Hasil analisis terhadap Model I, tidak sesuai dengan landasan teori dan konsep, sehingga dapat dikatakan bahwa mekanisme jalur pengaruh gangguan biomekanik terhadap kerusakan tulang rawan tidak dapat dijelaskan oleh Model I. Di dalam Model I ini dicirikan adanya pengaruh timbal balik antara iNOS dengan stress oksidatif dan efek langsung dari gangguan biomekanik terhadap kerusakan tulang rawan.

#### 5.6.2 Model II

Pada model hipotetik II, jalur pengaruh yang diselidiki dan diuji adalah:

- (a) Gangguan biomekanik berpengaruh ke MDA, SOD, dan iNOS secara langsung (*direct effect*), tetapi tidak ada pengaruh langsung ke GAG.

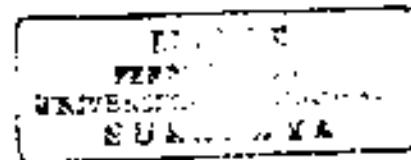
- (b) Stress oksidatif (MDA dan SOD) berpengaruh timbal balik dengan iNOS
- (c) MDA, SOD dan iNOS berpengaruh ke GAG secara langsung (*direct effect*)

Hasil analisis terhadap Model II dapat dijelaskan sebagai berikut. Pengaruh gangguan biomekanik terhadap iNOS sel dan SOD adalah positif, sedangkan terhadap MDA adalah negatif, dengan koefisien ( $\beta$ ) masing-masing secara berturut-turut 7.565, 2.581 dan -20.953. Jalur-jalur tersebut yang pengaruhnya bermakna adalah dari gangguan biomekanik ke iNOS sel ( $p < 0.05$ ).

Pengaruh SOD dan iNOS sel ke GAG adalah positif, sedangkan MDA adalah negatif, dengan koefisien path masing-masing secara berturut-turut 0.497, 3.459 dan -0.093. Jalur pengaruh yang bermakna adalah dari iNOS sel dan MDA ke GAG ( $p=0.000$ ).

Secara teoritis seharusnya pengaruh gangguan biomekanik ke SOD adalah negatif demikian juga SOD ke GAG, tetapi hasil penelitian ini menghasilkan sebaliknya, yaitu pengaruhnya positif. Secara teoritis pengaruh MDA ke GAG adalah positif, tetapi hasil penelitian ini menunjukkan negatif.

Pengaruh gangguan biomekanik terhadap iNOS matriks dan SOD adalah positif, sedangkan terhadap MDA adalah negatif, dengan koefisien ( $\beta$ ) masing-masing secara berturut-turut 2.757, 1.478 dan -3.310. Jalur-jalur tersebut yang pengaruhnya bermakna adalah dari gangguan biomekanik ke iNOS matriks ( $p < 0.05$ ).



Pengaruh SOD dan iNOS matriks ke GAG adalah positif, sedangkan MDA adalah negatif, dengan koefisien path masing-masing secara berturut-turut 0.091, 7.648 dan -0.011. Jalur-jalur tersebut yang pengaruhnya signifikan adalah dari iNOS matriks ke GAG ( $p < 0.05$ ).

Secara teoritis seharusnya pengaruh gangguan biomekanik ke SOD adalah negatif demikian juga SOD ke GAG, tetapi hasil penelitian ini menghasilkan sebaliknya, yaitu pengaruhnya positif. Secara teoritis pengaruh MDA ke GAG adalah positif, tetapi hasil penelitian ini menunjukkan negatif.

Hasil analisis terhadap Model II, tidak sesuai dengan landasan teori dan konsep, sehingga dapat dikatakan bahwa mekanisme jalur pengaruh gangguan biomekanik terhadap kerusakan tulang rawan tidak dapat dijelaskan oleh Model II. Di dalam Model II ini dicirikan adanya pengaruh timbal balik antara iNOS dengan stress oksidatif dan tidak ada efek langsung dari gangguan biomekanik terhadap kerusakan tulang rawan.

### 5.6.3 Model III

Pada model hipotetik III, jalur pengaruh yang diuji adalah:

- (a) Gangguan biomekanik berpengaruh ke MDA, SOD, iNOS dan GAG secara langsung (*direct effect*)
- (b) iNOs berpengaruh stress ke oksidatif (MDA dan SOD) dan tidak bersifat rimbal balik.
- (c) MDA, SOD dan iNOS berpengaruh ke GAG secara langsung (*direct effect*)

Hasil analisis terhadap Model III dapat dijelaskan sebagai berikut. Pengaruh gangguan biomekanik terhadap iNOS sel, MDA dan GAG adalah positif, sedangkan terhadap SOD adalah negatif, dengan koefisien ( $\beta$ ) masing-masing secara berturut-turut 4.889, 21.684 3.317 dan -2.726. Jalur-jalur tersebut yang pengaruhnya bermakna adalah dari gangguan biomekanik ke iNOS sel ( $p < 0.05$ )

Pengaruh dan iNOS sel dan SOD ke GAG adalah positif, sedangkan MDA adalah negatif, dengan koefisien path masing-masing secara berturut-turut 2.491, 0.220 dan -0.037.

Secara teoritis pengaruh SOD ke GAG negatif dan MDA ke GAG adalah positif, tetapi hasil penelitian ini menunjukkan sebaliknya.

Pengaruh gangguan biomekanik terhadap iNOS matriks, MDA dan GAG adalah positif, sedangkan terhadap SOD adalah negatif, dengan koefisien ( $\beta$ ) masing-masing secara berturut-turut 1.469, 32.525, 10.477 dan -3.608. Jalur-jalur tersebut yang pengaruhnya signifikan adalah dari gangguan biomekanik ke iNOS matriks ( $p < 0.05$ ).

Pengaruh SOD dan iNOS matriks ke GAG adalah positif, sedangkan MDA adalah negatif, dengan koefisien  $\beta$  masing-masing secara berturut-turut 0.689, 4.263 dan -0.085.

Secara teoritis seharusnya pengaruh SOD ke GAG, tetapi hasil penelitian ini menghasilkan sebaliknya, yaitu pengaruhnya positif. Secara teoritis pengaruh MDA ke GAG adalah positif, tetapi hasil penelitian ini menunjukkan negatif.

Hasil analisis terhadap Model III, tidak sesuai dengan landasan teori dan konsep, sehingga dapat dikatakan bahwa mekanisme jalur pengaruh gangguan biomekanik terhadap kerusakan tulang rawan tidak dapat dijelaskan oleh Model III. Di dalam Model III ini dicirikan adanya pengaruh iNOS ke stress oksidatif (tidak bersifat timbal balik) dan efek langsung dari gangguan biomekanik terhadap kerusakan tulang rawan.

#### 5.6.4 Model IV

Pada model hipotetik IV, jalur-jalur pengaruh yang diuji adalah.

- (a) Gangguan biomekanik berpengaruh ke MDA, SOD, iNOS dan GAG secara langsung (*direct effect*)
- (b) Stress oksidatif (MDA dan SOD) berpengaruh ke iNOS dan tidak bersifat timbal balik
- (c) MDA, SOD dan iNOS berpengaruh ke GAG secara langsung (*direct effect*)

Hasil analisis terhadap Model IV dapat dijelaskan sebagai berikut. Pengaruh gangguan biomekanik terhadap iNOS sel, MDA dan GAG adalah positif, sedangkan terhadap SOD adalah negatif, dengan koefisien  $\beta$  masing-masing secara berturut-turut 3.624, 34.421, 4.806 dan -2.360. Jalur-jalur tersebut yang pengaruhnya signifikan adalah dari gangguan biomekanik ke iNOS sel dan MDA ( $p < 0.05$ ).

Pengaruh dan iNOS sel dan SOD ke GAG adalah positif, sedangkan MDA ke GAG adalah negatif, dengan koefisien  $\beta$  masing-masing secara berturut-turut 1.597, 0.175 dan -0.014.



Secara teoritis pengaruh SOD ke GAG negatif dan MDA ke GAG adalah positif, tetapi hasil penelitian ini menunjukkan sebaliknya.

Pengaruh Gangguan biomekanik terhadap iNOS matriks, MDA dan GAG adalah positif, sedangkan terhadap SOD adalah negatif, dengan koefisien  $p$  masing-masing secara berturut-turut 0.906, 30.235, 5.176 dan  $-1.934$ . Jalur-jalur tersebut yang pengaruhnya signifikan adalah dari gangguan biomekanik ke iNOS matriks ( $p < 0.05$ ).

Pengaruh MDA dan iNOS matriks ke GAG adalah positif, sedangkan SOD adalah negatif, dengan koefisien  $p$  masing-masing secara berturut-turut 0.028, 3.438 dan  $-0.007$ .

Hasil analisis Model IV untuk iNOS matriks sudah sesuai dengan teoritis. Akan tetapi untuk iNOS sel tidak sesuai dengan landasan teori dan konsep, sehingga dapat dikatakan bahwa mekanisme jalur pengaruh gangguan biomekanik terhadap kerusakan tulang rawan tidak dapat dijelaskan oleh Model IV. Di dalam Model IV ini dicirikan adanya pengaruh stress oksidatif ke iNOS (tidak bersifat timbal balik) dan efek langsung dari gangguan biomekanik terhadap kerusakan tulang rawan.

#### 5.6.5 Model V

Pada model hipotetik V, jalur-jalur pengaruh yang diuji adalah:

- (a) Gangguan biomekanik berpengaruh ke MDA, SOS, dan iNOS secara langsung (*direct effect*), tetapi tidak ada pengaruh langsung ke GAG.
- (b) iNOS berpengaruh ke stress oksidatif (MDA dan SOD) dan tidak bersifat timbal balik.

(c) MDA, SOD dan iNOS berpengaruh ke GAG secara langsung (*direct effect*)

Hasil analisis terhadap Model V dapat dijelaskan sebagai berikut. Pengaruh gangguan biomekanik terhadap iNOS sel dan MDA adalah positif, sedangkan terhadap SOD adalah negatif, dengan koefisien  $\beta$  masing-masing secara berturut-turut 5.004, 21.853 dan -2.216. Jalur-jalur tersebut yang pengaruhnya signifikan adalah dari gangguan biomekanik ke iNOS sel ( $p < 0.05$ ).

Pengaruh dan iNOS sel dan SOD ke GAG adalah positif, sedangkan MDA ke GAG adalah negatif, dengan koefisien  $\beta$  masing-masing secara berturut-turut 2.763, 0.067 dan -0.018.

Secara teoritis pengaruh SOD ke GAG negatif dan MDA ke GAG adalah positif, tetapi hasil penelitian ini menunjukkan sebaliknya.

Pengaruh gangguan biomekanik terhadap iNOS matriks dan MDA adalah positif, sedangkan terhadap SOD adalah negatif, dengan koefisien  $\beta$  masing-masing secara berturut-turut 1.445, 33.518 dan -3.830. Jalur-jalur tersebut yang pengaruhnya bermakna adalah dari gangguan biomekanik ke iNOS matriks ( $p < 0.05$ ).

Pengaruh SOD dan iNOS matriks ke GAG adalah positif, sedangkan MDA adalah negatif, dengan koefisien  $\beta$  masing-masing secara berturut-turut 0.253, 8.278 dan -0.038.

Secara teoritis seharusnya pengaruh SOD ke GAG, tetapi hasil penelitian ini menghasilkan sebaliknya, yaitu pengaruhnya positif. Secara teoritis pengaruh MDA ke GAG adalah positif, tetapi hasil penelitian ini menunjukkan negatif.

Hasil analisis Model V tidak sesuai dengan landasan teori dan konsep, sehingga dapat dikatakan bahwa mekanisme jalur pengaruh gangguan biomekanik terhadap kerusakan tulang rawan tidak dapat dijelaskan oleh Model V. Di dalam Model V ini dicirikan adanya pengaruh iNOS ke stress oksidatif (tidak bersifat timbal balik) dan tidak ada efek langsung dari gangguan biomekanik terhadap kerusakan tulang rawan.

#### 5.6.6 Model VI

Pada model hipotetik VI, jalur-jalur pengaruh yang diuji adalah:

- (a) Gangguan biomekanik berpengaruh ke MDA, SOD, dan iNOS secara langsung (*direct effect*), tetapi tidak ada pengaruh langsung ke GAG.
- (b) Stres oksidatif (MDA dan SOD) berpengaruh ke iNOS dan tidak bersifat timbal balik
- (c) MDA, SOD dan iNOS berpengaruh ke GAG secara langsung (*direct effect*)

Hasil analisis terhadap Model VI baik dalam bentuk diagram jalur maupun numerik disajikan pada gambar 5.20 model VI<sub>au</sub> (*unstandardize*), gambar 5.21 model VI<sub>as</sub> (*standardize*), gambar 5.22 model VI<sub>bu</sub> (*unstandardize*); gambar 5.23 model VI<sub>bs</sub> (*standardize*).

**Keterangan.**

*Unstandardize*: Bila satuan unit tiap variabel tidak disamakan, cenderung untuk melihat prediksi.

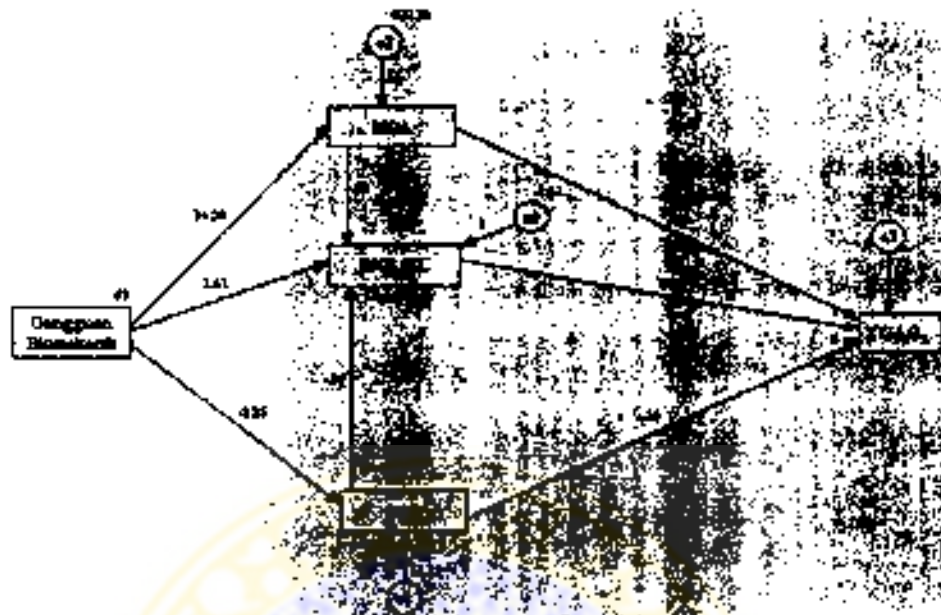
*Standardize*: Bila satuan unit tiap variabel disamakan untuk melihat jalur yang lebih kuat atau lemah.

Hasil analisis terhadap Model VI untuk iNOS sel dapat dijelaskan sebagai berikut. Pengaruh gangguan biomekanik terhadap iNOS sel dan MDA adalah positif, sedangkan terhadap SOD adalah negatif. Pengaruh langsung gangguan biomekanik ke iNOS sel dengan koefisien  $\beta(\text{path}) \approx 3.607$  ( $p \approx 0.0001$ ), ke MDA dengan koefisien  $\beta \approx 34.258$  ( $p \approx 0.0001$ ) dan ke SOD dengan koefisien  $\beta = -2.345$  ( $p = 0.0023$ ). MDA dan SOD berpengaruh ke iNOS sel dengan koefisien  $\beta$  masing-masing  $0.022$  ( $p = 0.120$ ) dan  $-0.067$  ( $p = 0.572$ ).

Pengaruh dari iNOS sel dan MDA ke GAG adalah positif, sedangkan SOD ke GAG adalah negatif. Pengaruh langsung MDA, SOD dan iNOS sel ke GAG masing-masing dengan koefisien  $\beta$   $0.025$  ( $p = 0.786$ ),  $-0.138$  ( $p = 0.824$ ) dan  $2.023$  ( $p = 0.061$ ).

Hasil pengujian terhadap model VI untuk iNOS sel ini beresesuaian dengan landasan teori yang ada dan secara jelas dapat dilihat pada gambar 5.20 dan 5.21 berikut:

Unstandardize iNOS sel



Gambar 5.20 Model VIau

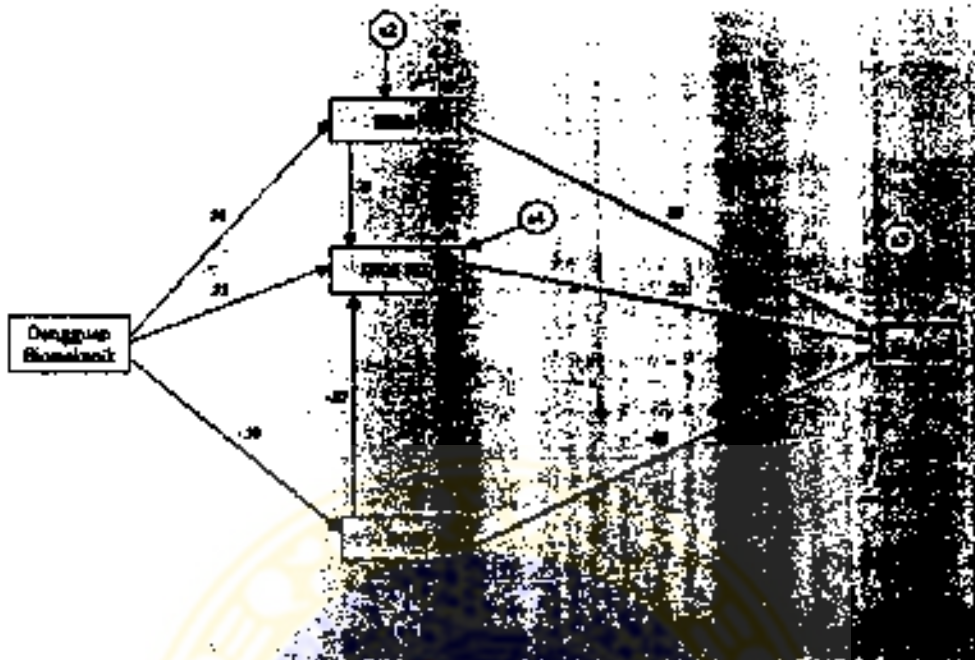
Keterangan :

Regression Weights

			Estimate	S.E.	C.R.	T	Label
MDA	<--	TREATMENT	34.258	8.732	3.923	0.000	par-1
SOD	<--	TREATMENT	-2.345	1.034	-2.267	0.028	par-4
iNOS_sel	<	TREATMENT	3.627	0.892	4.045	0.000	par-2
iNOS_sel	<	SOD	-1.067	0.118	-9.052	0.000	par-7
iNOS_sel	<--	MDA	0.022	0.014	1.553	0.121	par-8
DAG	<	iNOS_sel	1.023	1.081	0.946	0.341	par-3
DAG	<	SOD	-0.130	0.032	-4.022	0.000	par-5
DAG	<--	MDA	0.025	0.091	0.271	0.796	par-6



Standardize iNOS sel



Gambar 5.21 Model VI as

Keterangan :

Regression Weights

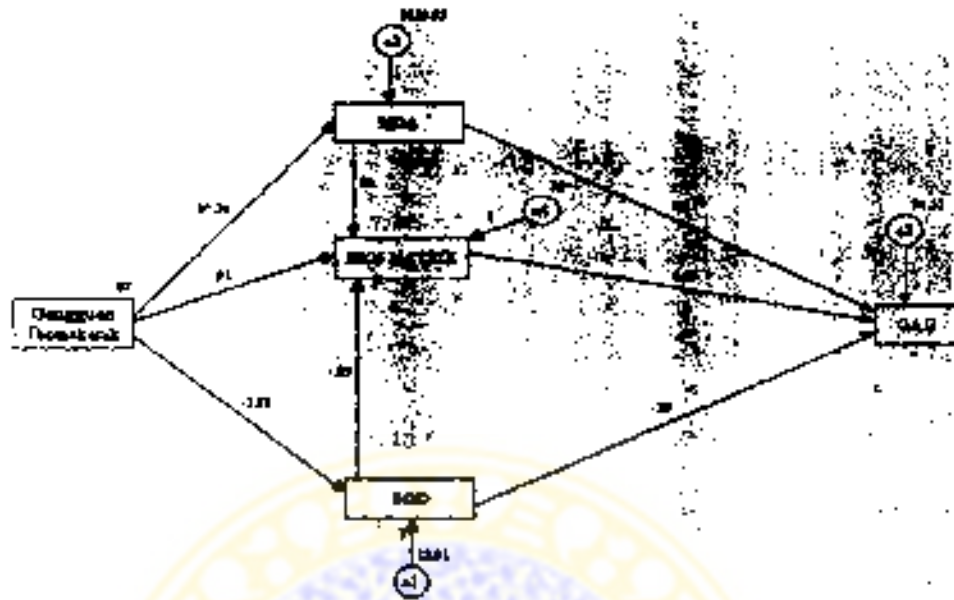
			Estimate
MDA	<--	TREATMENT	0.698
SOD	<--	TREATMENT	-0.487
iNOS_sel	<--	TREATMENT	0.747
iNOS_sel	<--	SOD	-0.065
iNOS_sel	<--	MDA	0.227
GAG	<--	iNOS_sel	0.722
GAG	<--	SOD	-0.346
GAG	<--	MDA	0.290

Hasil analisis terhadap Model VI untuk iNOS matriks dapat dijelaskan sebagai berikut. Pengaruh gangguan biomekanik terhadap iNOS matriks dan MDA adalah positif, sedangkan terhadap SOD adalah negatif. Pengaruh langsung gangguan biomekanik ke iNOS matriks dengan koefisien path = 0.906 ( $p = 0.056$ ), ke MDA dengan koefisien path = 30.235 ( $p = 0.007$ ) dan ke SOD dengan koefisien path = -1.934 ( $p = 0.095$ ). MDA dan SOD berpengaruh ke iNOS matriks dengan koefisien path masing-masing 0.010 ( $p = 0.204$ ) dan -0.049 ( $p = 0.423$ )

Pengaruh dan iNOS matriks dan MDA ke GAG adalah positif, sedangkan SOD ke GAG adalah negatif. Pengaruh langsung MDA, SOD dan iNOS matriks ke GAG masing-masing dengan koefisien path 0.064 ( $p = 0.670$ ), -0.288 ( $p = 0.693$ ) dan 4.663 ( $p = 0.187$ ).

Hasil pengujian terhadap model VI untuk iNOS matriks ini bersesuaian dengan landasan teori yang ada dan secara jelas dapat dilihat pada gambar berikut gambar 5.22 dan gambar 5.23:

*Unstandardize tNOS matriks*

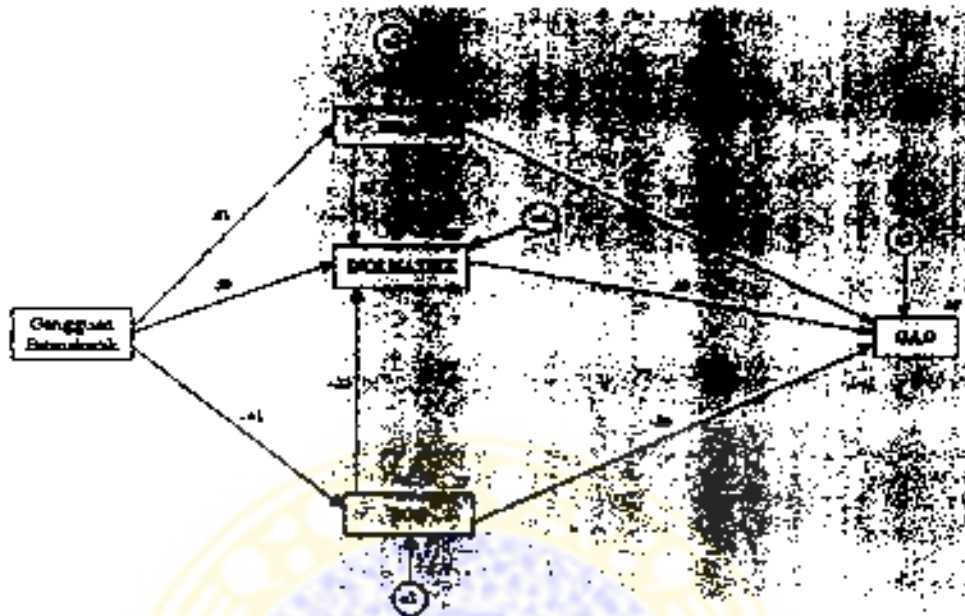


Gambar 5.22 Model Vibu

**Keterangan :**

Angka	Label	Estimate	SE	C.R.	P	Label	
1	MDA	TREATMENT3	1.231	1.1114	2.706	0.07	par-1
2	SOD	TREATMENT	1.430	1.119	-2.666	0.01	par-4
3	iNOS_MDA	TREATMENT	1.377	1.414	1.910	0.06	par-2
4	iNOS_MDR	SOD	0.1144	0.0461	2.601	0.01	par-7
5	iNOS_MDR	MDA	0.001	0.0374	1.271	0.04	par-6
6	GAG	iNOS_MDR	4.662	2.210	2.116	0.04	par-3
7	GAG	SOD	-0.1144	0.0374	-0.395	0.49	par-5
8	GAG	MDA	0.074	0.026	2.670	0.01	par-0

Standardize INOS matriks



Gambar 5.23 Model VIbs

Keterangan :

Standardized Koefisien	Wegans	Estimate
MDA	←	TREATMEN 0.612
GAD	←	TREATMEN -0.401
MDA	←	TREATMEN 0.593
INDS_MDA	←	SOD 0.143
INDS_MDA	←	MDA 0.710
GAD	←	INDS_MTR 1.486
GAD	←	SOD -0.190
GAD	←	MDA 1.214

Hasil analisis terhadap Model VI, menunjukkan bahwa semua jalur pengaruh gangguan biomekanik ke kerusakan tulang rawan (GAG) adalah sesuai dengan landasan teori dan konsep. Sehingga dapat dikatakan bahwa mekanisme pengaruh gangguan biomekanik terhadap kerusakan tulang rawan dapat dijelaskan oleh Model VI

Dengan demikian dapat dikatakan bahwa gangguan biomekanik berpengaruh ke GAG bersifat tidak langsung, melalui dua jalur mekanisme sebagai berikut:

- (a) Gangguan biomekanik berpengaruh ke stress oksidatif, kemudian stress oksidatif berpengaruh ke iNOS, dan akhirnya iNOS berpengaruh ke GAG.
- (b) Gangguan biomekanik berpengaruh ke iNOS, kemudian iNOS berpengaruh ke GAG

Bila melihat hasil analisa tabel 5.2. terdapat suatu pengaruh yang bermakna ( $p \leq 0.001$ ) dari derajat gangguan biomekanik instabilitas terhadap kerusakan proteoglikan yang digambarkan dengan peningkatan kadar GAG (glikosaminoglikan) pada tulang rawan sendi. Selain itu terdapat pengaruh yang bermakna ( $p \leq 0.001$ ) dari derajat gangguan biomekanik instabilitas terhadap timbulnya stres oksidatif yang digambarkan terjadinya peningkatan MDA (peroksidasi lemak), dan juga terdapat pengaruh yang bermakna ( $p \leq 0.001$ ) dari derajat gangguan biomekanik instabilitas terhadap timbulnya ekspresi iNOS baik di intraseluler maupun ekstra seluler.

Sedangkan dari analisa hasil pada tabel 5.3. terdapat korelasi (hubungan) yang bermakna ( $p \leq 0.001$ ) antara ekspresi iNOS yang dalam hal ini menggambarkan



terbentuknya  $\text{NO}^*$ , dengan kerusakan proteoglikan (kadar GAG meningkat). Jadi jelas tampak pengaruh derajat gangguan biomekanik instabilitas terhadap kerusakan proteoglikan akan melalui jalur ekspresi iNOS, dengan arti kata lain bahwa gangguan instabilitas akan meningkatkan produksi  $\text{NO}^*$  dan merusak proteoglikan.

Dari data analisis korelasi tersebut di atas dapat diambil suatu hasil analisis yang sesuai dengan hasil analisis jalur (*path analysis*) bahwa gangguan biomekanik instabilitas menyebabkan kerusakan tulang rawan sendi (GAG) melalui dua jalur:

- (1) Jalur gangguan biomekanik instabilitas ke MDA (peroksidasi lemak) kemudian ke ekspresi iNOS (sel dan matriks) dan selanjutnya ke GAG (kerusakan tulang rawan sendi)
- (2) Jalur gangguan biomekanik ke ekspresi iNOS (sel dan matriks) ke GAG (kerusakan tulang rawan sendi)

**BAB 6****PEMBAHASAN**

Pembahasan di bawah ini disajikan berdasarkan analisis hasil penelitian dihubungkan dengan konsep dan teori yang sudah ada. Pendekatan pembahasan di bawah ini melalui rumusan masalah dan menjawab hipotesis yang dibuat dengan merujuk pada bab sebelumnya.

### **6.1 Derajat gangguan biomekanik instabilitas berpengaruh terhadap kerusakan proteoglikan**

Dari hasil analisis statistik ANOVA terdapat perbedaan pengaruh yang bermakna ( $p \leq 0.001$ ) dari gangguan biomekanik instabilitas kombinasi transeksi ACL dan menisektomi, dengan menisektomi saja atau dengan kontrol terhadap kadar GAG. Hasil tersebut dapat dilihat dalam bentuk grafik seperti pada gambar 5.15.

Dari hasil analisis data di atas menunjukkan bahwa lebih besar gangguan biomekanik instabilitas, akan terjadi peningkatan kadar GAG di dalam tulang rawan khususnya di dalam ECM. Hal ini berarti menandakan terjadinya kerusakan proteoglikan yang lebih besar secara berurutan adalah pada kelompok AM, kelompok M, dan kelompok K.

Dari analisis histopatologik ditemukan banyak kondrosit yang mengalami apoptosis pada kelompok AM, dan kelompok M dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dikemukakan oleh Hashimoto *et al.*,



(1998), bahwa pada stress mekanik berlebihan akan cenderung terjadi peningkatan produksi  $\text{NO}^*$ , dan mengakibatkan apoptosis kondrosit.

Banyak fenomena fisik yang terjadi pada tulang rawan pada saat pemberian beban berlebihan dalam pengamatan *in vivo*: timbulnya fibrilasi, fissura, erosi pada permukaan tulang rawan, dan dalam pengamatan *in vitro*: terjadi deformasi matriks ekstraseluler dan sel kondrosit pada kompresi tulang rawan, adanya aliran cairan, timbul arus potensial listrik, perubahan isi air dalam matriks, adanya konsentrasi ion bebas, dan tekanan osmotik. Salah satu diantara hal tersebut baik fenomena mekanik, kimiawi, atau listrik dapat memodulasi atau merubah metabolisme matriks. (Hing W.A., *et al.*, 2002).

Meniskus berfungsi selain sebagai peredam kejut juga sebagai stabilitas sendi lutut oleh karena bentuknya sedemikian rupa membentuk kongruensi antara permukaan tulang rawan kondilus femur yang berbentuk lengkung dengan permukaan tulang rawan tibia yang berbentuk datar. Keadaan ini menjadikan meniskus sebagai organ yang dapat mendistribusikan gaya beban lutut lebih merata di kedua permukaan tulang rawan baik pada kondilus femur maupun pada permukaan tibia (Setton L.A., *et al.*, 1999; Woo S.L-Y., *et al.*, 1995). Oleh sebab itu bila meniskus diangkat (menisektomi), maka akan timbul *high focal stress* (tekanan tinggi pada suatu zona tertentu) pada permukaan tulang rawan sendi karena hilangnya distribusi beban. Selain itu juga akan menambah terjadinya instabilitas yang memperbesar stres gesekan.

Instabilitas anterior merupakan suatu keadaan dimana terjadi translasi atau pergeseran antara kedua permukaan sendi dalam hal ini sendi lutut, yaitu permukaan sendi kondilus femur akan translasi atau bergeser ke anterior terhadap permukaan sendi tibia pada saat pemberian beban atau pergerakan sendi. Keadaan ini disebabkan putusnya ligamen cruciatum anterior atau *anterior cruciate ligament* (ACL). Putusnya ACL tersebut akan diperberat bila disertai dengan tidak adanya meniskus yang berfungsi menopang beban.

Pergeseran (*translation*) ke arah anterior terjadi diantara kedua permukaan tulang rawan sendi antara permukaan kondilus femur terhadap permukaan tulang tibia pada saat pemberian beban dan pergerakan sendi lutut. Geseran tersebut menimbulkan gaya gesekan yang sejajar dengan permukaan tulang rawan sendi. Gesekan kedua permukaan tulang rawan pada saat beban berat badan tersebut menimbulkan stres gesekan (*shear stress*) dan stres tekanan (*compressive stress*) yang meningkat (Woo SL-Y, *et al.*, 2001).

Meningkatnya instabilitas menurut beberapa peneliti terdahulu akan bertambah 10% hingga 30%, bila putusnya ACL disertai dengan hilangnya meniskus medialis (Shoemaker SC, Markolf KL, 1986; Woo SL-Y, *et al.*, 2001).

Gabungan antara menisektomi dan ACL transeksi akan menyebabkan keadaan tekanan tinggi pada zona tertentu (*high focal stress*) dan meningkatnya stres gesekan (*shear stress*), sehingga dapat dipastikan bahwa akibat gabungan antara menisektomi dan transeksi ACL akan menimbulkan tekanan atau gaya beban pada permukaan

kedua tulang rawan sendi yang lebih besar dibandingkan dengan akibat menisektomi saja.

Seperti diketahui tekanan yang berlebihan akan menimbulkan perubahan pada tulang rawan baik secara morfologik, biokimiawi, maupun biologi molekuler. Banyak pendapat tentang penyebab timbulnya perubahan yang terjadi pada tulang rawan yang berakhir dengan terjadinya degradasi atau kerusakan tulang rawan. Teori tentang bagaimana respon metabolik kondrosit terhadap rangsang mekanik masih banyak yang belum diketahui.

Penelitian menunjukkan bahwa kondrosit mempunyai peran penting dalam pengaturan metabolisme tulang rawan sendi. Keadaan lingkungan ataupun rangsang dari luar akan menyebabkan perubahan pada perilaku kondrosit termasuk diantaranya rangsang berupa perubahan pH, tekanan osmotik, aliran ion, tekanan oksigen dan lain sebagainya (Mow VC, 1995; Setton LA, 1999).

Tekanan pada daerah atau zona tertentu dan stres gesekan yang berlebihan maupun gabungan keduanya akan menimbulkan deformasi dari matriks tulang rawan, terjadi aliran ion yang menyebabkan penarikan air lebih banyak oleh proteoglikan, dan mengakibatkan tekanan pembengkakan meningkat. Kondrosit pun akan mengalami perubahan bentuk, dan perubahan lingkungan, yang keduanya merupakan sinyal mekanoelektrokimiawi baginya dan hal ini sebagai otokrin bagi gen di kondrosit dan akan mengekspresikan beberapa sitokin antara lain IL-1 dan TNF- $\alpha$ , serta iNOS. Sitokin IL-1 dan TNF- $\alpha$  akan mengaktifasi kondrosit mengeluarkan enzim proteolitik *Metalloprotease*, *Serine protease*, *Agreganase* dan



*Thiol protease*. Enzim tersebut akan merusak proteoglikan dan kolagen. Selain itu ekspresi iNOS oleh kondrosit dipacu oleh IL-1 dan TNF- $\alpha$  dan dihambat oleh sitokin dan faktor pertumbuhan lain misalnya IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ .

Hal tersebut merupakan suatu proses otokrin dan parakrin bagi kondrosit dimana gangguan biomekanik merupakan faktor pemicu terbentuknya IL-1 dan TNF- $\alpha$  dan diikuti dengan terbentuknya NO<sup>\*</sup> yang akan menghambat sintesis dan merusak komponen ECM. Produksi sitokin dan NO<sup>\*</sup> dilanjutkan dan diperkuat dengan adanya sinyal berasal dari produk degradasi komponen ECM seperti halnya integrin, fibronektin yang diterima oleh reseptor kondrosit (Abramson AR *et al.*, 2001)

Bila mengingat bahwa perubahan lingkungan sel kondrosit akibat beban yang berlebihan, apakah berupa stres gesekan ataupun tekanan, merupakan suatu sinyal mekanoelektrokimiawi (Orodzinsky AJ, *et al.* 1998), maka dapat diperkirakan bahwa lebih besar beban, baik gesekan maupun tekanan, akan menimbulkan perubahan lingkungan yang lebih besar, sehingga dengan demikian akan terjadi sinyal yang lebih kuat bagi kondrosit. Sinyal yang kuat akan lebih mengaktifasi kondrosit untuk mengekspresikan pelepasan enzim proteolitik dan iNOS lebih banyak, sehingga akan menimbulkan kerusakan proteoglikan ataupun matriks ekstraseluler.

Analisis Tukeys menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara konsentrasi GAG pada perlakuan kontrol dengan perlakuan menisektomi atau menisektomi + transeksi ACL. Namun terdapat perbedaan tidak bermakna antara konsentrasi GAG pada perlakuan menisektomi dan kombinasi menisektomi + transeksi ACL. Hal ini kemungkinan beban stres baik gesekan maupun tekanan pada

kedua perlakuan tersebut tidak banyak berbeda. sehingga perubahan lingkungan yang terjadi disekitar kondrosit tidak banyak berbeda pula, dengan demikian sinyal mekanoelektrokimia yang ditimbulkan pun tidak banyak berbeda.

Dalam analisis histopatologik ditemukan peningkatan jumlah apoptosis sel kondrosit dengan perlakuan instabilitas. Jumlah sel apoptosis lebih banyak terdapat pada kelompok AM dibandingkan kelompok M ataupun kelompok kontrol. Hal ini menerangkan bahwa jumlah kondrosit akan berkurang dengan dampak sintesis dari komponen ECM akan berkurang pula. Apoptosis terjadi oleh karena peran  $\text{NO}^+$ , sehingga dapat diperkirakan produksi  $\text{NO}^+$  meningkat (sesuai dengan peningkatan kadar iNOS) yang akan menyebabkan kerusakan komponen ECM antara lain proteoglikan. Keadaan ini akan mengakibatkan penurunan sintesis proteoglikan diikuti dengan peningkatan kerusakan proteoglikan, sehingga terjadi ketidak seimbangan antara proses anabolisme dan katabolisme. Seperti diketahui proteoglikan banyak terdapat di periseluler, sehingga hal ini dapat menerangkan suatu fenomena dimana terjadi timbunan GAG di periseluler pada OA.

Dari hasil analisis di atas maka dapat diperkirakan dan di prediksi bahwa derajat instabilitas yang berat yang melibatkan dua atau lebih komponen stabilitas sendi bila tidak ditanggulangi dengan semestinya akan menimbulkan kerusakan tulang tawan sendi. Hal ini mendukung konsep tentang pentingnya stabilitas sendi di dalam pencegahan terhadap osteoarthritis.

Uraian pembahasan di atas menjawab subhipotesis pertama bahwa derajat instabilitas sendi berpengaruh terhadap derajat kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi, sehingga **dengan demikian subhipotesis pertama terbukti dan diterima.**

## **6.2 Derajat instabilitas sendi berpengaruh terhadap derajat stres oksidatif pada tulang rawan sendi.**

Hasil analisis data ANOVA menunjukkan perbedaan pengaruh yang sangat bermakna ( $p \leq 0,001$ ) di antara ketiga bentuk perlakuan terhadap stres oksidatif yang di dalam hal ini indikatornya adalah MDA dan SOD. Merujuk ke tabel 5.2, gambar 5.6 dan 5.7 tampak kadar MDA tertinggi pada kelompok AM diikuti dengan kelompok M dan K, sedangkan kadar SOD sebaliknya, yaitu tertinggi pada kelompok K, diikuti kelompok M dan AM. Hal ini sesuai dengan teori bahwa stres oksidatif akan menyebabkan kadar anti oksidan akan menurun.

Dalam analisis histopatologi ditemukan gambaran nekrosis kondrosit yang sangat mungkin disebabkan oleh stres oksidatif radikal bebas oksigen, baik berupa peroksidasi lemak,  $ONOO^-$  dan lainnya. Terdapat perbedaan jumlah nekrosis sel kondrosit pada tiap perlakuan, dimana jumlah nekrosis sel terbanyak pada kelompok perlakuan AM diikuti dengan kelompok M dan kontrol. Hal ini menunjang temuan peringkatan kadar MDA dan penurunan kadar SOD pada kelompok perlakuan AM dan M. Dengan demikian jelas terdapat proses peroksidasi lemak yang menyebabkan terjadinya nekrosis kondrosit.

Fungsi tulang rawan pada sendi sinovial, utamanya adalah sebagai penyanggah berat, merupakan material yang tahan terhadap beban mekanik. Pada manusia tulang rawan dibebani oleh keadaan beban statik maupun dinamik dalam ruang lingkup luas, dengan puncak amplitudo stres hingga 100 – 200 atmosfer seperti misalnya dalam keadaan memanjat tangga. Kemampuan tulang rawan sendi untuk menahan gaya tekanan, regangan dan gesekan sangat bergantung kepada komposisi dan integritas struktur dari matriks ekstraseluler. Kemampuan untuk mempertahankan fungsi tahan gaya beban dibutuhkan peran kondrosit di dalam melakukan sintesis, membangun dan merusak proteoglikan, kolagen, protein non kolagen, dan glikoprotein serta molekul molekul matriks yang lain. Pengaturan daripada proses metabolik tersebut, secara *in vivo* tampaknya melibatkan kombinasi antara biologik sel dan mekanisme fisik. (Grodzinsky AJ., *et al.*, 1998)

Secara *in vivo* pada pengamatan klinik maupun pengamatan hewan coba menunjukkan bahwa beban pada sendi dan pergerakan sendi dapat memicu respon metabolik yang luas pada tulang rawan sendi. Beban dan gerak pada sendi yang siklik atau dinamik dalam batas fisiologik akan meningkatkan sintesis proteoglikan, namun gerak statik atau immobilisasi yang berlebihan disertai gaya beban besar akan menyebabkan kerusakan tulang rawan. Dengan kata lain tampaknya beban sendi dalam batas normal akan memacu terjadinya suatu keseimbangan atau penyesuaian struktural, sedangkan beban atau gaya mekanik yang tidak normal akan menyebabkan kerusakan matriks dan degenerasi tulang rawan ( D'Lima DD, *et al.*, 2001).

Biologi sel dan mekanisme transduksi yang terjadi dimana kondrosit merespon terhadap rangsang mekanik, hingga saat ini masih belum diketahui secara pasti, khususnya di dalam penelitian *in vivo*. Kerumitan dalam menentukan berapa besar kuantitas beban biomekanik dan bagaimana membedakan antara efek langsung dan efek tidak langsung dari beban tersebut pada metabolisme tulang rawan masih banyak dipertanyakan. Pengertian tentang mekanisme transduksi akan lebih sulit dicapai mengingat pentingnya peran matriks ekstraseluler dan kerumitan interaksi matriks-sel kondrosit (Mow VC., *et al.*, 1999).

Selain perubahan lingkungan akan mengekspresikan kondrosit terhadap pengeluaran sitokin *pro-inflammatory*, enzim proteolitik dan iNOS, kemungkinan tekanan oksigen yang naik turun akibat stres beban yang hilang timbul dapat menimbulkan stres oksidatif bagi kondrosit.

Melihat analisis hasil pengamatan MDA dari penelitian ini, terdapat pengaruh yang bermakna dari derajat instabilitas terhadap kadar MDA ( $p < 0,001$ ). Hal ini menandakan bahwa lebih besar derajat instabilitas akan menimbulkan proses peroksidasi lemak (*lipid peroxidation*) yang lebih berat. (merujuk pada tabel 5.2 dan gambar 5.6)

Seperti diketahui peroksidasi lemak merupakan suatu proses stres oksidatif yang pada hakekatnya di picu oleh radikal oksigen hidroksil 1 ( $OH^{\bullet}$ ). Terbentuknya  $OH^{\bullet}$  antara lain dari adanya reaksi  $O_2^-$  dengan  $H_2O_2$  (reaksi Haber Weiss) atau dipercepat dengan katalisator Fe atau Cu (reaksi Fenton). Reaksi ini terjadi pada proses stres hipoksia reperfusi.



$\text{OH}^\bullet$  merupakan radikal oksigen yang dapat memicu timbulnya proses peroksidasi lemak, dan proses tersebut dapat ditimbulkan pada keadaan stres hipoksia-reperfusion. Telah diketahui bahwa stres hipoksia reperfusion dapat terjadi bila suatu jaringan yang dalam hal ini jaringan tulang rawan mengalami penurunan tekanan oksigen yang mengakibatkan terjadinya penurunan ATP. Kondrosit akan mengalami metabolisme anaerobik yang mengakibatkan energi menurun sehingga terjadi gangguan transportasi kalsium menembus membran sel. Keadaan ini menimbulkan penumpukan ion kalsium sehingga konsentrasi ion kalsium di sitosol meningkat dan keadaan ini diyakini menyebabkan aktivasi enzim protease yang merubah xantua dehidrogenase menjadi xantin oksidase. Penurunan ATP membentuk hipoxantin yang selanjutnya dengan adanya oksigen, bersama dengan xantin oksidase akan membentuk radikal  $\text{O}_2^\bullet$  yang selanjutnya dengan adanya SOD dan  $\text{H}_2\text{O}_2$  maka akhirnya terbentuk  $\text{OH}^\bullet$  (Granger N., 1986).

Keadaan hipoksia di dalam jaringan tulang rawan merupakan keadaan yang relatif, oleh karena kondrosit memang berada dalam lingkungan dengan tekanan oksigen yang rendah. Pada keadaan instabilitas akibat transeksi ACL, terjadi *shear stress* (stres gesekan) dan *compressive stress* (stres tekanan, akibat beban) menyebabkan pemberhentian aliran cairan matriks interstisial, yang akan menimbulkan gangguan transportasi dari nutrisi dan oksigen. Keadaan ini akan mengakibatkan tekanan oksigen matriks tulang rawan menurun dan kondrosit berada di dalam lingkungan hipoksia. Gerakan dinamik pada sendi selain stres gesekan dan stres kompresi, khususnya pada keadaan menisektomi akan terjadi *high focal stress*

yang menimbulkan tekanan interstisial lebih meningkat, dan perbedaan tekanan yang terjadi mengakibatkan aliran cairan keluar. Keadaan ini diikuti dengan masuknya kembali cairan ke dalam matriks pada saat tekanan atau beban menghilang, yang menyebabkan nutrisi dan tekanan oksigen di dalam matriks meningkat dan terjadi reperfusi kembali (Dewire P, Einhorn TA, 2001). Namun seperti diketahui di dalam penelitian *in vitro*, untuk mencapai keseimbangan tekanan di dalam matriks tulang rawan dan di luar matriks (cairan sinovial) diperlukan waktu tertentu, yaitu 2,5 hingga 6 jam, dan keadaan ini tidak akan pernah dicapai pada saat sendi mengalami stres beban dan pergerakan sendi. Dengan demikian tidak akan pernah tercapai keadaan tekanan pada kondisi normal (Mankin HJ, *et al.*, 2000).

Keadaan hilang timbulnya stres yang berlebihan menimbulkan keluar dan berhentinya aliran cairan ECM dan akan mengalir masuk kembali ke ECM. Keadaan ini tampaknya akan menimbulkan keadaan hipoksia reperfusi dengan akibat timbulnya stres oksidatif yang akan menghasilkan hidroksil radikal ( $\text{OH}^{\bullet}$ ).

Dapat diperkirakan bahwa  $\text{OH}^{\bullet}$  yang terbentuk akan menarik atom hidrogen dari ikatan C-H asam lemak tidak jenuh, mengingat atom hidrogen memiliki elektron tunggal, maka elektron yang tidak berpasangan akan tertinggal di senyawa karbon sehingga terjadi peroksidasi lemak (Halliwell B, Gutteridge MC., 1999).

Timbulnya stres oksidatif dapat dilihat dengan penurunan kadar SOD sebagai antioksidan yang meredam  $\text{O}_2^{\bullet -}$ . Dari gambar 5.7 menunjukkan grafik penurunan kadar SOD secara berurutan pada perlakuan menisektomi dan transeksi ACL dibandingkan dengan perlakuan menisektomi saja dan kontrol.



Bila dilihat dari hasil analisis data bahwa tidak ada korelasi antara kadar MDA dengan SOD, menunjukkan bahwa SOD bukan merupakan antioksidan terhadap MDA yang merupakan hasil akhir dari peroksidasi lemak, namun SOD merupakan antioksidan terhadap  $O_2^-$  yang dalam hal ini terbentuk pada proses stress hipoksia reperfusi.

$O_2^-$  yang terbentuk dari hasil proses hipoksia reperfusi sebagian akan bereaksi dengan SOD membentuk  $OH^\bullet$  dan sebagian bereaksi juga dengan  $NO^\bullet$  membentuk  $ONOO^-$  yang radikal dan dapat merusak tulang rawan sendi

Uraian pembahasan di atas jelas menunjukkan bahwa gangguan biomekanik instabilitas dapat menimbulkan stres oksidatif diikuti dengan proses peroksidasi lemak yang menyebabkan nekrosis sel. Hal ini menjawab subhipotesis kedua bahwa derajat instabilitas sendi berpengaruh terhadap derajat stres oksidatif di dalam tulang rawan sendi, dengan demikian subhipotesis kedua terbukti dan dapat diterima.

### 6.3 Stres oksidatif merusak proteoglikan tulang rawan sendi *in vivo*.

Hasil analisis korelasi menunjukkan hubungan antara kadar MDA dengan kadar GAG ( $r = 0.585$ ) dengan nilai  $p$  yang bermakna ( $0.011$ ). Selain itu pada analisis jalur terdapat pengaruh dari MDA ke GAG melalui iNOS, pengaruh tersebut positif. Hasil penelitian ini didukung dengan temuan gambaran kondrosit yang mengalami nekrosis tidak berada di daerah *high focal stress* pada sediaan kelompok AM dan M. Ini menunjukkan bahwa nekrosis sel bukan oleh karena rudapaksa langsung, melainkan kemungkinan besar diakibatkan karena ROS atau peroksidasi lemak.

Gambaran ekspresi GAG timbul pada ekstraseluler atau periseluler dan intraseluler. Keadaan ini memberikan petunjuk terjadinya kerusakan proteoglikan yang memang banyak terdapat disekitar sel (periseluler) dan adanya komponen GAG berada di intraseluler, dimana pada sediaan kontrol tidak menunjukkan hal yang sama. Ekspresi GAG intraseluler memberi arti bahwa kondrosit yang mengalami nekrosis diakibatkan peroksidasi lemak karena stres oksidatif akan melepas komponen GAG dan proteoglikan.

Seperti diketahui pada penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa radikal hidroksil dapat merusak proteoglikan (Dean RT, *et al.*, 1984; Baker MS, *et al.*, 1994; Shingu M, *et al.*, 1994; Kvam BJ, *et al.*, 1995; Schiller J, *et al.*, 1998). Namun penelitian secara *in vitro* tidak dapat menggambarkan keadaan *in vivo* sebenarnya, oleh karena lingkungan yang dibuat pada penelitian *in vitro* sulit untuk dapat menyamakan dengan keadaan lingkungan yang sebenarnya. Seperti diketahui bahwa perilaku suatu sel sangat dipengaruhi oleh keadaan lingkungan yang berperan sebagai sinyal terhadap sel itu sendiri

Seperti yang telah disebutkan di atas bahwa tulang rawan sendi merupakan jaringan tanpa pembuluh darah di dalamnya, berfungsi dengan lingkungan tekanan oksigen rendah. Pada penelitian *in vitro*, pemaparan eksplan media kultur kondrosit pada keadaan hipoksia dan normoksia, menunjukkan bahwa tekanan oksigen yang berubah pada keadaan hipoksia dan reoksigenisasi/reperfusi (*hypoxic reperfusion injury*) akan mempengaruhi produk sitokin IL-1 dan TNF- $\alpha$ . (Cernance J. *et al.* 2002).



Pada penelitian ini, dapat diperkirakan kondrosit memproduksi superoksida ( $O_2^-$ ) dan radikal hidroksil ( $OH^\bullet$ ) dari akibat timbulnya proses hipoksia reperfusi. Terbentuknya  $OH^\bullet$  akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak yang merusak kondrosit itu sendiri dan sebagian dari  $O_2^-$  bereaksi dengan  $NO^\bullet$  membentuk  $ONOO^-$ . Pada tabel 5.3 menunjukkan adanya hubungan yang bermakna ( $r = 0.585$ ,  $p \leq 0.011$ ) antara terjadinya stres oksidatif atau peroksidasi lemak dengan terbentuknya jumlah glikosaminoglikan (GAG) akibat kerusakan proteoglikan. Hal ini menunjukkan bahwa  $O_2^-$  dan  $OH^\bullet$  sebagian besar secara tidak langsung merusak proteoglikan, tetapi kedua radikal bebas oksigen tersebut akan bereaksi dengan  $NO^\bullet$  dan membentuk  $ONOO^-$  yang bersifat toksik terhadap sel. Meskipun radikal  $OH^\bullet$  tidak langsung merusak proteoglikan, namun menimbulkan peroksidasi lemak pada kondrosit dengan akibat nekrosis sel itu sendiri. Keadaan ini akan menurunkan sintesis proteoglikan oleh kondrosit dan akan memperberat ketidak seimbangan antara sintesis dan degradasi proteoglikan sehingga akan memperberat kerusakan tulang rawan sendi. Selain itu ROS yang terbentuk baik  $O_2^-$  maupun  $OH^\bullet$  akan memicu kondrosit meningkatkan ekspresi iNOS dan sitokin diantaranya  $IL-1\beta$  dan TNF- $\alpha$  (Tiku ML *et al.*, 2000; Pelletier JP. *et al.*, 2001). Dengan demikian maka terjadi peningkatan dari produksi  $NO^\bullet$  dan enzim MMP diantaranya adalah stromelisin yang merusak proteoglikan. Seperti yang diuraikan dalam bab 2,  $NO^\bullet$  mempunyai peran penting di dalam kerusakan tulang rawan sendi dan diantaranya menyebabkan apoptosis kondrosit, memicu produksi enzim MMP, menghambat TIMP, serta berperan di dalam proses timbulnya osteofit (Nishida K, *et al.*, 2001).



ROS yang menimbulkan stres oksidatif dalam hal ini  $O_2^-$  akan bereaksi dengan  $NO^*$  membentuk  $ONOO^-$  yang akan berubah kembali menjadi  $OH^*$ , sehingga dengan demikian akan terjadi suatu proses lingkaran setan yang akan memperberat keadaan kerusakan komponen tulang rawan. Hal ini sesuai dengan analisis jalur yang menunjukkan bahwa ROS akan memperkuat peran  $NO^*$ . Dengan demikian hal ini menjawab subhipotesis ketiga, bahwa stres oksidatif merusak secara tidak langsung tulang rawan sendi secara *in vivo*, yang berarti subhipotesis ketiga terbukti, dan diterima.

#### 6.4 Mekanisme peran stres oksidatif terhadap kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi dan mekanisme pengaruh gangguan biomekanik terhadap kerusakan tulang rawan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jalur mekanisme pengaruh gangguan biomekanik mengarah ke kerusakan tulang rawan sendi seperti pada Gambar 5.21 model VI as. Untuk menentukan jalur mekanisme peran stress oksidatif terhadap kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi dipakai model VI yang *standardize* oleh karena pada model ini, unit setiap variabel dibuat sama dan dipilih variabel tNOS sel.

Pengaruh langsung gangguan biomekanik ke tNOS sel dengan koefisien *path*  $\beta = 0.747$  ( $p = 0.0001$ ), ke MDA dengan koefisien *path*  $\beta = 0.698$  ( $p = 0.0001$ ) dan ke SOD dengan koefisien *path*  $\beta = -0.497$  ( $p = 0.0023$ ). MDA dan SOD berpengaruh ke tNOS sel dengan koefisien *path* masing-masing  $\beta = 0.227$  ( $p = 0.120$ ) dan  $\beta = -0.065$  ( $p = 0.572$ ). Pengaruh langsung MDA, SOD dan tNOS sel ke GAG masing-

masing dengan koefisien path  $p = 0.090$  ( $p = 0.786$ ),  $p = -0.048$  ( $p = 824$ ) dan  $p = 0.722$  ( $p = 0.061$ ). Dengan demikian dapat dikatakan bahwa gangguan biomekanik berpengaruh ke GAG bersifat tidak langsung, melalui jalur sebagai berikut:

- (a) Gangguan biomekanik ke MDA, kemudian MDA ke iNOS, dan akhirnya iNOS ke GAG, dengan koefisien path pengaruh tidak langsung (*indirect effect*) =  $0.698 \times 0.227 \times 0.722 = 0.1129$ . Berarti kontribusi relatif adalah  $(0.1129)^2 = 1,27 \%$
- (b) Gangguan biomekanik ke iNOS, kemudian iNOS ke GAG, dengan koefisien path pengaruh tidak langsung (*indirect effect*) =  $0.747 \times 0.722 = 0.5393$ , kontribusi relatif adalah  $(0,5393)^2 = 29,08 \%$
- (c) Pengaruh total (*total effect*) gangguan biomekanik ke GAG melalui dua jalur tersebut adalah =  $0,1129 + 0,5393 = 0,6522$

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diketahui besarnya kontribusi relatif pengaruh gangguan biomekanik ke kerusakan tulang rawan melalui dua jalur mekanisme tersebut adalah  $(0.6522)^2 = 0.4254$  atau 42.54 %. Dengan demikian tampaknya masih ada jalur yang perlu diselidiki dan diteliti lebih lanjut, mengingat masih tersisa 57.46 % jalur yang belum dapat dijelaskan melalui penelitian ini.

Seperti diketahui bahwa mekanisme kerusakan tulang rawan sendi pada kelainan OA, dapat melalui jalur enzimatik maupun jalur non enzimatik. Jalur enzimatik sebagian besar disebabkan oleh enzim proteolitik yang tidak termasuk dalam penelitian ini. Penelitian ini utamanya ditujukan untuk membuktikan adanya proses stres oksidatif yang disebabkan oleh spesies oksigen reaktif (ROS) berperan

pada jalur non enzimatis. Oleh sebab itu dapat diperkirakan bahwa jalur enzimatis ataupun jalur lain yang belum diketahui, mempunyai kontribusi yang masih tersisa yaitu 57,46 % di dalam mekanisme kerusakan proteoglikan pada gangguan biomekanik sendi. Mengingat terdapat interaksi antara ROS dan ekspresi sitokin, perlu dipertimbangkan penelitian lebih lanjut yang melibatkan kedua jalur enzimatis maupun non enzimatis tersebut secara bersama untuk mengetahui seberapa besar kontribusi peran stres oksidatif pada patogenesis kerusakan proteoglikan.

Pada analisis korelasi tabel 5.3 (bab 5) dapat dilihat hubungan yang sangat bermakna ( $r = 0,779$ ,  $p \leq 0,001$ ) antara MDA hasil proses peroksidasi lemak dengan ekspresi iNOS, yang berarti terdapat hubungan yang bermakna antara peroksidasi lemak dengan terbentuknya  $\text{NO}^*$ . Peroksidasi lemak dimulai dengan terbentuknya  $\text{O}_2^{\cdot -}$  yang berasal dari  $\text{O}_2$ , dimana kemungkinan besar  $\text{O}_2^{\cdot -}$  akan langsung bereaksi dengan SOD dan  $\text{H}_2\text{O}_2$  membentuk  $\text{OH}^*$ . Selain itu  $\text{O}_2^{\cdot -}$  dan  $\text{OH}^*$  bertindak sebagai sinyal intraseluler mengaktifasi gen kondrosit untuk sitokin  $\text{IL-1}\beta$  dan  $\text{TNF-}\alpha$  (memicu enzim MMPs) dan mengaktifasi produksi iNOS. Hal ini yang menyebabkan peningkatan produksi  $\text{NO}^*$  oleh kondrosit, yang telah terbukti di dalam penelitian *in vitro* (Tiku ML, *et al.*, 2000; Pelletier JP, *et al.*, 2001). Selanjutnya  $\text{O}_2^{\cdot -}$  akan bereaksi juga dengan  $\text{NO}^*$  membentuk  $\text{ONOO}^-$  dan sebaliknya dari  $\text{ONOO}^-$  dapat membentuk  $\text{OH}^*$  radikal. (Stamler JS, *et al.*, 1992, Pelletier JM, *et al.*, 1998)

Seperti diketahui pada beberapa penelitian terdahulu terdapat hubungan antara ROS dengan  $\text{NO}^*$ , dimana keduanya saling pengaruh mempengaruhi, namun

tampaknya pada penelitian gangguan biomekanik terhadap kerusakan tulang rawan sendi, ROS mempunyai pengaruh lebih besar terhadap  $\text{NO}^*$  di dalam proses kerusakan proteoglikan.

Diperkirakan dalam hal ini ROS memacu  $\text{NO}^*$  dengan cara mengaktifkan ekspresi iNOS. Dengan demikian  $\text{NO}^*$  yang meningkat akan lebih berperan di dalam proses kerusakan proteoglikan secara tidak langsung, dimana  $\text{NO}^*$  akan memodulasi dan mengaktifasi peran metalloprotease (MMPs) yaitu diantaranya stromelisin, dan meningkatkan kerentanan terhadap oksidan lain, yang kemungkinan besar adalah  $\text{OH}^*$ , dan akhirnya merusak proteoglikan.

Dari analisis histopatologik ditemukan lebih banyak apoptosis sel dibandingkan dengan nekrosis sel pada semua sedian (merujuk lampiran 13). Keduanya menyebabkan jumlah sel menurun dan keadaan ini didapatkan pada OA lanjut. Hasil dari temuan ini dapat diambil suatu kesimpulan bahwa pengaruh  $\text{NO}^*$  dan ROS yang menyebabkan apoptosis, mempunyai peran lebih besar dari ROS yang menyebabkan nekrosis.

Di dalam subbab ini dapat disimpulkan bahwa mekanisme pengaruh gangguan biomekanik terhadap kerusakan tulang rawan sendi pada jalur non enzimatis adalah melalui jalur sebagai berikut:

- (a) Gangguan biomekanik menimbulkan peroksidasi lemak yang diakibatkan diproduksinya  $\text{OH}^*$  oleh proses hipoksi reperfusi. Selanjutnya  $\text{OH}^*$  akan memacu kondrosit memproduksi iNOS menjadi  $\text{NO}^*$  yang merusak proteoglikan tulang rawan sendi.

(b) Gangguan biomekanik meningkatkan ekspresi iNOS oleh kondrosit, produksi NO<sup>•</sup> akan meningkat, dan menyebabkan kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi.

Dengan demikian kesimpulan ini menjawab subhipotesis 4, yaitu mekanisme stress oksidatif merusak proteoglikan secara tidak langsung melalui ekspresi iNOS. Demikian pula menjawab subhipotesis 5, bahwa mekanisme gangguan biomekanik instabilitas terhadap proses kerusakan proteoglikan melalui dua jalur (a) kondrosit – ekspresi iNOS – kerusakan matriks (b) kondrosit – stres oksidatif – kerusakan matriks. Namun demikian pada subhipotesis 5 b, jawaban terhadap jalur gangguan biomekanik yang menimbulkan stres oksidatif dan mengakibatkan kerusakan tulang rawan sendi, perlu diberi catatan bahwa kerusakan tulang rawan sendi tidak langsung disebabkan stres oksidatif akibat ROS. Dalam hal ini stress oksidatif akan merusak tulang rawan sendi yang secara tidak langsung melalui iNOS. Sehingga dengan demikian jawaban untuk subhipotesis 5b adalah sebagai berikut: gangguan biomekanik menimbulkan stres oksidatif ROS dan ekspresi iNOS meningkat, selanjutnya ROS juga akan mempengaruhi peningkatan iNOS, dengan akibat kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi. Maka dari uraian di atas dapat disimpulkan bahwa subhipotesis 4 dan subhipotesis 5 terbukti dan diterima.

Dalam penelitian secara kualitatif imunohistokimia iNOS didapatkan kesimpulan yang dapat dipakai sebagai landasan konsep baru yaitu bahwa ekspresi iNOS oleh kondrosit mempunyai peran di dalam proses perluasan kerusakan tulang



rawan sendi akibat instabilitas sendi. Hal tersebut akan dibahas pada subbab 6.5 di bawah ini.

### 6.5 Perluasan kerusakan tulang rawan sendi melalui ekspresi iNOS

Bila melihat hasil analisis pengecatan imunohistokimia dari iNOS tampak dalam tabel 5.2 dan gambar 5.8; gambar 5.9, bahwa terdapat perbedaan pengaruh yang bermakna ( $p \leq 0,001$ ) dari derajat ringan beratnya instabilitas dengan ekspresi iNOS baik pada intraseluler kondrosit maupun pada ekstraseluler matriks. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang terdahulu bahwa rangsang mekanik meningkatkan ekspresi iNOS. (Grodzinsky AJ, *et al.*, 1998).

Dalam gambar 5.14 terlihat bahwa ekspresi iNOS lebih tampak pada tepi dari sentra kerusakan tulang rawan sendi. Seperti yang telah disebutkan pada bab sebelumnya fenomena ini kemungkinan adalah karena terjadi kematian sel kondrosit baik oleh karena nekrosis maupun apoptosis (Hashimoto S, *et al.*, 1998). NO<sup>•</sup> dapat memicu terjadinya apoptosis, selain itu diperkirakan terjadi banyak nekrosis kondrosit pada daerah sentral kerusakan (*high focal stress*), sehingga tidak begitu tampak ekspresi iNOS pada daerah tersebut. Namun di daerah tepi sentral kerusakan, selama sinyal mekanoelektrokimia berlangsung, maka iNOS akan terus diproduksi oleh kondrosit, produksi NO<sup>•</sup> akan berlangsung terus menyebabkan proses kematian sel kondrosit dengan cara apoptosis dan memicu enzim proteolitik kerusakan tulang rawan. Keadaan ini akan memperluas kerusakan tulang rawan ke sekitar sentra kerusakan, sehingga daerah kerusakan tulang rawan bertambah luas.

Fenomena kerusakan tulang rawan yang meluas yang diakibatkan ekspresi iNOS merupakan suatu hasil samping penemuan baru pada penelitian ini.

Akhirnya dari uraian di atas dapat dibuat suatu rangkuman bahwasanya gangguan biomekanik instabilitas pada sendi menimbulkan kerusakan proteoglikan yang merupakan komponen tulang rawan sendi. Derajat gangguan biomekanik instabilitas berpengaruh terhadap kerusakan tulang rawan, yang berarti secara berurutan lebih berat gangguannya maka lebih berat kerusakannya. Salah satu faktor kerusakan tersebut disebabkan oleh karena stres oksidatif akibat timbulnya ROS, yang menimbulkan stress oksidatif peroksidasi lemak dan menyebabkan kematian sel kondrosit. Selain itu ROS mengaktifasi terbentuknya iNOS dan mengaktifasi peningkatan ekspresi enzim proteolitik (MMPs), khususnya stromelin . Terjadinya stres oksidatif bersama dengan peningkatan ekspresi iNOS yang memproduksi  $\text{NO}^*$ , merupakan dua reaksi yang sinergis di dalam proses kerusakan tulang rawan sendi pada mekanisme jalur non enzimatik (berdasarkan analisa jalur model struktural berkontribusi 42,54%). Timbulnya ROS yang menimbulkan stres oksidatif, disertai peningkatan kadar  $\text{NO}^*$ , akan mengaktifasi ekspresi sitokin dan MMPs, akan memperberat kerusakan tulang rawan sendi. Apoptosis kondrosit oleh karena  $\text{NO}^*$ , dan nekrosis kondrosit akibat ROS, menyebabkan sintesis ECM menurun. Penurunan sintesis komponen tulang rawan baik kolagen maupun proteoglikan dan komponen lainnya, disertai kerusakan matriks tulang rawan, merupakan proses yang menjadikan degenerasi tulang rawan lebih berat. Ekspresi iNOS yang timbul ditepi dari sentral

kerusakan menyebabkan perluasan kerusakan tulang rawan sendi oleh karena  $\text{NO}^+$  merupakan faktor penyebab apoptosis dari kondrosit dan memicu aktivasi enzim proteolitik.

Meskipun dalam skala kecil, peran oksidatif karena timbulnya ROS sangat penting pada kerusakan tulang rawan akibat gangguan biomekanik instabilitas, karena ROS bersama  $\text{NO}^+$  berperan hampir separuh dari mekanisme kerusakan tulang rawan sendi. ROS juga mengaktivasi ekspresi sitokin dan MMPs, sehingga dapat dikatakan bahwa mekanisme jalur non enzimatik mempunyai peran besar di dalam mengaktivasi mekanisme jalur enzimatik.



## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

Dari uraian analisis hasil penelitian dan pembahasan di atas, dapat dibuat kesimpulan yang berkaitan dengan hipotesis seperti yang tersebut dibawah ini

7.1.1 Gangguan biomekanik instabilitas berpengaruh terhadap derajat kerusakan proteoglikan yang merupakan salah satu komponen tulang rawan sendi. Derajat instabilitas yang lebih berat menyebabkan kerusakan proteoglikan yang lebih besar dan berakhir pada kerusakan matriks ekstraseluler tulang rawan sendi.

7.1.2 Gangguan biomekanik instabilitas menimbulkan radikal hidroksil yang menyebabkan stres oksidatif pada tulang rawan sendi, dimana kemudian terjadi lipid peroksidasi dan kematian sel kondrosit.

7.1.3 Radikal hidroksil mengaktifasi terbentuknya iNOS yang memproduksi NO<sup>•</sup> dan mengaktifasi ekspresi sitokin, yaitu IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$ . Kedua sitokin tersebut memicu produksi enzim proteolitik. NO<sup>•</sup> bersama enzim proteolitik secara simultan menyebabkan kerusakan proteoglikan dan kolagen, sehingga terjadi degenerasi tulang rawan yang mengakibatkan OA sekunder.

Dengan demikian berdasarkan kesimpulan diatas, maka hipotesis penelitian ini terbukti dan diterima.

Dari analisis hasil penelitian dan uraian pembahasan diatas dapat juga dibuat kesimpulan lain yaitu :

- 7.1.4 Terjadinya stres oksidatif lipid peroksidasi disebabkan radikal hidroksil yang diproduksi oleh kondrosit. Kondrosit memproduksi radikal hidroksil akibat proses hipoksi reperfusi, yang terjadi pada keadaan stres instabilitas pada tulang rawan sendi. Proses hipoksi reperfusi terjadi karena berhentinya aliran nutrisi dan oksigen pada saat tekanan berlebihan dan mengalir kembali pada saat tekanan menghilang. Meskipun tulang rawan tidak mengandung pembuluh darah, limfe, maupun jonjot saraf, proses hipoksi reperfusi terjadi akibat penurunan kadar ATP kondrosit.
- 7.1.5 Dalam patogenesis kerusakan proteoglikan tulang rawan sendi, terdapat interaksi sinergistik antara faktor stres oksidatif, iNOS, nitrik oksid, dan faktor lain baik di jalur enzimatik maupun non enzimatik. Hal tersebut mengingat bahwa jumlah kontribusi masing masing faktor lebih kecil dibandingkan dengan kontribusi gabungan faktor.
- 7.1.6 Di dalam penelitian *in vivo* radikal oksigen tidak menyebabkan kerusakan proteoglikan secara langsung pada instabilitas sendi, melainkan merusak proteoglikan secara tidak langsung melalui aktivasi iNOS dan sitokin; tidak demikian pada *in vitro*. Hal ini diduga karena adanya faktor lingkungan yang berbeda dan terjadinya interaksi antar faktor lingkungan, pada *in vivo*.

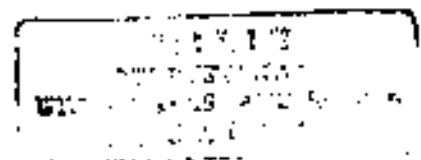


- 7.1.7 Ekspresi iNOS timbul baik intraseluler maupun ekstraseluler merupakan faktor penting dalam proses patogenesis kerusakan proteoglikan akibat gangguan biomekanik instabilitas, khususnya dalam jalur non enzimatik, oleh karena nitrik oksid mempunyai kontribusi besar dalam patogenesis kerusakan proteoglikan
- 7.1.8 Perluasan kerusakan tulang rawan sendi disebabkan terjadinya ekspresi iNOS ditepi sentra kerusakan dan terjadinya kematian kondrosit akibat apoptosis maupun nekrosis. Sinyal mekanoelektrokimia yang ditimbulkan oleh gangguan biomekanik instabilitas, menyebabkan kondrosit akan selalu mengekspresikan iNOS dan pembentukan NO<sup>•</sup>. Sinyal ini bersifat otokrin terhadap kematian sel kondrosit yang terjadi di tepi sentra kerusakan sehingga dengan demikian terjadi perluasan dari kerusakan tulang rawan sendi.
- 7.1.9 Pada hasil penelitian menunjukkan ekspresi GAG tampak intraseluler dan ekstraseluler pada gangguan biomekanik instabilitas sedang, menunjukkan adanya proses sintesis GAG dan kerusakan proteoglikan yang terjadi bersamaan. Hal ini mendukung pernyataan bahwa pada tahap awal degenerasi, yaitu tahap kompensasi tulang rawan sendi, terjadi proses sintesis dan kerusakan GAG yang seimbang, dimana pada tahap selanjutnya kerusakan lebih besar dari sintesis
- 7.1.10 Penelitian ini menunjang teori yang dianut sekarang bahwa patogenesis kerusakan tulang rawan sendi yang mengarah ke degenerasi tulang rawan

adalah multifaktor. Setiap faktor yang terlibat di dalam patogenesis tersebut saling berinteraksi, saling mempengaruhi dan memberikan sinyal transduksi kepada kondrosit untuk mengatur metabolisme tulang rawan sendi.

## 7.2 Saran

- 7.2.1 OA sekunder selain akibat faktor gangguan biomekanik instabilitas dapat disebabkan juga oleh faktor lain. Oleh sebab itu perlu dilakukan penelitian lain, berdasarkan hasil temuan penelitian ini, apakah stres oksidatif oleh karena ROS juga berperan pada OA yang disebabkan oleh faktor gangguan biomekanik selain instabilitas.
- 7.2.2 Instabilitas sendi menyebabkan tekanan pada tulang rawan meningkat dan mempunyai pengaruh terhadap kerusakan tulang rawan. Oleh sebab itu perlu dikembangkan penatalaksanaan penderita dengan gangguan instabilitas sendi khususnya sendi penyanggah berat, untuk meningkatkan stabilitas sendi tanpa menambah beban tekanan pada tulang rawan. Maka berdasarkan penelitian ini, untuk menunjang stabilitas sendi dengan cara latihan meningkatkan kekuatan otot memakai beban tidak dianjurkan.
- 7.2.3 Mengingat peran stres oksidatif akibat ROS dalam proses kerusakan tulang rawan, maka pada pengelolaan penderita dengan instabilitas sendi perlu diberikan antioksidan ROS, termasuk diantaranya *α-tocopherol* (vitamin E) yang merupakan antioksidan peroksidasi lemak, sebagai terapi adjuvan selain memperbaiki instabilitasnya.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abramson SB, Attur M, Amin AR, Clancey R (2001). Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation osteoarthritis. *Curr. Rheumatol Rep* Dec;3(6): 535-41
- Abramson SB, (2001a). The pathogenesis of osteoarthritis: potential targets for therapy. *Arthritis Res*, 3(Supp A):L020.
- Allen RE., Outwaite J., Morris CJ., Blake, DR., (1987) Xanthine oxidoreductase is present in human synovium. *Ann. Rheum. Dis*, 46; 843-45.
- Amin AR, Abramson SB. (1998). The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 10:263-268.
- Andrew R (1999). Bone, Joints and Soft Tissue Tumors, in *Robbins Pathologic Basis of Diseases*, eds. Cotran, Kumar, Collins, 6<sup>th</sup> ed. Saunders: p. 1215-1268.
- Baker MS., Feigan J, Lowther DA. (1989) The mechanism of chondrocyte hydrogen peroxide damage. Depletion of intracellular ATP due to suppresion of glycolysis caused by oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase. *J. Rheumatol*. 16:7-14.
- Baker MS. (1994). Free radicals and connective tissue damage, *in* Free Radical Damage and Its Control. Rice-Evans CA, Burdon RH (eds): Amsterdam, Elsevier. p 301.
- Blake DR, Unsworth J, Outwaite JM, Morris CJ, Merry P, Kidd BL, Ballard R, Gray L, Lunec J. (1989). Hypoxic-reperfusion injury in the inflamed human joint. *Lancet* Feb. 11:290-293.
- Brandt KD, Mankin HJ. (1993). Pathogenesis of Osteoarthritis, in *Textbook of Rheumatology* 4<sup>th</sup>. ed. Eds. Kelly, Harris, Rudy, Sledge; Saunders. p.1355-1373
- Brandt KD, Lohmander LS, Doherty M. (1998). Pathogenesis of Osteoarthritis, **Introduction: the concept of osteoarthritis as failure of the diarthrodial joint**, in *Osteoarthritis*, eds. Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS. Oxford Medical Publications: p. 70-74.
- Brandt KD. (1999). Animal Models of Osteoarthritis, in *Osteoarthritis Clinical and Experimental Aspects*. Eds. J-Y Reginster, J-P Pelletier, J-M Pelletier, Y Henrotin. Springer. p. 81-100.

- Burkhardt H, Schwingel M, Menninger H, Macartney HW, Tschesche H. (1986). Oxygen Radicals as effectors of Cartilage destruction. Direct degradative effect on Matrix components and indirect action via activation of latent Collagenase from polymorphonuclear leucocytes. *Journal article. Arthritis Rheum. Mar; 29(3): 379-87.*
- Caterson B, Hughes CE, Roughley P, Mort JS (1995). Anabolic and catabolic markers of proteoglycan metabolism in osteoarthritis. *Acta Orthop Scand Suppl; 266:121-4.*
- Cawston TE, (1998), Mechanism of Joint Destruction and Therapeutic Approaches *Medicine International; 12(42): 4-9.*
- Cernance J, Guilak F, Weinberg JB, Pisetsky DS, Fermor B ( 2002) Influence of hypoxia and reoxygenation on cytokine-induced production of proinflammatory mediators in articular cartilage. *Arthritis Rheum. Apr;46(4): 968-75.*
- Cicuttiti F., Spector T.D. (1998). Osteoarthritis , *Medicine International. 12(42): 68-71.*
- Comporti M. (1993). Lipid Peroxidation. An Overview in Free Radicals: From Basic Science to Medicine. Eds: G.Polli, E.Albano, M.U. Dianzani. MCBU: 65-78.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T (1999) Cell injury and cell death in Robbins *Pathologic Basis of Disease 6th. Ed. Saunders. p. 1-29.*
- Dean RT, Roberts CR, Forti LG (1984). Oxygen-centred free radicals can efficiently degrade the polypeptide of proteoglycans in whole cartilage. *Biosci Rep Dec 4:12, 1017-26.*
- D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Colwell CW, Lotz MK (2001). Human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury. *Osteoarthritis and Cartilage; 9 (8): 712-719*
- Dewire P, Einhorn TA (2001). The Joint as an Organ. In *Osteoarthritis Diagnosis and Medical/ Surgical Treatment, 3rd edition.* Editors Moskowitz, Howell, Altman, Buckwalter, Goldberg. p. 49 – 68.
- Favier AE (1995). How to demonstrate the occurrence of an oxidative stress in human, in *Analysis of Free Radicals in Biological Systems.* Eds: Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre J-J. Birkhäuser Verlag. p 99-111.



- Felson DT (1995). The Epidemiology of Osteoarthritis: Prevalence and Risk Factors, in *Osteoarthritic Disorders*. Eds. Klaus E. Kuettner, Victor M Goldberg. American Academy of Orthopaedic Surgeons.p13-24.
- Gabrowski PS, Wright PK, Van't Hof RJ, Helfrich MH, Oshima H, Ralston SH (1997). Immunolocalization nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br J Rheumatol*; 36(6):651-5.
- Ghosh P, Numata Y, Smith S, Read R, Armstrong S, Johnson K. (1993). The Metabolic Response of Articular Cartilage to Abnormal Mechanical Loading Induced by Medial Or Lateral Meniscectomy, in joint destruction. In *Joint Destruction in Arthritis and Osteoarthritis*. Eds W.B. van den Berg, P.M. van der Kraan, P.L.M. van Lent :p 89 - 93.
- Granger,D.N.,Hollworth,ME., Parks, DA. (1986). Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physio. Scand.* 548:47-63.
- Grimshaw MJ., Mason RM. (2001). Modulation of bovine articular chondrocyte gene expression *in vitro* by oxygen tension. *Osteoarthritis and Cartilage* , 9 (4): 357-364.
- Grodzinsky, AJ., Kim Y-J., Buschmann. MD., Garcia AM., Quinn, TM., Hunziker EB., (1998). Response of the chondrocyte to mechanical stimuli, in *Osteoarthritis*. Eds. Brandt KD., Doberty, M. and Lohmander. Oxford Medical Publication. 123-36.
- Gubjonsson, B., Zak, A., Niklasson, F., and Hallgren, R. (1991) Hypoxanthine, xanthine and urate in synovial fluid from patients with inflammatory arthritis. *AnnRheum. Dis.* 50:669-672.
- Guilak F,Jones WR, Ting-Beall HP, Lee GM. (1999). The deformation behaviour and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*. 7(3): 59-70.
- Halliwell B., Gutteridge JMC. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine.*, 3rd edition, Oxford Science Publication.p 407-10
- Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coutis RD, Lotz M. (1998). Chondrocyte Apoptosis and Nitric Oxide production during experimental induced Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 41(7):1266-74.
- Henrotin Y, Dupont GD, Franchimont P, Emerit I. (1992). Active Oxygen species, articular inflammation and cartilage damage,in *Free Radicals and Aging*,eds. Ingrid Emerit, Britton Chance.: p.308-322.



- Heseroin Y, Deby-Dupont G, Deby C, De Brayn M, Lamy M, Franchimont P. (1993). Production of active oxygen species by isolated human chondrocytes. Journal article. *Br. J.Rheumatol.* 32(7) . 562-7.
- Hidayat M, Sarwono I, Endharti AT. (1997). Profil malondialdehid, superoksida dismutase dan perubahan histopatologi tulang rawan sendi, pada transeksi ACL dan menisektomi anjing percobaan. Unpublished.
- Hing WA., Sherwin AF., Ross JM., Poole AC. (2002). The influence of the pericellular environment on the chondrocyte response to osmotic challenge. *Osteoarthritis and Cartilage*, 10(4): 297-307
- Hough AJ. Jr. (2001) Pathology of Osteoarthritis, in *Osteoarthritis Diagnosis and Medical/Surgical Management 3rd ed* Editors: Moskowitz, Howell, Altman, Buckwalter, Goldberg. Saunders, p.69-99.
- Iwasaki Y., Saegusa Y., Matsubara T., Hirohata K. (1990). Increased superoxide anion release from chondrocytes in response to interleukin-1 and interferons. Journal article *Nippon Seikegeka Gakai Zasshi*, 64 (10) . 976-82
- Kalim H, Hidayat M, Loekito RM, Hanafi M, Tjahjono CT, Iskandar A, Kusworini H. (1999a). The problem of rheumatic diseases in Malang community the magnitude of rheumatic complaints in *Proceeding Reumatologi menyongsong milenium ke-3*. Eds: Achmad H, Widodo MA, Arsana PM
- Kalim H, Hidayat M, Loekito RM, Hanafi M, Tjahjono CT, Iskandar A, Kusworini H (1999b). The problem of rheumatic diseases in Malang community Risk factor of knee osteoarthritis, in *Proceeding Reumatologi menyongsong milenium ke-3*. Eds: Achmad H, Widodo MA, Arsana PM.
- Kane AB. (1996). Mechanism of Cell and Tissue Injury, in *Cellular and Molecular Pathogenesis*, ed Alphonse E. Sica. Lipp. Raven.p 1-22.
- Kvam BJ, Frangos E, Degrazi A, Kvam C, Matulova M, Pollesello P, Zanetti F, Vitor F (1995). Oxygen-Derived Free Radical (ODFR) Action on Hyaluronan (HA), on Two HA Ester Derivates, and on the Metabolism of Articular Chondrocytes. *Experimental Cell Research* 218.79-86.
- Lane JM, Brighton CT, Menkowitz BJ (1977). Anaerobic and Aerobic Metabolism in Articular Cartilage. *J. Rheumatology* 4. 334-342.
- Lee MS, Trindade MC, Ikenoue T, Schurman DJ, Goodman SB, Smi RL (2002). Effects of shear stress on nitric oxide and matrix protein gene expression in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *J Orthop Res*; 20(3):556-61

- Little CH (1996). **Topographical differences in articular cartilage proteoglycan metabolism in normal joints and in experimental osteoarthritis in sheep. A thesis in fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy.** March; Department of Surgery, University of Sidney
- Little CH, Smith S, Ghosh P, Bellenger C (1997). **Histomorphological and Immunohistochemical Evaluation in Joint Changes in a Model of Osteoarthritis Induced by Lateral Meniscectomy.** *J Rheumatol* ; 24:2199-209
- Mankin H.J, Mow VC, Buckwalter JA, Iannotti JP, Ratcliffe A. (1994). **Form and Function of Articular Cartilage, in Orthopaedic Basic Science.** Ed.Sheldon R. Simon, American Academy of Orthopaedic Surgeon.p. 1-45.
- Mankin HJ, Mow VC, Buckwalter JA, Iannotti JP, Ratcliffe A (2000a). **Articular Cartilage Structure, Composition, and Function, in Orthopaedic Basic Science.** Eds. Buckwalter JA, Einhorn TA, Simon SR. American Academy of Orthopaedic Surgeons. 2nd ed: p 443-70.
- Mankin HJ, Mow VC, Buckwalter JA (2000b). **Articular Cartilage Repair and Osteoarthritis, in Orthopaedic Basic Science.** Eds. Buckwalter JA, Einhorn TA, Simon SR. American Academy of Orthopaedic Surgeons 2nd ed: p 472-88.
- McCord, J.M. (1985). **Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury.** *New Engl. J. Med.* 312:159-161.
- Morales TL, (1995). **The Role of signaling Factors in Articular Cartilage Homeostasis and Osteoarthritis, in Osteoarthritic Disorders.** American Academy of Orthopaedic Surgeons :p. 261-70.
- Mow VC, Setton LA, Guilak F, Ratcliffe A. (1995). **Mechanical Factors in Articular Cartilage and Their Role in Osteoarthritis, in Osteoarthritic Disorders.** American Academy of Orthopaedic Surgeons :p. 147-71.
- Mow VC, Setton LA. (1998). **Mechanical properties of normal osteoarthritic articular cartilage, in Osteoarthritis.** Eds: Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS. Oxford Medical Publications:p. 108-122.
- Mow VC, Wang CC, Hung CT (1999). **The extracellular matrix, interstitial fluid and ions as a mechanical signal transducer in articular cartilage.** *Osteoarthritis and Cartilage*, 7(1): 41-58

- Mow VC, Flatow EL, Ateshian GA (2000). **Biomechanics**, in *Orthopaedic Basic Science, Biology and Biomechanics of the Muskuloskeletal system*. 2nd ed. AAOS. p.133-180.
- Nishida K, Doi T, Matsuo M, Ishiwari Y, Tsujigiwa H, Yoshida A, Shibahara M, Inoue H (2001). Involvement of nitric oxide in chondrocyte cell death in chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis and Cartilage*, 9(3):232-37.
- Nuki G. (1999) **Role of Mechanical Factors in the Aetiology, Pathogenesis and Progression of Osteoarthritis**, in *Osteoarthritis Clinical and Experimental Aspects*. Eds. Reginster J-Y, Pelletier JP, Pelletier JM, Henrotin Y; Springer: p. 101-114.
- Orrenius S. (1993). **Mechanism of Oxidative Cell damage**, in *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*, eds: G. Poli, E. Albano, M.U. Dianzani, Birkhauser Verlag.p 47-64.
- Pelletier JP, Pelletier JM, Howell DS. (1997). **Etiopathogenesis of Osteoarthritis**, in *Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*. Ed. Koopman WJ. Williams & Wilkins:p 1969-84.
- Pelletier JM. (1998). **Pathophysiology of Osteoarthritis**. *Osteoarthritis and cartilage*, 5 (6) : 374-377.
- Pelletier JP, Pelletier JM, Howell DS. (2001). **Etiopathogenesis of Osteoarthritis**, in *Arthritis and Allied Conditions. A textbook of Rheumatology*. 14th ed. Ed. Koopman WJ. Lippincot William Wilkins.p. 2195-2215.
- Pierre J-L (1995). **Chemistry of dioxygen and its activated species**, in *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. Eds: AE Favier, J Cadet, B Kalyanaraman, M Fontecave, J-L Pierre. Birkhauser Verlag: 1-10.
- Poole AR. (1995). **Imbalance of Anabolism and Catabolism of Cartilage Matrix Component in OA**, in *Osteoarthritic Disorders*, American Academy of Orthopaedic Surgeons: p. 247-60.
- Poole AR, Howell DS. (2001). **Etiopathogenesis of Osteoarthritis**, in *Osteoarthritis Diagnosis and Medical/Surgical Management*, 3rd ed. Editors Moskowitz, Howell, Altman, Buckwalter, Goldberg. Saunders. p. 29-47.
- Roberts CR, Roughley PJ, Mort JS (1989). **Degradation of human proteoglycan aggregate induced by hydrogen peroxide. Protein fragmentation, amino acid modification and hyaluronic cleavage**. *Biochem J*. 259(3): 805-11

- Roughley PJ, Nguyen Q, Mort JS (1992). **The Role of Proteinase and Oxygen Radicals in the Degradation of Human Articular Cartilage**, in *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. Eds. Klaus Kuettner, Rudolf Scheyerbach, Jaques G.Peyron, Vincent C.Hascall : p. 305-17.
- Schiller J, Arnhold J, Schwinn J, Sprinz H, Brede O, Arnold K, Sies H. (1998). **Reactivity of Cartilage and Selected Carbohydrates with Hydroxyl Radicals**. *Free Radical Research*. 8(2): 12-16
- Setton LA, Elliot DM and Mow VC, (1999). **Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis : human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration**. *Osteoarthritis and Cartilage* 7(1):2-14.
- Shingu M, Isayama T, Yasutake C, Naono T, Nobunaga M, Tomari K, Horie K, Goto Y. (1994). **Role of Oxygen radicals and IL-6 in IL-1 dependent Cartilage Matrix Degradation**. *Inflammation* 28(6) : 613-623.
- Shoemaker SC, Markolf KL (1986). **The role of the meniscus in the anterior-posterior stability of the loaded anterior cruciate deficient knee: Effects of partial versus total excision**. *J Bone Joint Surg* ; 68A:71-79.
- Smith MM., Ghosh P. (2001). **Experimental Models of Osteoarthritis**, in *Osteoarthritis Diagnosis and Medical/Surgical Management*, 3rd ed. Eds. Moskowitz, Howell, Altman, Buckwalter,Goldberg. Saunders. p. 171-199.
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. (1992). **Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms**. *Science*, 258:1898-1902.
- Stoian I, Oros A, Moldoveanu E. (1996). **Apoptosis and Free Radicals**. *Biochemical and Molecular Medicine*, 59: 93-97.
- Streuli, C. (1999) **Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation**. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(5):634-640.
- Studer R, Jaffurs D, Stefanovic-Racic M, Robbins PD, Evans CH (1999). **Nitric Oxide in osteoarthritis**. *Osteoarthritis and Cartilage*; 7(4):377-9
- Tanaka S, Hamanishi C, Kikuchi H, Fukuda K (1998). **Factors Related to Degradation of Articular Cartilage in Osteoarthritis: A Review**. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 27 ( 6): 392-399.



- Thonar EJMA, Masuda K, Manicourt DH, Keuttner KE (1999). Structure and Function of Normal Human Adult Cartilage, in *Osteoarthritis Clinical and Experimental Aspect*. Editors: Reginster JY, Pelletier JP, Pelletier JM, Henrotin Y. Springer. p 1-20.
- Tiku ML, Liesch JB, Robertson FM (1990). Production of Hydrogen Peroxide by Rabbit Articular Chondrocytes *J. Rheum.* 115 ( 2): 696.
- Tiku ML, Yan YP, Chen KY. (1998). Hydroxyl Radical Formation in Chondrocytes and Cartilage as Detected by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy Using Spin Trapping Reagents. *Free Radical Research*, Sep, 29(3):177-87.
- Tiku ML, Gupta S, Desmukh DR.(1999). Aggrecan degradation in chondrocytes is mediated by reactive oxygen species and protected by antioxidants. *Free Radic. Res.* May; 30(5):395-405.
- Tiku ML, Shah R, Allison GT (2000). Evidence Linking Chondrocyte Lipid Peroxidation to Cartilage Matrix Protein. Possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis. *J. Biological Chemistry*, 275(26): 20069-76.
- Woo SL-Y. (1995). Acute Injury to Ligament and Meniscus as Inducers of Osteoarthritis, in *Osteoarthritic Disorders*. American Academy of orthopaedic Surgeons :p 185-96.
- Woo SL-Y, , James A Fenwick, Akihiro Kananori, Jorge E. Gil, Serena S. Chan, Tracy M. Vargin (2001). *Biomechanical Considerations of Joint Function in Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical Management*. 3rd ed. Moskowitz, Howell, Altman, Buckwalter,Goldberg, editors, Saunders, p.145-169
- Zhu J. (1993 ). Oxygen free radicals mediate an inhibition of DNA and matrix proteoglycan, collagen synthesis in cultured human embryo chondrocytes. *Chung Hua Wai Ko Tsa Chih*, 3(9): 561-3.

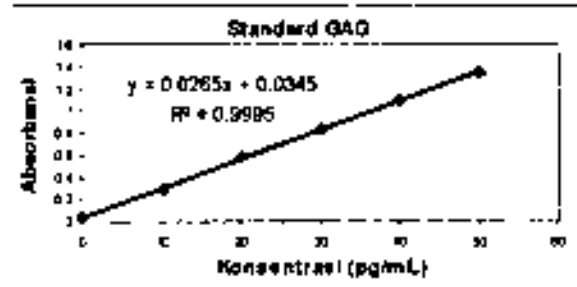


**DAFTAR LAMPIRAN**



## Lampiran I Data mentah GAG

KURVA BAKU GAG	
ABS	Konsentrasi (pg/mL)
0.032	0
0.287	10
0.5785	20
0.841	30
1.096	40
1.3505	50



NILAI ABSORBANSI GAG		
K	M	Am
0.511	1.107	0.988
0.446	0.756	1.151
0.506	1.422	1.540
0.554	0.824	0.983
0.640	0.931	1.175
0.570	0.908	1.065
0.537923926	0.991	1.15023611

Contoh penghitungan Konsentrasi :

persamaan  $Y=0,0265 X+0,0345$

Y = nilai absorbansi

X = nilai konsentrasi

maka untuk mencari nilai konsentrasi :

$X = (Y-0,0345):0,0265$

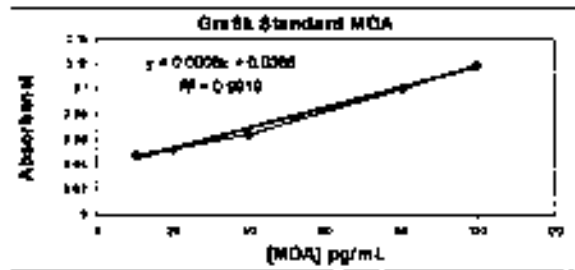
$X(1) = (0,511-0,0345):0,0265$

$X(1) = 17,98113$

NILAI KONSENTRASI GAG (pg/mL)		
K	M	Am
17.98113	40.47170	35.98113
13.52830	27.22642	42.13208
17.79245	52.35849	56.81132
19.61216	29.78616	35.77358
22.84906	33.82285	43.03774
20.22013	32.96226	38.88165
18.99720473	56.1046471	42.1032495

## Lampiran 2 Data mentah MDA

KURVA BAKU MDA	
ABSORBANSI	KONSENTRASI (pg/mL)
0.048	10
0.053	20
0.065	40
0.101	80
0.12	100



NILAI ABSORBANSI MDA		
K	M	Am
0.061	0.101	0.169
0.098	0.139	0.108
0.059	0.115	0.124
0.052	0.091	0.139
0.043	0.099	0.111
0.059	0.119	0.119
0.06704475	0.110569444	0.128269

Contoh penghitungan Konsentrasi :

$$\text{persamaan } Y = 0,0008X + 0,0368$$

Y = nilai absorbansi

X = nilai konsentrasi

maka untuk mencari nilai konsentrasi :

$$X = (Y - 0,0368) / 0,0008$$

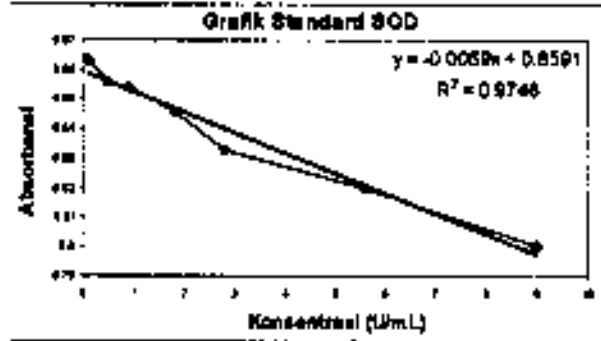
$$XK1 = (0,061 - 0,0368) / 0,0008$$

$$XK1 = 29,833$$

NILAI KONSENTRASI MDA (pg/mL)		
K	M	Am
29.833	80.146	165.250
64.000	127.750	89.000
28.135	97.750	108.933
19.347	67.125	127.750
7.750	77.750	92.333
77.750	102.750	102.750
37.80594136	92.21180556	114.333648

Lampiran 3 Data mentah SOD

KURVA BAKU SOD	
ABS	Konsentrasi (U/mL)
0.863	0.1
0.856	0.5
0.854	0.9
0.846	1.8
0.833	3.8
0.82	5.6
0.8	9



NILAI ABSORBANSI SOD		
A <sub>m</sub>	M	K
0.718	0.699	0.689
0.750	0.713	0.687
0.730	0.714	0.707
0.738	0.710	0.737
0.739	0.714	0.696
0.784	0.714	0.674

Contoh penghitungan Konsentrasi :  
 persamaan  $Y = -0.0069 X + 0.8591$   
 $Y$  = nilai absorbansi  
 $X$  = nilai konsentrasi  
 maka untuk mencari nilai konsentrasi :  
 $X = (Y - 0.8591) : (-0.0069)$   
 $XK1 = (0.689 - 0.8591) : (-0.0069)$   
 $XK1 = 24.663$

0.743125      0.710726832      0.701747

NILAI KONSENTRASI SOD (U/mL)		
A <sub>m</sub>	M	K
20.449	21.179	24.663
15.812	21.174	24.942
18.783	21.029	21.995
17.514	21.609	14.797
17.406	21.001	23.605
10.884	21.029	26.826

16.80797101      21.5033548      22.8048

## Lampiran 4 Hasil Analisis Diskriptif

## Report

GROUP		GAG	MDA	SOD	INOS SEL	INOS MATRIX
AM	Mean	42.1032500	114.33567	16.80600	10.9133	3.0817
	Std. Deviation	7.8116877	28.50148	3.28936	1.1791	.4338
	N	6	6	6	6	6
K	Mean	18.9972050	37.80583	22.80467	1.3633	.1367
	Std. Deviation	2.4991057	27.13838	4.23347	.8827	4.502E-02
	N	6	6	6	6	6
M	Mean	38.1048467	92.21183	21.50350	8.0050	2.2517
	Std. Deviation	9.1333012	21.85756	.85203	.8588	.7157
	N	6	6	6	6	6
Total	Mean	32.4017008	81.45111	20.37208	6.7606	1.8233
	Std. Deviation	12.0745239	41.12068	3.98115	4.2154	1.3544
	N	18	18	18	18	18



**Lampiran 5 Hasil Uji Normalitas Data****Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
GAG	.121	18	.200(*)	.951	18	.453
HDA	.131	18	.200(*)	.986	18	.677
SOD	.174	18	.154	.959	18	.553
INOS SEL	.203	18	.047	.888	18	.038
INOS MATRIX	.217	18	.025	.823	18	.010(**)
* This is a lower bound of the true significance.						
** This is an upper bound of the true significance.						
a. Lilliefors Significance Correction						



**Lampiran 6 Hasil Analisis Ragam (ANOVA)**

**Lampiran 6.1 Variabel GAG**

**Lampiran 6.2 Variabel MDA**

**Lampiran 6.3 Variabel SOD**

**Lampiran 6.4 Variabel iNOS SEL**

**Lampiran 6.5 Variabel iNOS MATRIX**



## Lampiran 6.1 Variabel GAG

## ANOVA GAG

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: GAG

## Tukey HSD

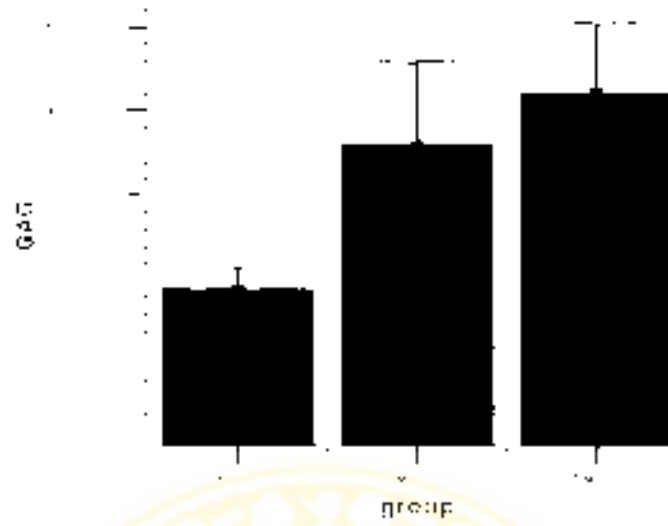
(I) Group: 1=K, 2=M, 3=AM	(J) Group: 1=K, 2=M, 3=AM	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	17.1074417(*)	4.0917965	.002	-27.7358038	-6.4790796
	3	23.1080450(*)	4.0917965	.000	-33.7344071	12.4776829
2	1	17.1074417(*)	4.0917965	.002	6.4790796	27.7358038
	3	-5.9888033	4.0917965	.334	-16.6269654	4.6297588
3	1	23.1080450(*)	4.0917965	.000	12.4776829	33.7344071
	2	5.9888033	4.0917965	.334	-4.6297588	16.6269654

\* The mean difference is significant at the .05 level.

## Tukey HSD GAG

Group: 1=K, 2=M, 3=AM	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1	6	18.9972050	
2	6		36.1046467
3	6		42.1032500
Sig.		1.000	.334

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.



## Lampiran 6.2 Variabel MDA

## ANOVA MDA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	18612.584	2	9306.292	13.776	.000
Within Groups	10132.886	15	675.526		
Total	28745.470	17			

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: MDA

## Tukey HSD

(I) Group: 1=K, 2=M, 3=AM	(J) Group: 1=K, 2=M, 3=AM	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	54.40800(*)	15.00584	.007	-93.38338	-15.42862
	3	76.52983(*)	15.00584	.000	-115.50721	-37.55245
2	1	54.40800(*)	15.00584	.007	15.42862	93.38338
	3	-22.12383	15.00584	.330	-61.10121	16.85355
3	1	76.52983(*)	15.00584	.000	37.55245	115.50721
	2	22.12383	15.00584	.330	-16.85355	61.10121

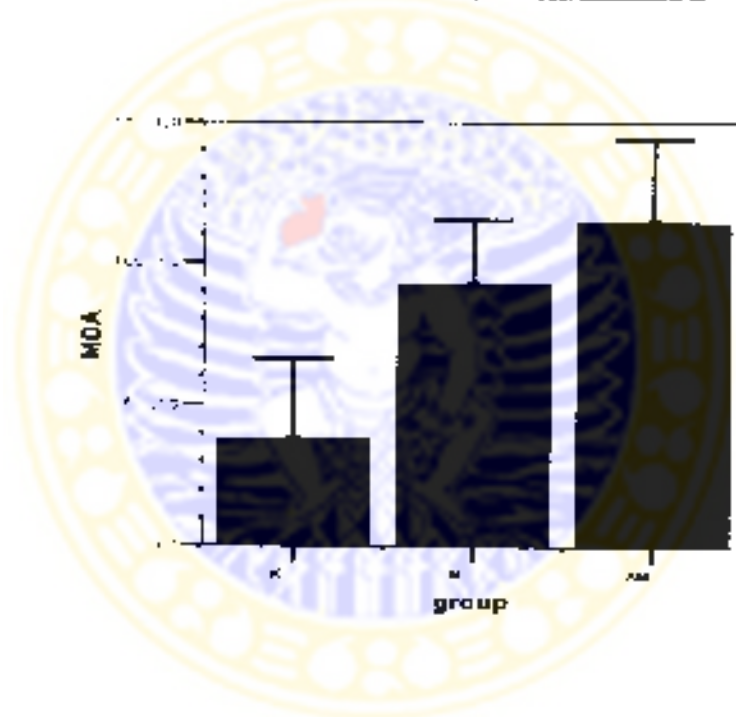
\* The mean difference is significant at the .05 level.



Tukey HSD MDA

Group: 1=K, 2=M, 3=AM	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1	6	37.80583	
2	6		92.21183
3	6		114.33567
Sig.		1.000	.330

Means for groups in homogeneous subsets are displayed  
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.



## Lampiran 6.3 Variabel SOD

## ANOVA SOD

	Sum Squares	of df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	119.402	2	59.701	6.078	.012
Within Groups	147.341	15	9.823		
Total	266.742	17			

## Multiple Comparisons

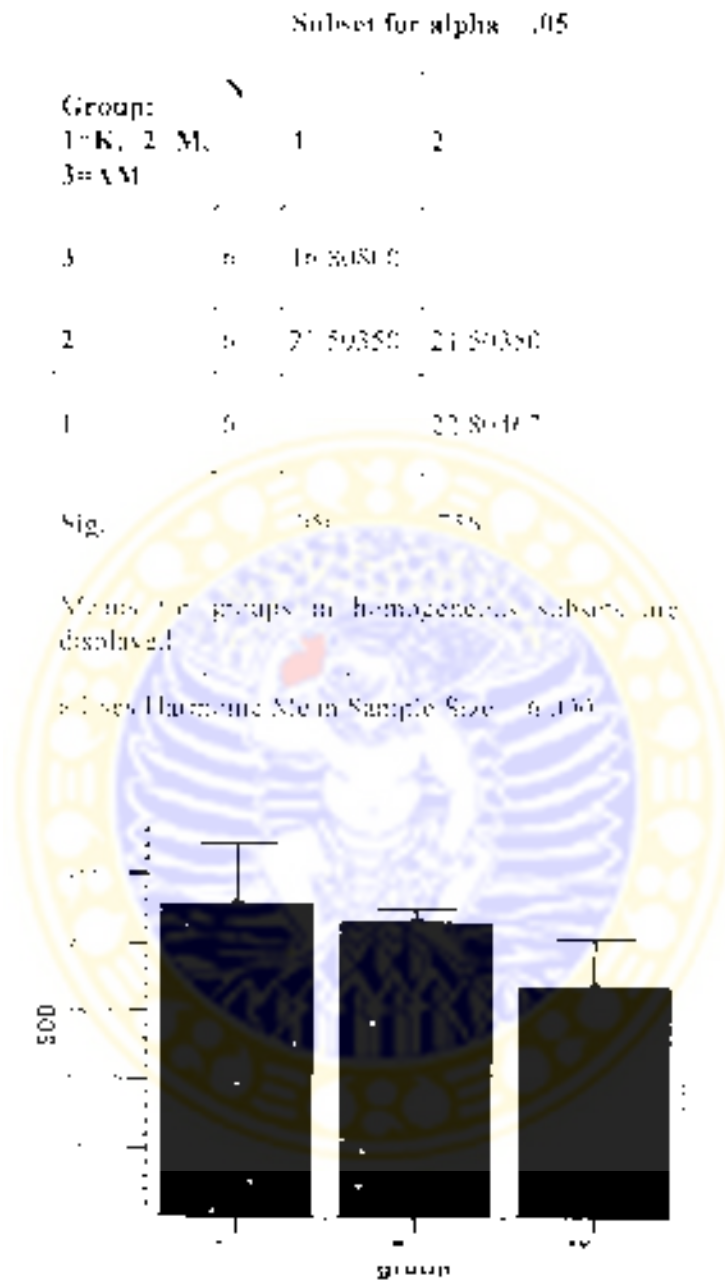
Dependent Variable: SOD

## Tukey HSD

(I) Group: 1=K, 2=M, 3=AM	(J) Group: 1=K, 2=M, 3=AM	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	1.30117	1.80949	.756	-3.39894	6.00127
	3	5.99667(*)	1.80949	.012	1.29656	10.69677
2	1	-1.30117	1.80949	.756	-6.00127	3.39894
	3	4.69550	1.80949	.050	-4.60329E-03	9.39560
3	1	-5.99667(*)	1.80949	.012	-10.69677	-1.29656
	2	-4.69550	1.80949	.050	-9.39560	4.6033E-03

\* The mean difference is significant at the .05 level.

Table 1.5.12 SOD



## Lampiran 6.4 Variabel iNOS SEL

## ANOVA iNOS SEL

	Sum Squares	of Df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	287.545	2	143.773	148.364	.000
<b>Within Groups</b>	14.536	15	.969		
<b>Total</b>	302.081	17			

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: iNOS SEL

## Tukey HSD

(I) Group: 1=K, 2=M, 3=AM	(J) Group: 1=K, 2=M, 3=AM	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-6.6417(*)	.5683	.000	-8.1179	-5.1654
	3	-9.5500(*)	.5683	.000	-11.0263	-8.0737
2	1	6.6417(*)	.5683	.000	5.1654	8.1179
	3	-2.9083(*)	.5683	.000	-4.3846	-1.4321
3	1	9.5500(*)	.5683	.000	8.0737	11.0263
	2	2.9083(*)	.5683	.000	1.4321	4.3846

\* The mean difference is significant at the .05 level.

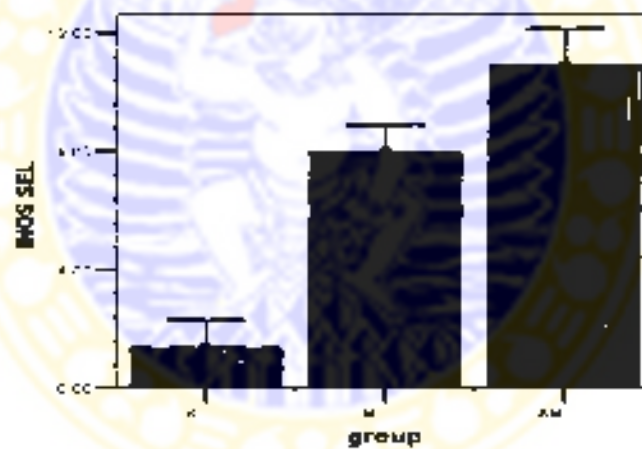
## iNOS SEL

## Tukey HSD

		Subset for alpha = ,05		
	N	1	2	3
Group: 1=K, 2=M, 3=AM				
1	6	1.3633		
2	6		8.0050	
3	6			10.9133
Sig.		.000	.000	.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000





## Lampiran 6.5 Variabel iNOS MATRIX

## ANOVA

## iNOS MATRIX

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	27.670	2	13.835	59.086	.000
Within Groups	3.512	15	.234		
Total	31.183	17			

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: iNOS MATRIX

## Tukey HSD

(I) Group: 1=K, 2=M, 3=AM	(J) Group: 1=K, 2=M, 3=AM	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-2.1150(*)	.2794	.000	-2.8407	-1.3893
	3	-2.9450(*)	.2794	.000	-3.6707	-2.2193
2	1	2.1150(*)	.2794	.000	1.3893	2.8407
	3	-.8300(*)	.2794	.024	-1.5557	-.1043
3	1	2.9450(*)	.2794	.000	2.2193	3.6707
	2	.8300(*)	.2794	.024	.1043	1.5557

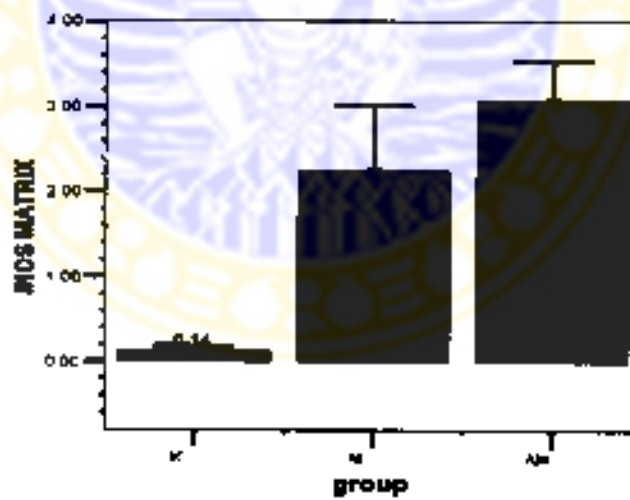
\* The mean difference is significant at the .05 level.

**iNOS MATRIX****Tukey HSD**

		Subset for alpha = .05		
Group: 1=K, 2=M, 3=AM		1	2	3
1	6	.1367		
2	6		2.2517	
3	6			3.0817
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.



## Lampiran 7 Hasil Analisis Korelasi

## Correlations

		GAG	MDA	SOD	iNOS SEL	iNOS MATRIX
GAG	Pearson Correlation	1.000	.585(*)	-.439	.870(**)	.813(**)
	Sig. (2-tailed)		.011	.068	.000	.000
	N	18	18	18	18	18
MDA	Pearson Correlation	.585(*)	1.000	-.254	.779(**)	.736(**)
	Sig. (2-tailed)	.011		.309	.000	.001
	N	18	18	18	18	18
SOD	Pearson Correlation	-.439	-.254	1.000	-.565(*)	-.558(*)
	Sig. (2-tailed)	.068	.309		.015	.016
	N	18	18	18	18	18
iNOS SEL	Pearson Correlation	.870(**)	.779(**)	-.565(*)	1.000	.899(**)
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.015		.000
	N	18	18	18	18	18
iNOS MATRIX	Pearson Correlation	.813(**)	.736(**)	-.558(*)	.899(**)	1.000
	Sig. (2-tailed)	.000	.001	.016	.000	
	N	18	18	18	18	18
** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).						
* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).						

## Correlations

		Group: 1=K, 2=M, 3=AM	
Spearman's rho	Group: 1=K, 2=M, 3=AM	Correlation Coefficient	1.000
		Sig. (2-tailed)	
		N	18
	GAG	Correlation Coefficient	.839(**)
		Sig. (2-tailed)	.000
		N	18
	MDA	Correlation Coefficient	.808(**)
		Sig. (2-tailed)	.000
		N	18
	SOD	Correlation Coefficient	-.722(**)
		Sig. (2-tailed)	.001
		N	18
	iNOS SEL	Correlation Coefficient	.945(**)
		Sig. (2-tailed)	.000
		N	18
	iNOS MATRIX	Correlation Coefficient	.905(**)
		Sig. (2-tailed)	.000
		N	18
** Correlation is significant at the .01 level (2-tailed).			
* Correlation is significant at the .05 level (2-tailed).			

**Lampiran 8 Hasil Analisis Model Struktural**

**Lampiran 8.1 MODEL LENGKAP**

**Lampiran 8.2 MODEL INDIRECT**

**Lampiran 8.3 MODEL DIRECT INOS KE OKSIDAN**

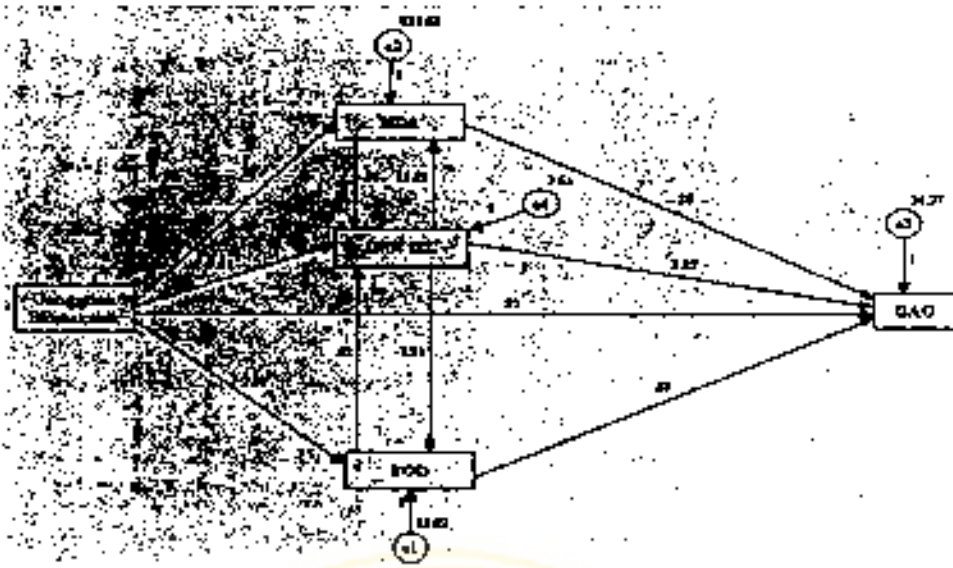
**Lampiran 8.4 MODEL DIRECT OKSIDAN KE INOS**

**Lampiran 8.5 MODEL INDIRECT INOS KE OKSIDAN**

**Lampiran 8.6 MODEL INDIRECT OKSIDAN KE INOS**





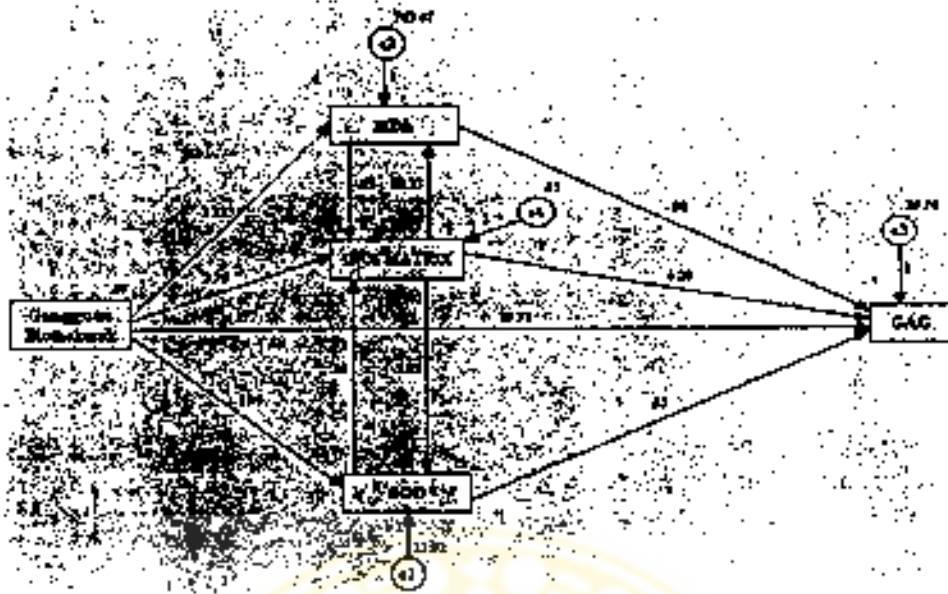


**Model Ia**

(a) INOS SEL

Regression Weights

			Estimate	S.E.	C.P.	F	Label
MDA	<--	TREATMEN	37.069	75.205	0.496	7.607	par-1
INCS_SEL	<--	TREATMEN	9.617	2.252	3.823	7.007	par-2
SOC	<--	TREATMEN	0.901	10.009	0.260	0.751	par-4
SAG	<--	INCS_SEL	3.971	0.971	3.673	0.001	par-3
SAG	<--	SOC	0.551	0.688	0.777	0.379	par-5
SAG	<--	MDA	-0.039	0.056	-0.765	0.387	par-6
SAG	<--	TREATMEN	1.914	3.660	0.180	0.270	par-9
INCS_SEL	<--	SOC	0.501	0.324	0.596	0.417	par-7
YDD	<--	INCS_SEL	-0.713	0.386	-0.582	0.567	par-8
MDA	<--	INCS_SEL	15.919	15.164	1.011	0.317	par-10
INCS_SEL	<--	MDA	-0.059	0.046	-0.284	0.147	par-11

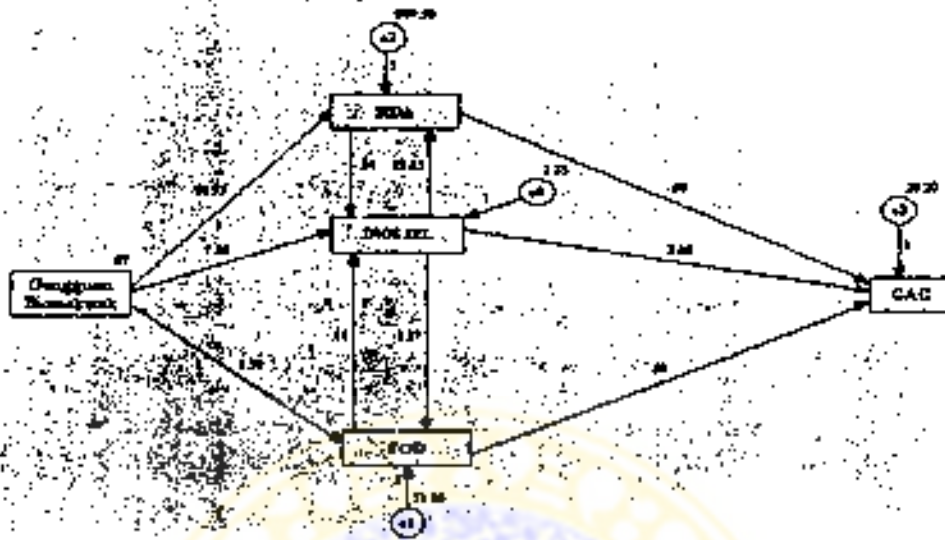


Model 1b

(b) INOS MATRIX

Regression Weights		Estimate	S.E.	C.R.	P	Label
MDA	<-- TREATMEN	0.310	0.095	3.234	0.001	par-1
INOS_MTR	<-- TREATMEN	0.787	0.039	19.933	<0.001	par-2
SOD	<-- TREATMEN	0.497	0.073	6.818	<0.001	par-3
GAG	<-- INOS_MTR	0.260	0.069	3.767	0.001	par-4
GAG	<-- SOD	0.439	0.097	4.530	<0.001	par-5
GAG	<-- MDA	-0.070	0.071	-0.986	0.323	par-6
GAG	<-- TREATMEN	0.203	0.010	19.718	<0.001	par-7
INOS_MTR	<-- SOD	0.173	0.094	1.836	0.066	par-8
SOD	<-- INOS_MTR	0.144	0.017	8.491	<0.001	par-9
MDA	<-- INOS_MTR	0.103	0.032	3.249	0.001	par-10
INOS_MTR	<-- MDA	-0.101	0.021	-4.770	<0.001	par-11

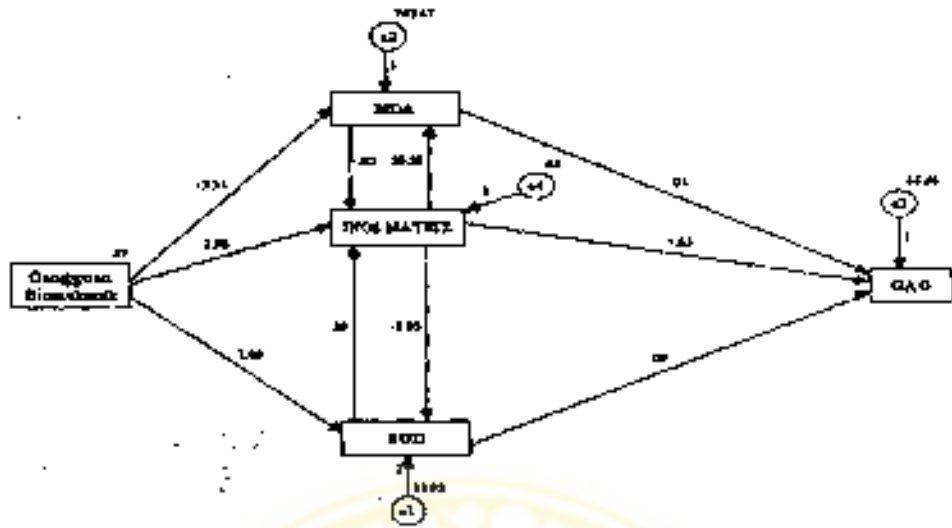
Lampiran 8.2 MODEL INDIRECT



Model IIa

(a) INOS SEL

Regression Weights		Estimate	S.E.	C.R.	P	Label
MDA	<-- TREATMEN	-21.551	37.342	-0.561	0.575	par-1
INOS_SEL	<-- TREATMEN	7.563	1.449	5.222	0.001	par-2
SOD	<-- TREATMEN	2.591	5.987	0.431	0.669	par-4
GAG	<-- INOS_SEL	3.433	0.617	5.561	0.001	par-3
GAG	<-- SOD	1.487	0.414	3.593	0.001	par-5
GAG	<-- MDA	-1.191	0.255	-4.673	0.001	par-6
INOS_SEL	<-- SOD	1.417	0.217	6.528	0.001	par-7
SOD	<-- INOS_SEL	-1.175	0.236	-4.979	0.001	par-8
MDA	<-- INOS_SEL	10.446	0.669	15.614	0.001	par-9
INOS_SEL	<-- MDA	-1.741	0.228	-7.645	0.001	par-10

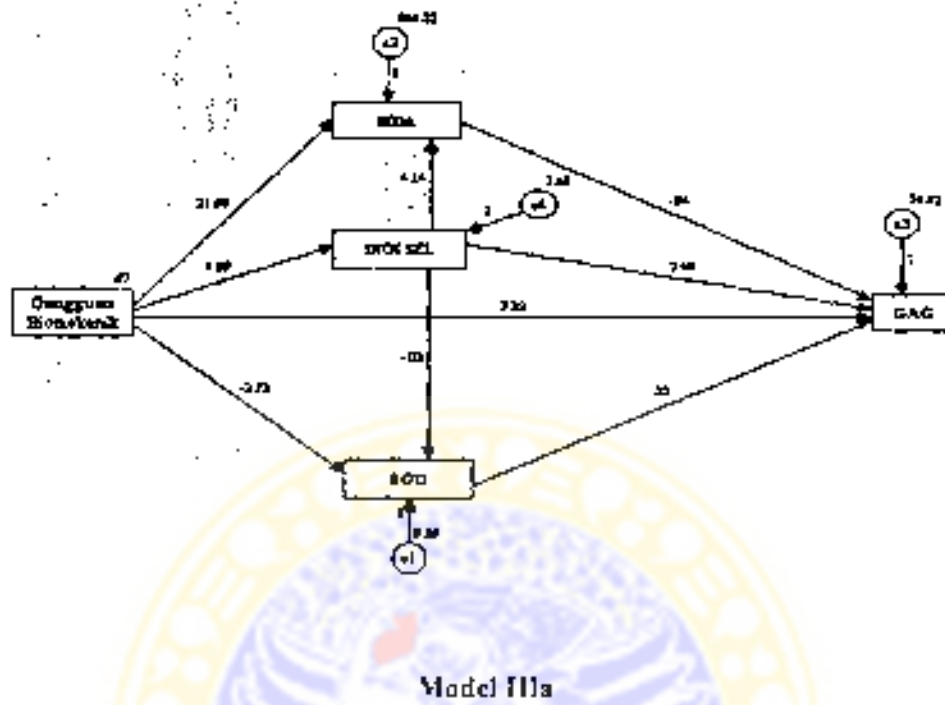


Model IIb

tabel NOS\_MATRIZ

Path	Weight	Estimate	SE	CR	CI	Label
MDA	←	TREATMEN	0.33	0.009	3.614	pas-1
NOS_MTR	←	TREATMEN	0.26	0.019	4.411	pas-2
MDA	←	TREATMEN	0.36	0.017	7.398	pas-4
GAG	←	NOS_MTR	0.41	0.018	6.392	pas-3
GAG	←	MDA	0.10	0.041	2.049	pas-5
GAG	←	MDA	0.10	0.044	2.019	pas-6
NOS_MTR	←	MDA	-0.36	0.019	-6.864	pas-7
MDA	←	NOS_MTR	-0.36	0.017	-6.661	pas-8
MDA	←	NOS_MTR	-0.36	0.017	-6.343	pas-9
NOS_MTR	←	MDA	0.15	0.011	1.277	pas-10

Lampiran 8.3 MODEL DIRECT INOS KE OKSIDAN

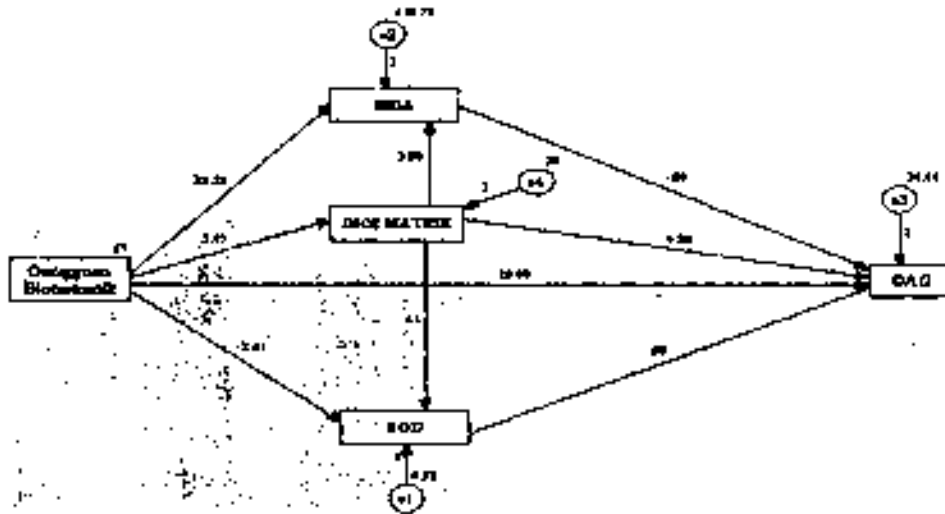


Salinan INOS SPL

Regression Weights

Path	Estimate	S.E.	Z	P	Label
INOS_SPL ← ORGANISME	0.19	0.003	13.473	<.001	par-2
MDA ← ORGANISME	0.21	0.015	13.443	<.001	par-1
INOS ← ORGANISME	0.23	0.014	16.683	<.001	par-4
INOS_SPL ← MDA	0.14	0.01	13.333	<.001	par-3
MDA ← INOS_SPL	0.04	0.025	1.595	.111	par-5
GAG ← INOS_SPL	0.07	0.014	4.904	<.001	par-6
GAG ← INOS	0.25	0.013	19.433	<.001	par-8
INOS ← MDA	0.04	0.025	1.595	.111	par-7
INOS ← E1	0.38	0.01	37.111	<.001	par-9





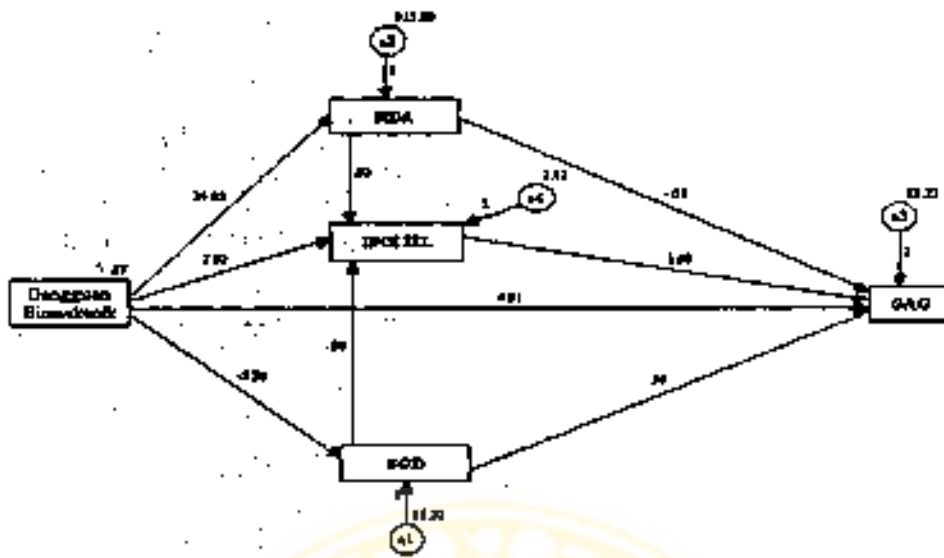
Model IIIb

(b) NOS MATRIX

Regression Weights

			Estimate	S.E.	C.R.	P	Label
0.00	MDA	TREATMEN	0.240	0.003	8.172	0.000	path 1
0.00	MDA	TREATMEN	0.340	0.004	10.500	0.000	path 2
0.00	MDA	TREATMEN	0.240	0.004	10.670	0.000	path 3
0.00	NOS_MATRIX	TREATMEN	0.390	0.003	12.317	0.000	path 4
0.00	NOS_MATRIX	TREATMEN	0.340	0.003	10.720	0.000	path 5
0.00	NOS_MATRIX	TREATMEN	0.380	0.003	11.891	0.000	path 6
0.00	GAG	TREATMEN	0.240	0.003	10.247	0.000	path 7
0.00	GAG	MDA	0.090	0.003	3.000	0.003	path 8
0.00	GAG	TREATMEN	0.380	0.003	11.891	0.000	path 9

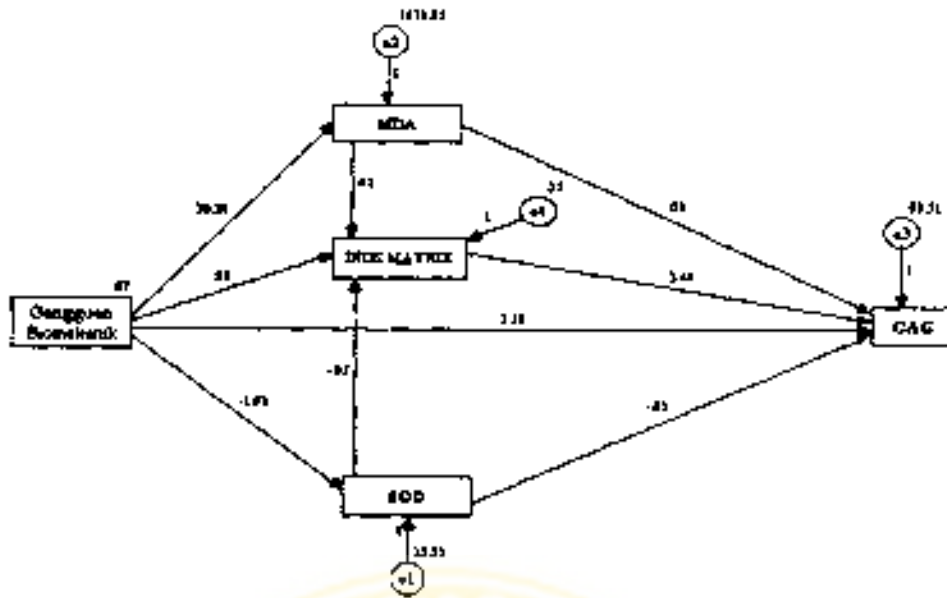
Lampiran 8.4 MODEL DIRECT OKSIDAN KE INOS



Model IVa

(a) iNOS SEL

Regression Weights		Estimate	S.E.	C.R.	F	Label
MDA	<-- TREATMEN	34.471	8.656	3.977	11.7	par-1
iNOS	<-- TREATMEN	-0.360	0.137	-2.621	0.107	par-4
iNOS_SEL	<-- TREATMEN	5.624	0.895	6.281	7.070	par-2
iNOS_SEL	<-- SOC	-0.165	0.118	-1.392	0.232	par-7
iNOS_SEL	<-- MDA	0.112	0.104	1.074	0.303	par-5
GAG	<-- iNOS_SEL	0.597	0.134	4.492	1.032	par-3
GAG	<-- iNOS	0.163	0.158	1.029	0.312	par-5
GAG	<-- MDA	-0.014	0.074	-0.189	0.664	par-6
GAG	<-- TREATMEN	4.504	6.806	0.662	0.420	par-8

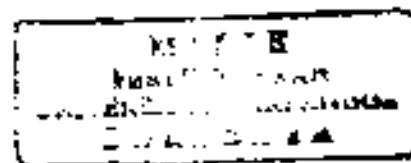


Model IVb

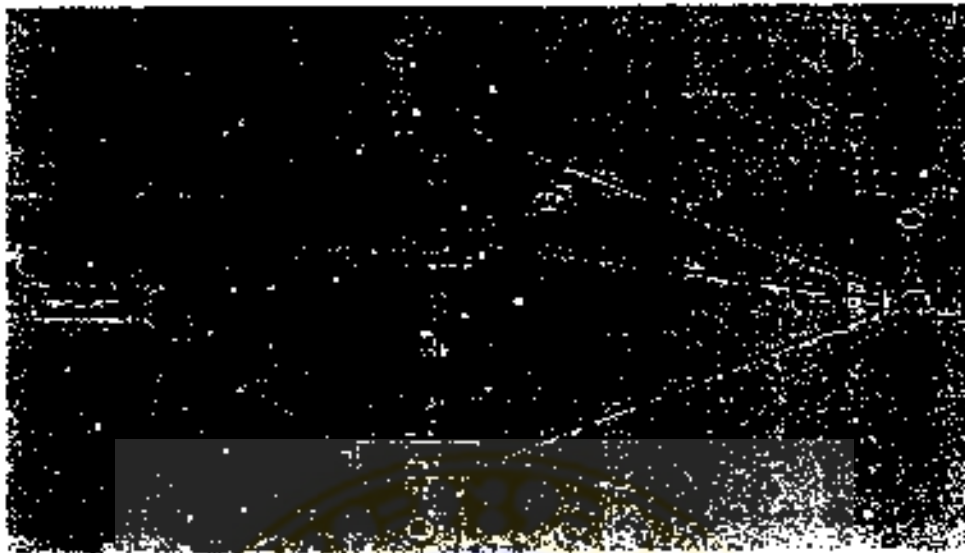
1b) NOS MATRIX

Standardized Weights

Path	Label	Standardized Weight	Label
MDA → INDEX NIA FREE	TREATMEN	0.41	path1
INDEX NIA FREE → CAG	TREATMEN	0.48	path2
INDEX NIA FREE → EOD	TREATMEN	-0.19	path3
EOD → CAG	EOD	0.43	path4
Gangguan Berprestasi → MDA	MDA	0.32	path5
Gangguan Berprestasi → INDEX NIA FREE	INDEX NIA FREE	0.31	path6
Gangguan Berprestasi → EOD	EOD	-0.19	path7



**Lampiran B.5 MODEL INDIRECT INOS KE OKSIDAN**



**Model Va**

**(a) INOS SEL**

Regression Weights				Estimate	S.E.	C.R.	P	Label
INOS_SEL	<--	TREATMEN	5.304	0.438	11.527	0.000	par-2	
MDA	<--	TREATMEN	21.853	24.816	0.881	0.379	par-1	
SOD	<--	TREATMEN	-2.216	3.162	-0.701	0.483	par-4	
SOD	<--	INOS_SEL	-0.123	0.628	-0.196	0.845	par-7	
MDA	<--	INOS_SEL	4.237	4.951	0.856	0.392	par-8	
QAG	<--	INOS_SEL	2.763	0.668	4.138	0.000	par-3	
QAG	<--	SOD	5.067	0.455	11.248	0.000	par-5	
QAG	<--	MDA	-3.019	0.060	-50.317	0.000	par-6	



Model Vb

(b) iNOS MATRIX

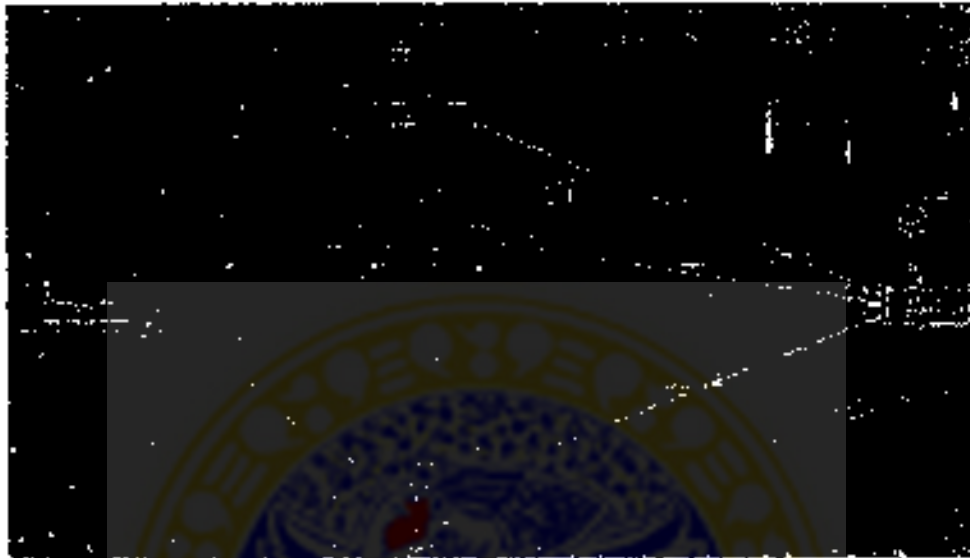
Regression Weights			Estimate	S.E.	C.R.	P	Label
iNOS_MTR	<--	TREATMEN	1.445	0.149	9.692	0.000	par-2
HDA	<--	TREATMEN	31.518	17.510	1.914	0.056	par-1
SOD	<--	TREATMEN	-3.830	2.094	-1.829	0.067	par-4
SOD	<--	iNOS_MTR	0.354	1.299	0.426	0.670	par-7
HDA	<--	iNOS_MTR	2.877	10.866	0.265	0.791	par-8
GAG	<--	iNOS_MTR	8.278	1.997	4.146	0.000	par-3
GAG	<--	SOD	0.253	0.478	0.529	0.597	par-5
GAG	<--	HDA	-0.038	0.057	-0.663	0.507	par-6



## Lampiran 8.6 MODEL INDIRECT OKSIDAN KE iNOS

### (a) iNOS SEL

#### 1.1 Unstandardize

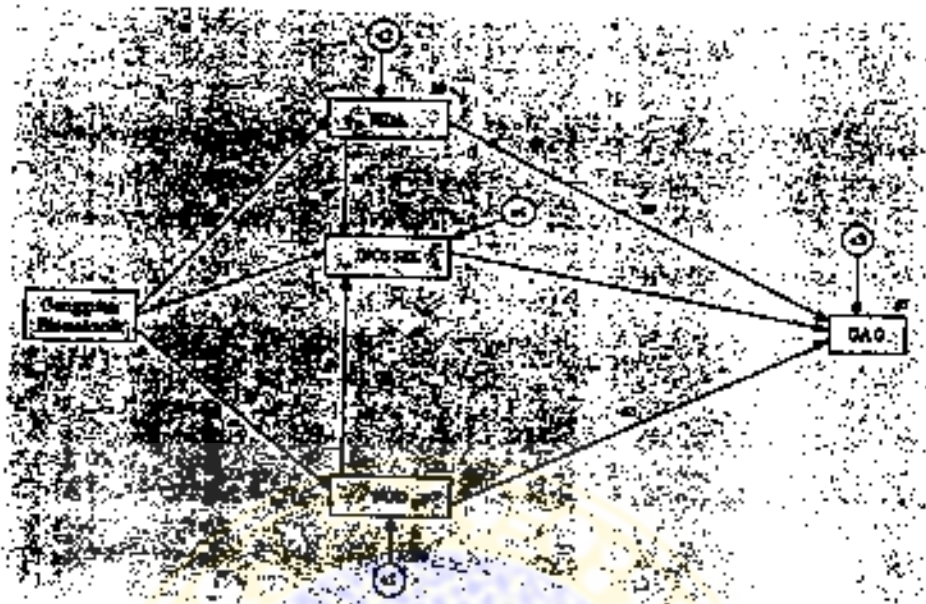


#### Model V1au

##### Regression Weights

			Estimate	S.E.	C.R.	P	Label
MDA	<--	TREATMEN	34.258	8.732	3.923	0.000	par-1
SOD	<--	TREATMEN	-2.345	1.034	-2.267	0.023	par-4
iNOS_SEL	<--	TREATMEN	3.607	0.892	4.045	0.000	par-2
iNOS_SEL	<--	SOD	-0.067	0.118	-0.565	0.572	par-7
iNOS_SEL	<--	MDA	0.022	0.014	1.553	0.120	par-8
GAG	<--	iNOS_SEL	2.023	1.081	1.872	0.061	par-3
GAG	<--	SOD	-0.138	0.622	-0.222	0.824	par-5
GAG	<--	MDA	0.025	0.091	0.271	0.786	par-6

1.2 Standardize



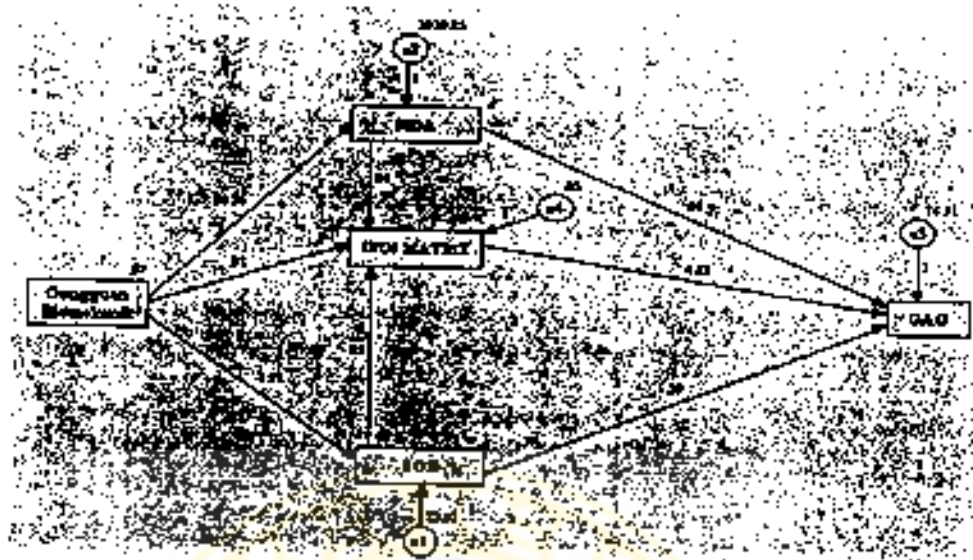
Model Vlas

Standardized Regression Weights

Variable	Path	Estimate
NDA	<-- TREATMENT	0.698
SOC	<-- TREATMENT	0.497
TNOS_SEL	<-- TREATMENT	0.747
TNOS_SEL	<-- SOC	0.063
TNOS_SEL	<-- NDA	0.027
GAG	<-- TNOS_SEL	-0.249
GAG	<-- SOC	0.063
GAG	<-- NDA	0.192

(b) INOS MATRIX

2.1 Unstandardize

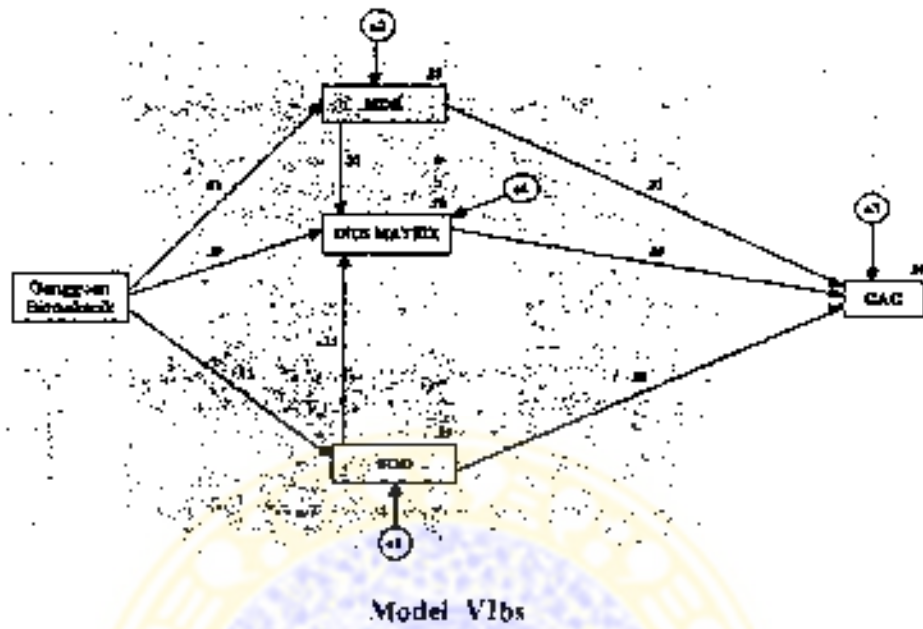


Model V1bu

Regression Weights

			Estimate	S.E.	C.R.	P	Label
MDA	<-	TREATMEN	30.235	11.174	2.706	0.007	par-1
SOC	<-	TREATMEN	-1.934	1.159	-1.668	0.095	par-4
INOS_MTR	<-	TREATMEN	0.908	0.474	1.910	0.056	par-2
INOS_MTR	<--	SOC	0.049	0.060	0.801	0.423	par-7
INOS_MTR	<--	MDA	0.013	0.009	1.271	0.204	par-8
GAG	<--	INOS_MTR	4.611	3.515	1.315	0.187	par-3
GAG	<--	SOC	-0.288	0.730	-0.395	0.693	par-5
GAG	<--	MDA	0.064	0.036	1.670	0.093	par-6

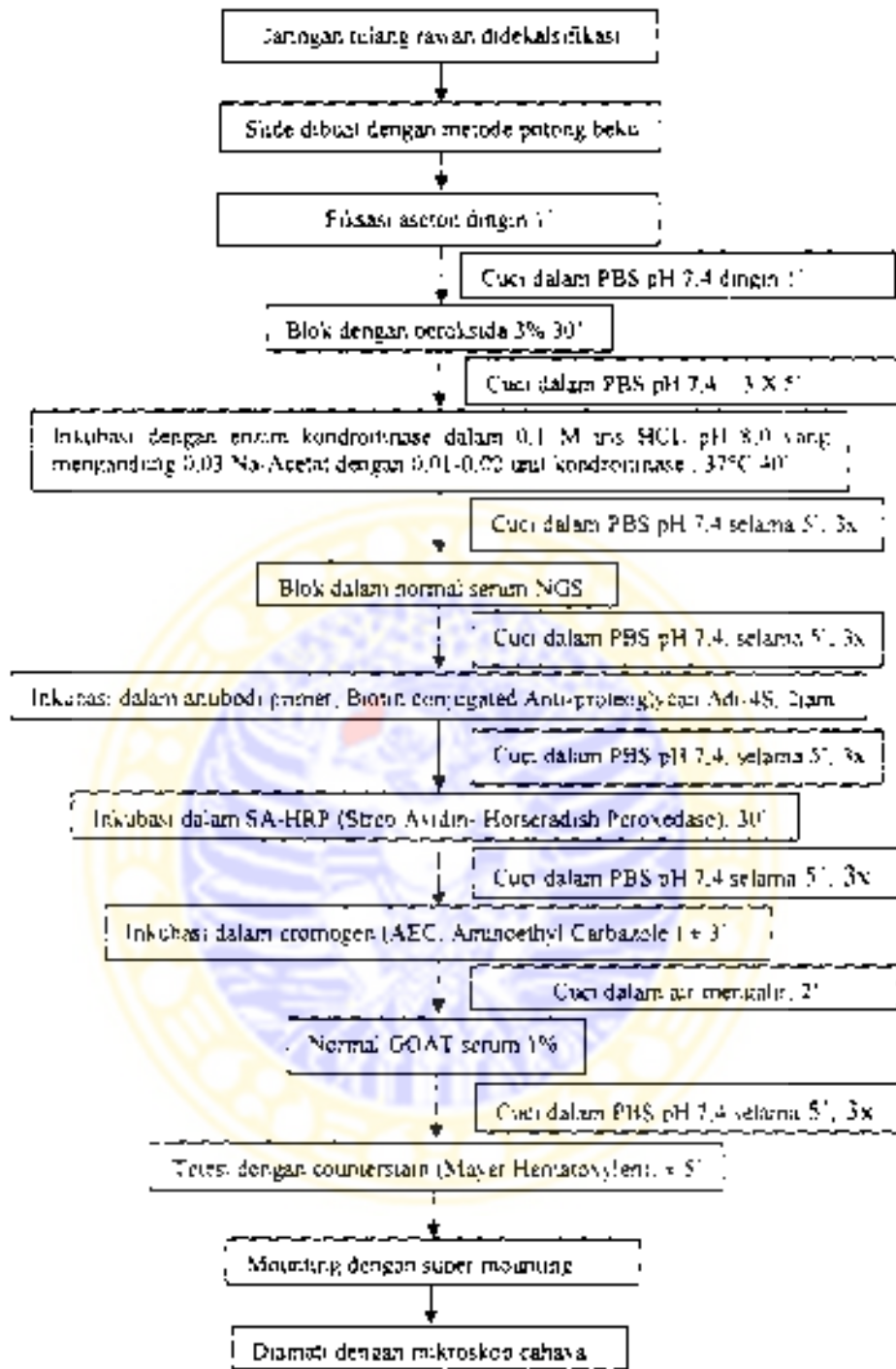
## 2.2 Standardize



Standardized Regression Weights

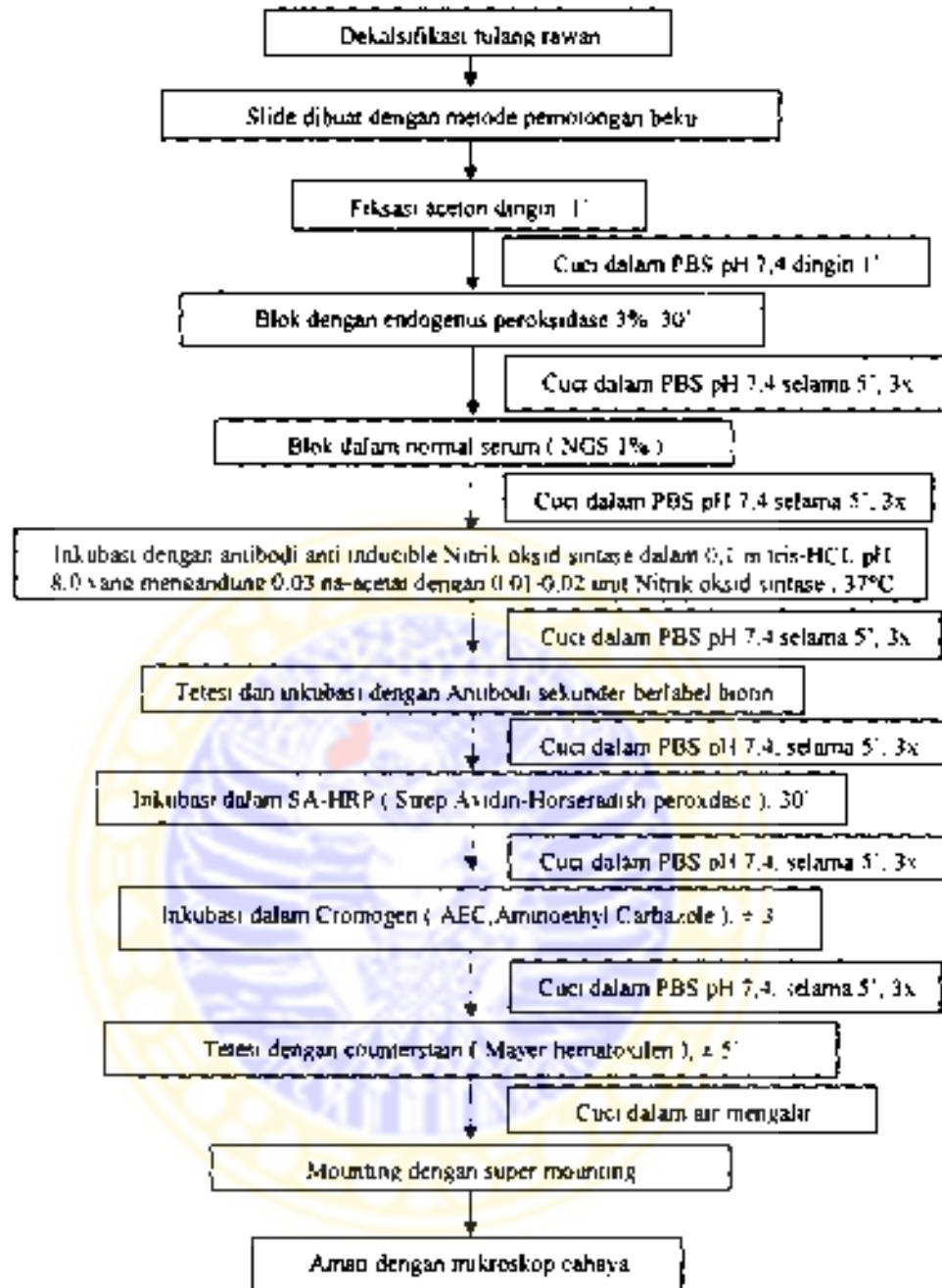
Path	Estimate
MDA ← TREATMEN	0.612
SOC ← TREATMEN	-0.413
INGS_MDR ← TREATMEN	0.585
INGS_MDR ← SOC	-0.248
INGS_MDR ← MDA	0.200
CAC ← INGS_MDR	0.486
CAC ← SOC	-0.591
CAC ← MDA	0.214

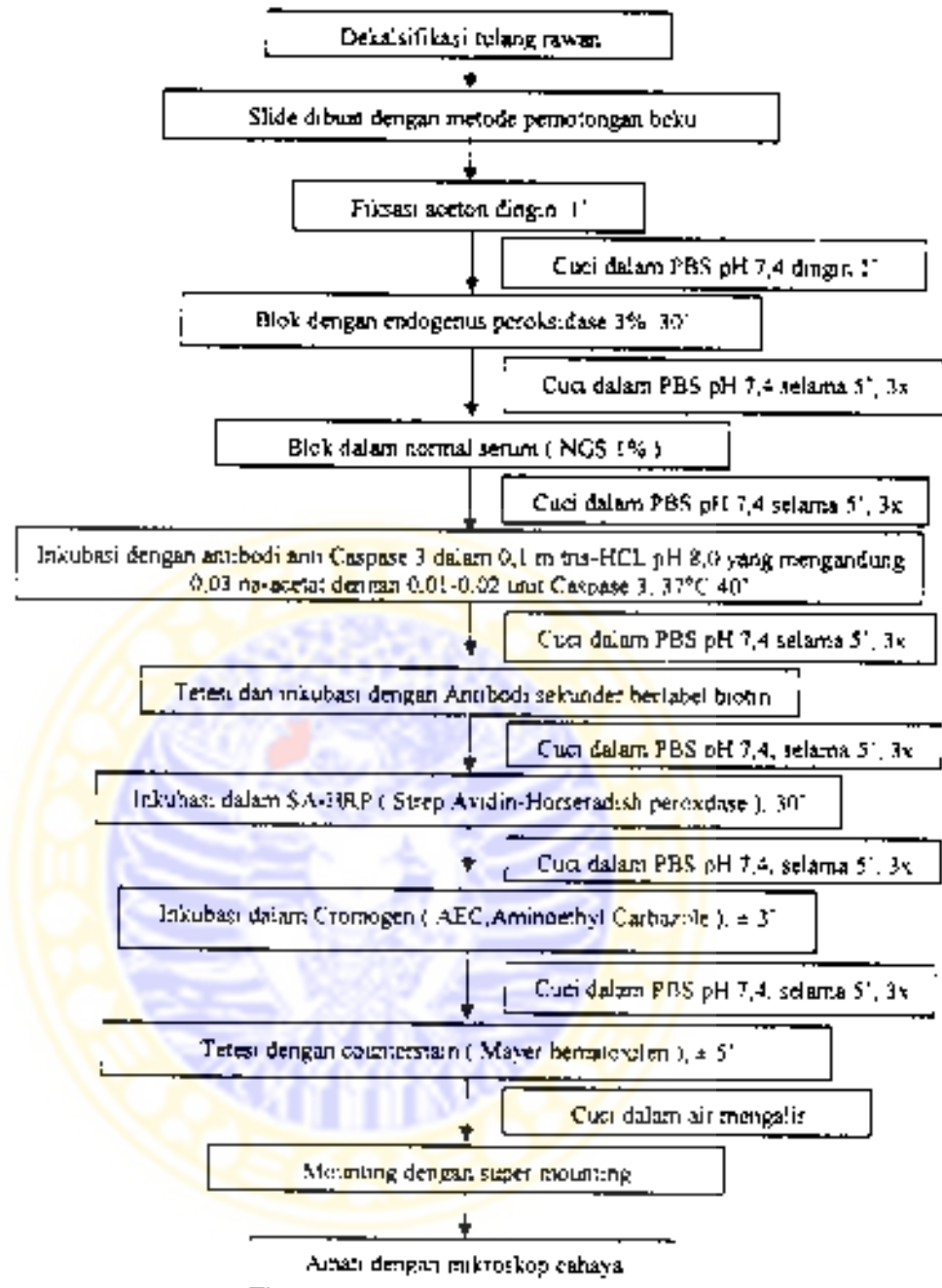
Lampiran 9 Bagan pemeriksaan GAG metode Imunohistokimia





## Lampiran 10 Bagan pemeriksaan iNOS dengan metode imunohistokimia



Lampiran 11 **Bagan pemeriksaan apoptosis dengan metode imunohistokimia**

## Lampiran 12 Uji Kejegan antar Pengamat

## NPar Tests

## Mann-Whitney Test

## Ranks

	PENGAMAT	N	Mean Rank	Sum of Ranks
INOS MATRIKS	Pengamat I	18	17.19	309.5
	Pengamat II	18	19.81	356.5
	Total	36		
INOS SEL	Pengamat I	18	19.25	346.5
	Pengamat II	18	17.75	319.5
	Total	36		

## Test Statistics(b)

	INOS MATR	INOS SEL
Mann-Whitney U	138.5	148.5
Wilcoxon W	309.5	319.5
Z	-0.747	-0.428
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.455	0.669
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.462(a)	.673(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: PENGAMAT

**Lampiran 13 Jumlah apoptosis dan nekrosis kondrosit****Penghitungan ke 1**

DATA APOPTOSIS			DATA NEKROSIS		
K	M	AM	K	M	AM
3	8	12	1	3	9
3	8	17	3	2	6
7	6	13	2	4	9
8	10	10	3	5	9
6	10	20	3	4	5
7	12	22	5	3	8

**Penghitungan ke 2**

DATA APOPTOSIS			DATA NEKROSIS		
K	M	AM	K	M	AM
8	13	20	3	6	10
5	9	14	3	4	12
5	11	19	1	4	10
10	11	19	5	2	6
3	17	24	3	3	9
2	8	17	4	5	9

**Lampiran 14 Densitas GAG intraseluler dan densitas GAG ekstraseluler****Penhitungan ke 1**

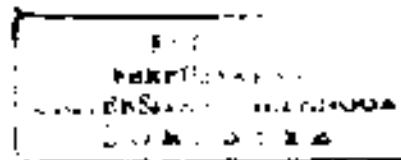
DATA GAG INTRASEL			DATA GAG Matrik (EKTRASEL)		
K	M	AM	K	M	AM
6	12	19	2	2.75	3
4	15	23	1.05	3	3.75
8	10	17	1	2	4
8	9	19	1.5	2	4
4	13	20	1	1.75	3.25
6	18	17	1.5	2.5	3.5

**Penhitungan ke 2**

DATA GAG INTRASEL			DATA GAG Matrik (EKTRASEL)		
K	M	AM	K	M	AM
5	11	19	1	3	4
3	11	23	1.5	2	3.75
3	17	23	1.5	2.05	2.75
9	10	20	2	1.75	3.05
3	12	18	1.5	1.75	3.25
3	11	18	2.05	2	3



**Lampiran 15 *Ethical Animal Clearance***





PANITIA ETIK PENELITIAN KEDOKTERAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
RSUD Dr. SAIFUL ANWAR MALANG

KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 1 / PEPK / V / 2002

PANITIA ETIK PENELITIAN KEDOKTERAN FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA – RSUD Dr. SAIFUL ANWAR MALANG, SETELAH  
MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN  
JUDUL :

STRES OKSIDATIF SEBAGAI FAKTOR PENYEBAB DALAM PATOGENESIS  
KERUSAKAN TULANG RAWAN SENDI OSTEOARTHRITIS SEKUNDER  
AKIBAT GANGGUAN BIOMEKANIK INSTABILITAS

PENELITI UTAMA : MOHAMAD HIDAYAT, dr, SpB, SpBO

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN : LAB. SENTRAL BIOMEDIK  
FK - UNIBRAW

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Malang, ... 20 MEI 2002 .....

KETUA

Prof. Dr. H. Mulychadi Ali, dr, SpFK