

Jurnal Kesehatan Gigi

Analisis Jumlah Sel Monosit yang Mengekspresikan Tnf-A setelah dipapar *Porphyromonas Gingivalis* dan Tulang Ikan Kuniran (*Upeneus Sulphureus*) dengan Teknik Imunositokimia

Fiona Budi Amarta Domini¹, I Dewa Ayu Ratna Dewanti², Erawati Wulandari³
^{1 2 3} Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Indonesia

Corresponding author: Fiona Budi Amarta Domini

Email: fionabudi23@gmail.com

Received: July 27th, 2019; Revised: November 25th, 2019; Accepted: December 30th, 2019

ABSTRACT

Monocytes play a role in the first defense against microorganisms that harm the body by activating nuclear factor $\kappa\beta$ (Nf- $\kappa\beta$) which is the main regulator of inflammatory genes, one of which is TNF- α . TNF- α at excessive levels will cause tissue damage. Therefore an immunomodulator is needed which can regulate the body's immune system. One natural ingredient that acts as an immunomodulator is fish bones. Purpose of research: To analyze the effect of goatfish's bone extract on TNF- α expression in human monocytes exposed to *P. gingivalis*. Method: experimental laboratories in vitro. TNF- α expression was tested by immunocytochemical techniques. Results: The results showed that the average number of monocytes expressing TNF- α in group P1 (group of diclofenac sodium) was 42.33 cells per cell. In the P2 group (*P. gingivalis* group) was 95 cell percent cells and for P3 (fish bone group) was 74.33 cells per cell and the control group was 11.66 cells per hundred cells. Conclusion: goatfish's bone extract can act as an anti-inflammatory which is effective in reducing TNF- α expression in monocyte exposed to *P. gingivalis* but less effective than diclofenac sodium.

Keyword : Infamation; TNF- α ; Immunomodulatory; nuclear factor $\kappa\beta$ (Nf- $\kappa\beta$)

Pendahuluan

Penyakit pada jaringan periodontal merupakan salah satu penyakit yang memiliki prevalensi cukup besar di Indonesia yaitu sebesar 70% dari jumlah penduduk ⁽¹⁾. Penyakit periodontal yang sering terjadi pada manusia adalah periodontitis ⁽²⁾. Periodontitis umumnya dihubungkan dengan meningkatnya jumlah bakteri patogen spesifik, diantaranya yaitu *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, dan *Bacteriodes forsythus* ⁽³⁾. *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) merupakan bakteri dominan dari mikroba rongga mulut yang dapat berkelompok

dengan baik di rongga mulut ⁽⁴⁾. Faktor virulensi antara lain: fimbriae, hemaglutinin, haemolysin, lipopolisakarida (LPS), protease, vesikel membran luar, antigen kapsuler dan seramida. Semua faktor ini penting bagi potensi virulensi *P.gingivalis* seperti kemampuan melekat dan berkolonisasi, memodulasi pertahanan host dan merusak jaringan host ⁽⁵⁾. Respon tubuh terhadap bakteri ini disebut inflamasi, Fimbriae dan lipopolisakarida merupakan virulensi yang dapat menstimulasi sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-1 β , IL-6 dan TNF- α ^(6,7).

Inflamasi adalah satu dari respon utama mekanisme dari sistem pertahanan tubuh untuk melindungi dari suatu organisme, infeksi dan iritasi. Salah satu sel yang kompeten dalam mengatasi *P. gingivalis* adalah monosit. Monosit merupakan salah satu jenis leukosit yang berperan dalam pertahanan pertama yaitu dengan cara mengaktifkan faktor transkripsi genetik yaitu *nuclear factor κ B* (Nf- κ B) yang merupakan pengatur utama gen-gen inflamasi, salah satunya gen yang berfungsi memproduksi TNF- α . TNF- α pada kadar yang tepat akan memberikan perlindungan dan penyembuhan, sedangkan pada kadar yang berlebih akan menyebabkan kerusakan jaringan yang sangat berat dan fatal⁽⁸⁾. Jika sel inflamasi berlebihan akan mengakibatkan kemerahan, bengkak, panas, nyeri, dan hilangnya fungsi⁽⁹⁾.

Inflamasi dapat diatasi dengan menggunakan anti inflamasi, salah satunya yaitu menggunakan golongan anti inflamasi non steroid (AINS)⁽¹⁰⁾. Salah satu obat AINS yang memiliki efek samping yang lebih sedikit dibanding dengan obat AINS lainnya adalah natrium diklofenak⁽¹¹⁾. Efek samping dari natrium diklofenak adalah mual, muntah, gastritis, *eritema* kulit, dan sakit kepala⁽¹²⁾. Adanya efek samping yang cukup serius dalam penggunaan obat AINS ini, maka dicarilah sumber alternatif lain untuk digunakan pada terapi inflamasi. Salah satu pilihan yaitu dengan menggunakan tulang ikan yang menurut Dewanti dkk (2018) memiliki macam-macam kandungan yang dapat berperan sebagai anti inflamasi⁽¹⁵⁾.

Ikan merupakan salah satu kebutuhan pangan yang paling sering dikonsumsi masyarakat Indonesia karena kandungan protein dan kalsium yang tinggi yaitu sebanyak 46,49 kg/kapita (Badan Pusat Statistik Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2017)⁽¹³⁾. Konsumsi ikan akan menyisakan limbah tulang ikan. Selama ini limbah tulang ikan di bidang kesehatan digunakan sebagai salah satu bahan suplemen multivitamin, bahan implan dalam penggantian tulang, katup jantung, sambungan pinggul, bahan pengganti gigi manusia dan bubuk hidroksiapatit karena memiliki ciri-ciri yang sama dengan tulang dan gigi manusia dari segi struktur kimia. Disisi lain tulang ikan selama ini belum banyak dimanfaatkan sebagai anti inflamasi⁽¹⁴⁾.

Menurut Dewanti dkk (2018), Tulang ikan kuniran mengandung macam-macam asam amino, omega 3, omega 6, flavonoid, tannin yang berperan sebagai anti inflamasi⁽¹⁵⁾. Selain itu ikan kuniran (*Upeneus sulphureus*) merupakan ikan

yang paling sering dikonsumsi karena merupakan salah satu jenis ikan kecil yang memiliki harga terjangkau dan merupakan hasil tangkapan samping yang cukup tinggi kelimpahannya sehingga mudah didapat⁽¹⁶⁾. Selama ini tidak banyak penelitian dan pemanfaatan tulang ikan kuniran yang merupakan ikan yang sering dikonsumsi masyarakat Indonesia, sehingga jumlah limbah juga dapat dibilang cukup banyak.

Berdasarkan uraian diatas maka perlu dilakukannya penelitian mengenai jumlah sel monosit yang mengekskresikan TNF- α setelah dipapar bakteri *P. gingivalis*. Dari penelitian ini diharapkan peneliti dapat mengetahui peranan tulang ikan kuniran terhadap jumlah sel monosit yang mengekskresikan TNF- α akibat dipapar bakteri *P. gingivalis*.

Metode Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratoris secara *in vitro*. Rancangan penelitian adalah *the post test only control group design*. Penelitian dilakukan Laboratorium Bioscience Rumah Sakit Gigi dan Mulut dan Laboratorium Histologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember selama bulan Agustus – September 2018.

Penelitian dilakukan untuk menganalisis efek ekstrak tulang ikan kuniran terhadap ekspresi TNF- α pada human monosit yang dipapar *P. gingivalis* dengan teknik imunositokimia. Sampel penelitian adalah isolat monosit yang diambil dari darah vena perifer orang sehat. Besarnya pengulangan sampel yang digunakan pada penelitian ini dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$(r n - 1) - (n - 1) \geq v^2$$

Pada penelitian yang dilakukan terdapat 4 kelompok masing-masing 3 kali pengulangan, sehingga terdapat 12 sampel Kelompok K: kelompok kontrol yang berisi media kultur, isolat monosit, K+: kelompok yang berisi media kultur, isolat monosit, dipapar bakteri *P. gingivalis* dan dipapar natrium diklofenak, K-: kelompok yang berisi media kultur, isolat monosit, dan dipapar bakteri *P. gingivalis* P: kelompok yang berisi media kultur, isolat monosit, diberi ekstrak tulang ikan kuniran dan dipapar bakteri *P. gingivalis*.

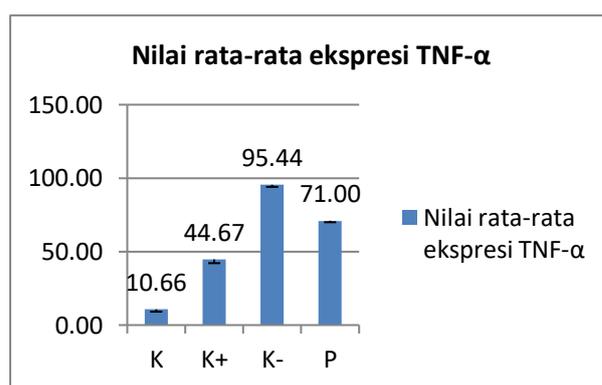
Tahapan prosedur penelitian yang akan dilakukan terdiri dari tahap persiapan, tahap

analisis ekspresi TNF- α , dan analisis data. Tahap persiapan dimulai dengan sterilisasi alat dan ruangan, setelah itu dilanjutkan dengan pembuatan ekstrak tulang ikan kuniran dengan perbandingan 1 gram/ 5ml HNO₃. Selanjutnya dilakukan pembuatan antigen bakteri *P. gingivalis*, dengan cara mencampurkan 2 ml BHIB dan 3 ose koloni bakteri, setelah itu diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37°C. Kemudian suspensi tersebut difilter untuk memisahkan bakteri dengan medianya dengan menggunakan filter syringe. Tahap selanjutnya adalah analisis ekspresi TNF- α . Tahap ini diawali dengan pengambilan sampel darah dari pembuluh darah vena pada *fossa cubiti* sebanyak 6 ml dan dilakukan isolasi monosit dengan metode *single filter (Lymphoprep)*. Jika isolate monosit tidak terkontaminasi selanjutnya dilakukan penempelan sel pada 12 well plate dan ditambahkan media kultur M199 sebanyak 1 ml pada tiap well. Setelah itu memberikan perlakuan ekstrak tulang ikan dan natrium diklofenak, dilanjutkan dengan menginkubasi sampel selama 1 jam pada suhu 37°C dalam *inkubator shaker*. Kemudian lakukan pemaparan dengan antigen bakteri *P. gingivalis* sebanyak 100 μ L pada semua kelompok, kecuali kelompok K. Inkubasi selama 5 jam dalam *inkubator shaker* suhu 37°C dan fiksasi dengan methanol absolut. Dilanjutkan dengan analisis ekspresi TNF- α dengan teknik imunositokimia. Sediaan setelah difiksasi dengan metanol absolut kemudian dicuci dengan aquades selama 5 menit, kemudian direndam dalam *Peroxidase Blocking Solution* (PBS) pada suhu kamar selama 5 menit, kemudian diberi H₂O₂ selama 10 menit kemudian sediaan diberi Superblock selama 5 menit selanjutnya pemberian antibodi primer *Anti-Human TNF- α* (Bioss) ditambahkan 20 μ l per preparat (disesuaikan sampai semua bagian tergenang) kemudian diinkubasikan pada nampan lembab pada suhu kamar (25°C) semalam diberi antibodi sekunder *anti Anti- TNF- α biotin conjugated* (Biotinylated/ DACO) sebanyak 20 μ l per preparat dan diinkubasikan pada suhu kamar (25°C) dilakukan preparasi substrat kromogen DAB: 1 μ l *Betazoid DAB Chromogen* diencerkan dengan 600 μ l *Betazoid DAB Substrate Buffer* segera sebelum digunakan, preparat diinkubasikan dalam substrat kromogen DAB di atas sebanyak 20 μ l per preparat selama kurang dari 20 menit. Kemudian dicuci dengan aquades selama 5 menit. Cat *Mayer hematoxylin (counterstain)* ditambahkan ke preparat, kemudian diinkubasi selama 1 menit, lalu dicuci dengan aquades selama 10 menit, dan

dikeringkan, preparat kemudian dicelupkan ke dalam alkohol, dikeringkan dan dibersihkan, selanjutnya ditetesi entellan kemudian ditutup dengan kaca penutup. Setelah kering, preparat siap diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000 kali. Sel monosit yang dianalisis adalah yang disekeliling membran dan sitoplasmanya berwarna cokelat dan dihitung di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000 kali pada 100 sel monosit.

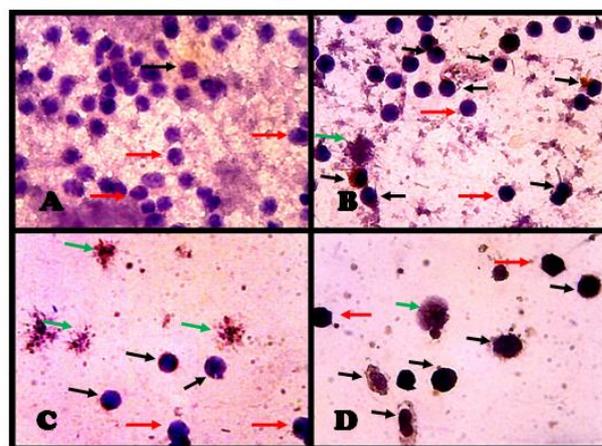
Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji *One Way Anova* dilanjutkan Uji LSD.

Hasil dan Pembahasan



Gambar 1.1 Nilai rata-rata monosit yang mengekspresikan TNF- α

Diagram pada Gambar 4.3 di atas tampak kelompok perlakuan memiliki TNF- α lebih sedikit jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Jumlah monosit pada paling banyak mengekspresikan TNF- α dan jumlah monosit yang paling sedikit mengekspresikan TNF- α adalah kelompok kontrol positif.



Gambar 2 A. Kelompok kontrol, B. Kelompok Kontrol Positif, C. Kelompok Kontrol Negatif, D. Kelompok Perlakuan. Panah hitam: monosit yang

mengekspresikan TNF- α (kecoklatan), panah hijau: monosit nekrosis. Sel monosit diamati dibawah mikroskop *inverted* dengan perbesaran 400x, panah merah: Sel monosit normal

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, ekspresi TNF- α yang dihasilkan pada kelompok kontrol yang berisi monosit sangat rendah yaitu sebesar 44,46 sel perseratus sel. TNF- α merupakan respon inflamasi dicirikan oleh pengaturan peran antara efek pro-inflamasi dan anti inflamasi yang dimediasi oleh sejumlah sitokin⁽⁸⁾. Pada kelompok kontrol monosit tidak dipapar apapun, sehingga ekspresi TNF- α yang dihasilkan sangat rendah.

Pada kelompok kontrol negatif yang berisi monosit dan *P. gingivalis* jumlah sel monosit yang mengekspresikan TNF- α lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya dengan rata-rata 95 sel perseratus sel. Tingginya monosit yang mengekspresikan TNF- α pada kelompok ini dikarenakan tidak adanya perlakuan pemberian anti inflamasi. Pada kelompok kontrol negative juga banyak ditemukan sel yang lisis. Banyaknya monosit yang lisis pada kelompok ini diperkirakan oleh karena stimulasi berlebih dari *P. gingivalis* dan tidak adanya proteksi sel⁽¹⁷⁾. Aktivitas fagositosis berlebih berpotensi menimbulkan stress oksidatif, sehingga tingkat oksigen reaktif intermediate (ROI) yang toksik melebihi pertahanan antioksidan endogen yang mengakibatkan sel mengalami lisis⁽¹⁸⁾.

Jumlah sel monosit yang mengekspresikan TNF- α pada kelompok kontrol positif yang dipapar bakteri *P. gingivalis* dan Natrium diklofenak cukup sedikit dengan rata-rata 42,33 sel perseratus sel. Pada kelompok ini jumlah sel monosit yang mengalami lisis hanya sedikit. Sedikitnya sel yang mengekspresikan tnf-alfa disebabkan karena kandungan anti inflamasi yang terkandung didalam obat natrium diklofenak, yang memiliki fungsi menghambat biosintesis prostaglandin dengan cara menghambat enzim siklooksigenase-1 (COX-1) dan siklooksigenase-2 (COX-2) sehingga konversi asam arakidonat menjadi PGG2 terganggu⁽¹⁹⁾.

Kelompok Perlakuan yang dipapar bakteri *P. gingivalis* dan ekstrak tulang ikan memiliki rata-rata jumlah monosit yang mengekspresikan TNF- α lebih banyak dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok kontrol positif yaitu sebanyak 74,33 sel perseratus sel. Hal ini diduga karena kandungan ikan kuniran dapat berfungsi sbg anti-inflamsai. Tulang ikan kuniran mengandung asam amino glisin, histidin, glisin,

kolagen yang dapat menghambat aktivasi NF- κ B dan degradasi I κ B α dengan stimulasi TNF- α , selain itu histidin juga menunjukkan bahwa menunjukkan efek anti-oksidan seperti radikal bebas⁽²⁰⁾.

Tulang ikan kuniran juga mengandung asam lemak omega 3 yang berpotensi sebagai penghambat proses inflamasi. Asam lemak omega 3 yang terkandung dalam tulang diubah menjadi *eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *docosahexaenoic acid* (DHA). EPA dan DHA tersebut akan bersaing langsung dengan asam arakidonat (AA) untuk proses oksigenase (siklooksigenase dan lipoksigenase) dan mensintesis eikosanoid dari EPA dan DHA. Eikosanoid yang dihasilkan dari EPA dan DHA berupa prostaglandin PGE3, tromboksan TXA3 dan leukotrin LtB5 yang bersifat antiinflamasi⁽²¹⁾.

Kandungan flavonoid pada tulang ikan kuniran memiliki sifat anti inflamasi dengan menghambat iNOS dalam medium kultur yang dirangsang Lipopolisakarida (LPS), yaitu, kuersetin, kuersetin pentaasetat, apigenin, rutin, galangin, silimarin dan naringenin. Kuersetin (3,3', 4',5,7-pentahydroxyflavon) adalah flavonoid yang sesuai untuk dipilih sebagai senyawa utama untuk pengembangan agen anti inflamasi, karena selain efek anti inflamasi, kuersetin juga menunjukkan efek pelindung dalam saluran pencernaan⁽²²⁾.

Tanin pada tulang ikan kuniran dapat mempengaruhi respon inflamasi dengan aktivasnya sebagai penangkal radikal bebas, karena radikal bebas dapat merangsang terjadinya inflamasi. Tanin juga mempunyai aktivitas antioksidan yang berperan sebagai antiinflamasi dengan berbagai cara yaitu menghambat produksi oksidan (O₂) oleh monosit. Penghambatan produksi oksidan O₂ akan mengurangi pembentukan H₂O₂ yang mengakibatkan produksi asam hipoklorid (HOCl) dan OH ikut terhambat. Tanin juga menghambat langsung oksidan reaktif seperti radikal hidroksi (OH) dan asam hipoklorid⁽²³⁾.

Perbandingan jumlah monosit yang mengekspresikan TNF- α pada kelompok perlakuan terlihat sedikit lebih banyak dari pada kelompok kontrol positif. Hal ini dikarenakan dosis natrium diklofenak yang diberikan sesuai dengan aturan pabrik, sedangkan belum ada penelitian tentang dosis yang tepat dalam penggunaan tulang ikan kuniran sebagai anti inflamasi. Kemungkinan lain pembuatan ekstrak tulang ikan kuniran yang telah mengalami pemanasan akan mengalami denaturasi dan

pemutusan atau pemotongan ikatan hidrogen dan disulfida dari protein sehingga berat molekul proteinnya cenderung lebih kecil dibanding sebelum dipanaskan⁽²⁴⁾. Protein dengan berat molekul kecil tidak menutup kemungkinan dapat bertindak sebagai imunogen, meskipun protein dengan berat molekul besar jauh lebih baik. Kelebihan tulang ikan kuniran yang merupakan bahan alami memiliki efek samping yang minim, selain itu macam macam kandungan di dalam tulang ikan kuniran dapat menjadi immunomodulator (simulator dan inhibitor). Immunomodulator dapat mengembalikan keseimbangan sistem imun dan dapat mengurangi inflamasi⁽²⁵⁾. Kelebihan Natrium diklofenak terkonsentrasi pada fungsinya sebagai inhibitor sehingga lebih efektif menjadi anti inflamasi⁽²⁶⁾.

Kesimpulan

Kesimpulan dari peneliti adalah ekstrak tulang ikan kuniran dapat bertindak sebagai anti inflamasi yang efektif dalam mengurangi ekspresi TNF- α monosit yang dipapar *P. gingivalis* tetapi lebih efektif dibanding Natrium diklofenak.

Daftar Pustaka

- [1] Amelia, F., Pustaka, T., dan Irsyadi, F. 2014. O'Mark: Inovasi Pemanfaatan Prostaglandin E2 dalam Saliva Sebagai Evaluasi Tingkat Keperahan Periodontitis. Prosiding *Elektronik Pekan Ilmiah Mahasiswa Nasional Program Kreativitas*. 25-29 Agustus 2014.
- [2] Nagawa, T., Saito, A., Hosaka, Y., dan Ishihara, K. 2003. Gingipains as Candidate Antigens for *Porphyromonas gingivalis* Vaccine. *The Keio Journal of Medicine*. 52(3): 158-162
- [3] Newman, M., Takei, H., Klokkevold, P., dan Carranza, F. 2015. *Carranza's Clinical Periodontology*. Twelfth Edition. St Louis: Elsevier
- [4] Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., dan Lyuya-Mi, Y. 2014. Review Article: *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *Journal Of Immunology Research*. <http://www.hindawi.com/journal/jir/2014/476068/>. Diakses pada 10 Juni 2019
- [5] Perez-Chaparro, P. J., Lafaurie, G. I., Graciux, P., Maurix, V., Tamanai-Shacoori, Z., Castellanos, J. E., dan Bonnaure-Mallet, M. 2009. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA Genotypes in Isolates From Subgingival Plaque and Blood Sample During Bacteremia. *BioMedica*. 29(2).
- [6] Enersen, M., K. Nakano, dan A. Amano. 2013. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Journal of Oral Microbiology*. 5: 1-10
- [7] Nitawati, N. P. M., Robin, D. M. C., dan Syafrjadi, M. 2014. Respon Limfosit T Sitotoksik Pada Gingivitis Setelah Pemberian Kurkumin. *e-Journal Pustaka Kesehatan*. 2(1):42-49.
- [8] Cavailon, J. M. 2003. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators of Gram-negative sepsis, p. 33-58. In M. Kotb and T. Calandra (ed.), *Cytokines and chemokines in infectious diseases handbook*. Humana press, Totowa, N.J.
- [9] Priyanto, 2008. *Farmakologi Dasar Untuk Mahasiswa Farmasi dan Keperawatan, Edisi; II*. Leskonfi. Jakarta.
- [10] Saputri, F. C. dan Zahara, R. 2016. Uji Aktivitas Anti-inflamasi Minyak Atsiri Daun Kemangi (*Ocimum americanum* L.) pada Tikus Putih Jantan yang Diinduksi Karagenan. *Pharm Sci Res*. 3(3): 107-119
- [11] Pangalila, K., Wowor, P. M., Hutagalung, B. S. P. 2016. Perbandingan Efektivitas Pemberian Asam Mefenamat dan Natrium Diklofenak Sebelum Pencabutan Gigi Terhadap Durasi Ambang Nyeri Setelah Pencabutan Gigi. *Jurnal e-GiGi(eG)*. 4(2): 124-132
- [12] Katzung, B. G., 2012. Farmakologi Dasar dan Klinik. Edisi 10. Buku 3. *Translation of Basic and Clinical Pharmacology Eight Edition* Alih Bahasa oleh Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Jakarta : Salemba Medika.
- [13] Badan Pusat Statistik Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2017. *Badan Pusat Statistik Kementerian Kelautan dan Perikanan tahun 2017*. Jakarta Pusat : Badan Pusat Statistik.
- [14] Aisyah, D., Mamat, I., Sontang, M., Rosufila, Z., Ahmad, N.M. 2012. Kajian di Pabrik Pengolahan Krupuk Lekor Kuala Trengganu-Malaysia. Program Pemanfaatan Sisa Tulang Ikan untuk Produk Hidroksiapatit. *Jurnal Sositoteknologi*. 26(11): 129
- [15] Dewanti, I.D.A.R., Purwanto., Wulandari, E., 2018. Analisis Biokompabilitas Limbah Ikan (Duri dan Sisik) Sebagai Biomaterial Untuk

- Tissue Engineering*.
- [16] Sedayu, B.B., Erawan, I.M.S., Wullandari, P. 2015. Preparasi Ikan Kuniran (*Upeneus sulphureus*) Pada Proses Pemisahan Daging Menggunakan Meat Bone Separator. *JPB Kelautan dan Perikanan*. 10(1):83-89
- [17] Sinaga, E.2017. Pengaruh Tingkat Keperahan Sepsis bakterialis Terhadap Nilai *Low Density Lipoprotein* (LDL). *Tesis*. Medan. Progam Magister Kedokteran Klinik Spesialis Ilmu Penyakit Dalam Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Usuniversitas Sumatra Utara. Hal:5-10
- [18] Arief, S. 2007. *Radikal Bebas*. Ilmu Kesehatan Anak FK UNAIR Surabaya.
- [19] Fajriani. 2008. Pemberian Obat-obatan Anti Inflamasi Non Steroid (AINS) pada Anak. *Indonesian Journal of Dentistry*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin. 15(3): 200-204
- [20] Hasegawa, S., Ichiyama, T., Sonaka, I., Ohsaki, A., Okada, S., Wakiguchi, K., Kudo, K., Kittaka, S., Hara, M., Furukawa, S. 2011. Cysteine, Histidine and Glycine Exhibit Anti-inflammatory Effect in Human Coronary Arterial Endothelial Cell. *Clinical & amp: Experimental Immunology*. 167(2)
- [21] Andari, K., Normasari, R., dan Hasan, M. 2017. Pengaruh Minyak Lemuru (*Sardinella longiceps*) terhadap Ekspresi *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α) Kartilago yang Diinduksi Complete Freund's Adjuvant. *E-jurnal Pustaka Kesehatan*. 5(1): 1-5.
- [22] Patala, R., Levita, J., dan Milanda, T. 2018. Aktivitas Penghambatan *In Vitro* dan Penambatan Molekular Senyawa Flavonoid pada Inducible Nitric Oxide Synthase: Review. *Farmaka*.16(3): 22-30
- [23] Sukmawati., Yuliet., Hardani, R. 2015. Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Pisang Ambon (*Musa paradisiacal L.*) Terhadap Tikus Putih (*Rattus norvegicus L.*) yang Diinduksi Karagenan. *GALENIKA Journal of Pharmacy*. 1(2): 126-132
- [24] Karnen KG, Rengganis I. *Imunologi Dasar*. Edisi-8. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 2009. Hal : 399-556.
- [25] Hamzah, N., Najib, A., Thahir, N., Misqawati, i., 2015. Studi Farmakofor Reseptor COX-2 Sebagai Anti inflamasi. *Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia Makasar*. 2(3): 99-107.