

## Uji Aktivitas Analgesik Minyak Ikan Salmon pada Mencit Putih (*Mus musculus*) Jantan Galur Balb/C dengan Metode *Hot Plate*

**Ersanda Nurma Praditapuspa, Angelica Kresnamurti, Ana Khusnul Faizah\***

Lab Farmakologi, Bagian Farmasi Klinik, Farmasi, Universitas Hang Tuah

\*E-mail: [ana.faizah@hangtuah.ac.id](mailto:ana.faizah@hangtuah.ac.id)

### Abstract

Pain is a common symptom in humans, that can be reduced without loss of consciousness by analgesics. One of the most commonly used analgesics-antipyretic is paracetamol. If paracetamol is used in high doses and in the a long term it may increase the risk of hepatotoxicity. Salmon oil rich in the omega-3 is now one of the most widely used nutraceutical. The purpose of this study is to determine the effect of central analgesic of salmon oil with hot plate method. This research used using white male mice (*Mus musculus*) of BALB/C strain. The observation of latency time when the mice was placed on a hot plate with a temperature of  $55 \pm 0,5^{\circ} \text{C}$  was performed at the time before and after treatment, at 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 and 120 minute. The result are %MPE of negative control group, positive control group, group are salmon oil dose 10 mg/kg BW, 20 mg/kg BW and 30 mg/kg BW were 2,13%; 72,04%; 34,94%; 46,80% and 74,59% respectively at minute 60. There were significant differences of %MPE at minute 60. The results showed that  $ED_{50}$  value of salmon oil was 15,990 mg/kg BW. It shows that salmon oil has analgesic activity in white mice (*Mus musculus*) with hot plate method.

**Keywords:** salmon oil, fish oil, analgesic, hot plate, omega-3, nutraceutical

### Abstrak

Nyeri merupakan gejala yang sering terjadi pada manusia, yang bisa dikurangi tanpa kehilangan kesadaran dengan analgesik. Salah satu obat analgesik-antipiretik adalah parasetamol. Jika parasetamol digunakan dalam dosis besar dan dalam jangka waktu lama dapat meningkatkan risiko hepatotoksik. Minyak ikan salmon yang kaya akan omega-3 saat ini telah menjadi salah satu nutrasetikal yang banyak digunakan oleh masyarakat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek analgesik sentral minyak ikan salmon dengan metode *hot plate*. Penelitian ini menggunakan mencit putih (*Mus musculus*) jantan galur BALB/C. Pengamatan waktu latensi ketika mencit diletakkan di atas *hot plate* dengan suhu  $55 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  dilakukan pada saat sebelum pemberian perlakuan, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 dan 120 menit. Hasil perhitungan %MPE kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok minyak ikan salmon dosis 10 mg/kg BB, 20 mg/kg BB dan 30 mg/kg BB berturut-turut sebesar 2,13%; 72,04%; 34,94%; 46,80% dan 74,59% pada menit ke-60. Ada perbedaan signifikan %MPE pada menit ke-60. Hasil penelitian menunjukkan nilai  $ED_{50}$  minyak ikan salmon sebesar 15,990 mg/kg BB. Hal tersebut menunjukkan bahwa minyak ikan salmon mempunyai aktivitas analgesik pada mencit putih (*Mus musculus*) dengan metode *hot plate*.

**Kata Kunci:** minyak ikan salmon, analgesik, *hot plate*, omega-3; nutrasetikal

**Submitted:** 2019

**Accepted:** 2019

**DOI:** <https://doi.org/10.25026/jsk.vxix.xxx>

## ■ Pendahuluan

Nyeri merupakan gejala yang sering dirasakan oleh semua orang, dimana nyeri umumnya disebabkan oleh trauma mekanik, fisika, kimia, ataupun trauma lain yang mengakibatkan rangsangan pada reseptor nyeri. Nyeri merupakan mekanisme untuk melindungi tubuh terhadap suatu gangguan dan kerusakan di jaringan seperti peradangan, infeksi dan kejang otot dengan pembebasan mediator nyeri [1].

Obat yang digunakan untuk menghilangkan rasa nyeri disebut analgesik. Parasetamol merupakan jenis obat-obatan golongan analgesik non-narkotik yang paling banyak digunakan di Indonesia baik dalam bentuk sediaan tunggal maupun kombinasi dengan obat lain. Parasetamol merupakan penyebab utama dari penyakit gagal hati akut di Amerika Serikat. Pada tahun 2006, *American Association of Poison Control Centers* mencatat hampir 140.000 keracunan dikaitkan dengan parasetamol dimana lebih dari 100 pasien meninggal. Menurut pernyataan dari *American Association for the Study of Liver Diseases*, kejadian parasetamol terkait dengan toksisitas hati [2]. Kerusakan hati akibat parasetamol terjadi akibat NAPQI (*N-acetyl-p-benzoquinoneimine*) yang merupakan metabolit yang sangat reaktif. Pada keadaan normal metabolit reaktif ini dengan cepat berikatan dengan kadar glutathion di hati. Akan tetapi pada keadaan kelebihan dosis atau pemakaian terus menerus yang menyebabkan produksi NAPQI terus bertambah yang menyebabkan ketidakseimbangan dengan kadar glutathion. Pada kondisi tersebut NAPQI berikatan membentuk makromolekul dengan sel hati yang mengakibatkan nekrosis sel hati [3].

Ikan salmon memiliki kandungan omega-3 yang didalamnya terdapat *Eicosapentaenoic Acid* (EPA) dan *Docosahexaenoic Acid* (DHA). Studi klinis telah menunjukkan beberapa manfaat yang dihasilkan dari penggunaan omega-3 (EPA dan DHA) untuk berbagai nyeri inflamasi, seperti nyeri inflamasi sendi, sakit kepala kronis, osteoarthritis,

rheumatoid arthritis, nyeri punggung, nyeri neuropatik dan *dysmenorrhea* [4]. Dalam penelitian Nobre yang dilakukan sebelumnya menyatakan bahwa omega-3 (EPA dan DHA) mempunyai efek antiinflamasi dan *antinociceptive* pada hewan pengerat dengan dosis rendah [5]. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa zat yang terkandung dalam minyak ikan tersebut memiliki efek sebagai antiinflamasi, antitrombotik, antiaritmik, dan antiatherogenik [6, 7]. Efek analgesik yang dihasilkan dari minyak ikan salmon diharapkan dapat sebagai alternatif analgesik yang lebih aman dibandingkan dengan antiinflamasi telah beredar. Pada penelitian ini minyak ikan salmon diuji aktivitas analgesiknya dengan metode *hot plate*. Untuk mempelajari aktivitas analgesik sentral minyak ikan salmon. Uji aktivitas analgesik dinyatakan dalam presentase *Maximum Possible Effect* (%MPE) dan kemudian ditentukan ED<sub>50</sub>.

## ■ Metode Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan metode rancangan *pre-test post-test only control group design* dan telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian LPPM Fakultas Kedokteran Universitas Hang Tuah Surabaya dengan nomor surat 01.F.2/HC/EC/KEPUHT/2018.

### Bahan Penelitian

Parasetamol (Anqiu Lu'an Pharmaceutical Co., LTD China), Tween 80 (Merck), Span 80 (Merck), aquadest dan sediaan minyak ikan salmon yang diproduksi oleh salah satu Industri Nutrasetikal Laut.

### Persiapan Hewan Coba

Sebagai hewan coba digunakan mencit putih (*Mus musculus*) galur BALB/C dengan karakteristik jantan, dewasa, yang berumur 2-3 bulan, dengan berat badan 20-30 gram, sehat dan tidak ada kelainan pada bagian tubuhnya. Sebelum

digunakan, hewan coba terlebih dahulu diaklimatisasi selama 1 (satu) minggu di kandang hewan dengan tujuan mengadaptasikan hewan coba dengan lingkungan yang baru dan diberikan makanan standarserta minum. Mencit yang sehat memiliki ciri-ciri bulu bersih dan tidak berdiri dan mata jernih bersinar, dan berat badan bertambah atau tidak berkurang setiap hari.

### Uji Aktivitas Analgesik

Uji aktivitas analgesik dengan metode *hot plate* untuk melihat aktivitas analgesik sentral. Induksi termik dilakukan dengan meletakkan mencit di atas *hot plate* pada suhu  $55^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  sebagai stimulus nyeri. Hewan coba akan memberikan respon ditunjukkan dengan menjilat kaki belakang, mengangkat kaki belakang, menghentakkan kaki belakang dan melompat. Sebelum perlakuan dan setelah lima belas menit, waktu latensi dicatat dengan interval waktu lima belas menit selama 2 jam.

Mencit dipuaskan  $\pm 18$  jam sebelum pengujian, air minum tetap diberikan. Pada hari pengujian, mencit ditimbang bobotnya dan dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok dengan jumlah mencit masing-masing kelompok 5 ekor mencit. Sebelum dilakukan pemberian perlakuan pada mencit, terlebih dahulu mencit diletakkan di atas *hot plate* selama 40 detik dan dicatat waktu latensinya sebagai kontrol laten. Kelima kelompok diberi perlakuan sebagai berikut:

1. Kelompok kontrol negatif, setiap mencit diberikan emulsi kombinasi Tween 80 dan Span 80 5% sebanyak 0,2 mL/20g BB mencit secara oral.
2. Kelompok kontrol positif, setiap mencit diberikan parasetamol dosis 100 mg/kg BB yang diemulsikan ke dalam kombinasi Tween 80 dan Span 80 5% sebanyak 0,2 mL/20g BB secara oral.
3. Kelompok minyak ikan salmon dengan dosis 10 mg/kg BB yang diemulsikan ke dalam kombinasi Tween 80 dan Span 80 5% sebanyak 0,2 mL/20g BB secara oral.
4. Kelompok minyak ikan salmon dengan dosis 20 mg/kg BB yang diemulsikan ke dalam kombinasi Tween 80 dan Span 80 5% sebanyak 0,4 mL/20g BB secara oral.
5. Kelompok minyak ikan salmon dengan dosis 30 mg/kg BB yang diemulsikan ke dalam kombinasi Tween 80 dan Span 80 5% sebanyak 0,6 mL/20g BB secara oral.

Kemudian mencit diletakkan di atas *hot plate* pada suhu  $55^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  dengan waktu *cut off* 40 detik. Respon mencit (ditunjukkan respon menjilat kaki belakang, mengangkat kaki belakang, menghentakkan kaki belakang dan melompat) diamati pada 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 dan 120 menit.

### Perhitungan Presentase Maximum Possible Effect (%MPE)

*Maximum Possible Effect* merupakan besaran yang digunakan untuk menghitung hambatan nyeri pada uji aktivitas dengan metode *hot plate* dan *tail flick*. Data waktu latensi yang diperoleh dihitung presentase *Maximum Possible Effect* (%MPE) berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$\%MPE = \frac{\text{Waktu laten} - \text{Kontrol laten}}{\text{Waktu cut off} - \text{Kontrol laten}} \times 100\%$$

### Penentuan ED<sub>50</sub>

ED<sub>50</sub> adalah dosis efektif yang menghasilkan hambatan nyeri sebesar 50% pada populasi. Kurva tersebut diperoleh dari analisis regresi dosis sebagai sumbu x yang merupakan variabel bebas yaitu log dosis dan % hambatan nyeri sebagai y yang merupakan variabel tergantung [8]. Persamaan regresi antara dosis (x) dengan % hambatan nyeri:  $y = bx + a$

ED<sub>50</sub> dapat dihitung dengan rumus :

$$ED_{50} = \frac{50 - a}{b}$$

### Analisis Data

Semua data yang diperoleh dianalisis secara statistika dengan bantuan program komputer SPSS 22.0 dengan analisis *one-way ANOVA* dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* LSD dengan tingkat kepercayaan 95%.

## ■ Hasil dan Pembahasan

Telah dilakukan penelitian uji aktivitas analgesik minyak ikan salmon pada mencit putih (*Mus musculus*) dengan metode *hot plate*. Metode *hot plate* dipilih karena cocok digunakan untuk melihat aktivitas analgesik sentral. Suhu *hot plate* yang digunakan adalah  $55^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  dengan lama waktu pengamatan maksimal 40 detik. Parameter yang diperoleh dari metode ini adalah waktu latensi, yaitu waktu yang diperlukan mencit saat diletakkan di atas *hot plate* hingga memberi respon berupa menjilat kaki belakang,

mengangkat kaki belakang, menghentakkan kaki belakang dan melompat [9].

Pertama-tama hewan coba dibagi menjadi lima kelompok (n=5). Pengamatan dilakukan pada waktu mencit sebelum dan 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 dan 120 setelah pemberian sediaan, yang berupa kontrol negatif, kontrol positif, dan minyak ikan salmon (dosis 10 mg/kg BB, 20 mg/kg BB serta 30 mg/kg BB) secara per oral. Pada kurva hubungan %MPE terhadap waktu (Gambar 1) dapat dilihat bahwa rata-rata %MPE terbesar dari parasetamol dan minyak ikan salmon adalah pada menit ke-60 sebagaimana yang ditunjukkan oleh Tabel 1 sehingga %MPE itulah yang digunakan untuk membandingkan lima kelompok uji. Pada kurva tersebut (Gambar 1) terlihat bahwa peningkatan dosis minyak ikan salmon (10 mg/kg BB, 20 mg/kg BB serta 30 mg/kg BB) akan berpengaruh terhadap presentase hambatan nyeri. Dimana semakin meningkatnya dosis minyak ikan salmon maka akan meningkat pula %MPE. Peningkatan %MPE menunjukkan efek analgesik yang besar. Hasil penelitian ini sebanding dengan penelitian Nobre bahwa omega-3 (EPA dan DHA) mempunyai efek antiinflamasi dan *antinociceptive* pada hewan pengerat dengan dosis rendah.

Pemberian omega-3 setelah 30 menit (dengan dosis 2,5 dan 5,0 mg/kg secara oral) menunjukkan peningkatan waktu latensi 1,1 dan 1,9 kali dibandingkan dengan kontrol pada periode pengamatan yang sama [10]. Penelitian yang dilakukan pada mencit dengan metode *Whriting test* juga menunjukkan ada efek analgesik dari minyak ikan salmon [11].

Efek *antinociceptive* sentral dari omega-3 terjadi melalui mekanisme pelepasan  $\beta$ -endorphin oleh aksi DHA melalui *G-protein-coupled receptor 40* (GPR40 signaling, yang akhirnya menginduksi antinosisepsi oleh stimulasi  $\mu$ - dan  $\delta$ -opioid reseptor. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Nakamoto bahwa DHA berpengaruh terhadap *thermal nociception* pada tikus. Penelitian tersebut menunjukkan DHA (dosis 5 mmol/kg, 15 mmol/kg, dan 25 mmol/kg) mempunyai efek paling besar pada menit ke-60 setelah pemberian DHA [12]. Peningkatan waktu latensi bergantung pada dosis yang diberikan, semakin tinggi dosis DHA maka waktu latensi akan meningkat. Hasil penentuan ED<sub>50</sub> minyak ikan salmon mempunyai ED<sub>50</sub> sebesar 15,990 mg/kg BB.

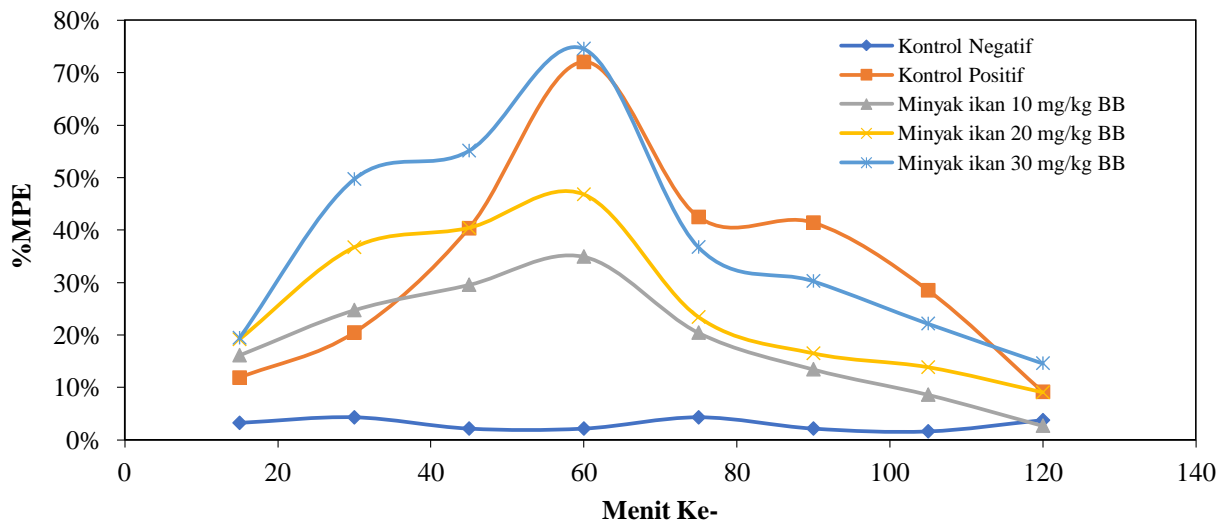
Tabel 1. Hasil Perhitungan %MPE Rata-rata pada Tiap Kelompok.

Menit ke-	%MPE RATA-RATA				
	Kelompok				
	Kontrol Negatif	Kontrol Positif	Minyak ikan 10 mg/kg BB	Minyak ikan 20 mg/kg BB	Minyak ikan 30 mg/kg BB
15	3,21%	11,83%	16,12%	19,14%	19,45%
30	4,26%	20,43%	24,73%	36,70%	49,72%
45	2,13%	40,32%	29,56%	40,42%	55,13%
60	2,13%	72,04%	34,94%	46,80%	74,59%
75	4,26%	42,47%	20,43%	23,40%	36,75%
90	2,13%	41,39%	13,44%	16,48%	30,27%
105	1,60%	28,49%	8,60%	13,83%	22,16%
120	3,72%	9,13%	2,68%	9,04%	14,59%

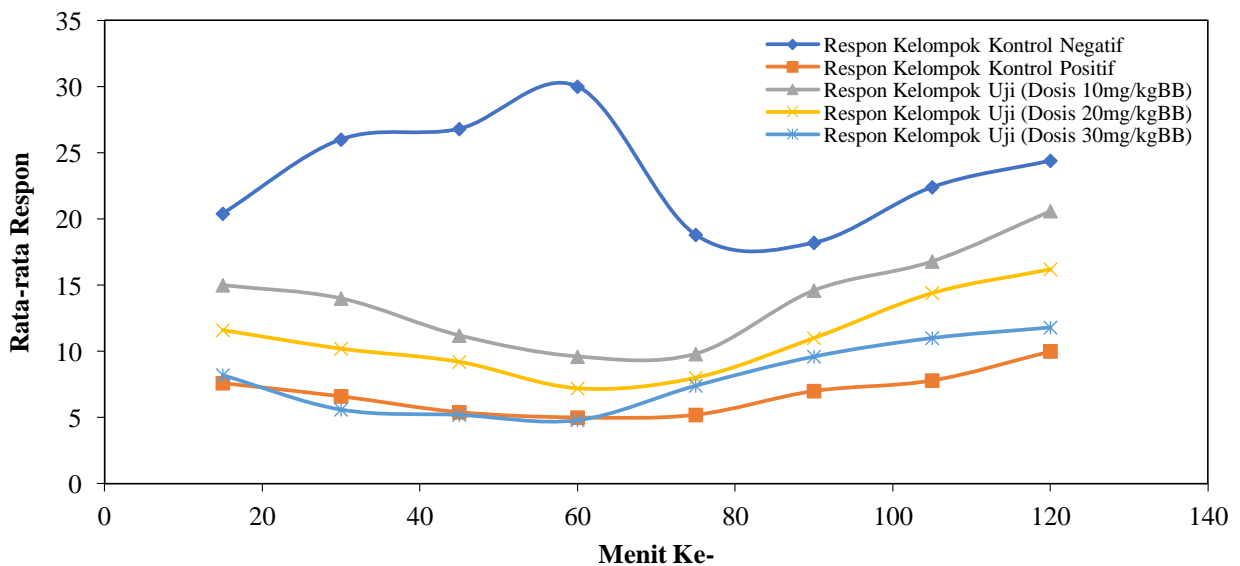
Tabel 2. Hasil *Mean Difference* Uji LSD Persentase *Maximum Possible Effect* Menit ke-60 antara Kelompok Kontrol Negatif, Kontrol Positif dan Kelompok Uji Minyak Ikan Salmon (dosis 10 mg/kg BB, 20 mg/kg BB dan 30 mg/kg BB).

Kelompok	Kontrol Negatif	Kontrol Positif	Minyak Ikan Salmon dosis 10 mg/kg BB	Minyak Ikan Salmon dosis 20 mg/kg BB	Minyak Ikan Salmon dosis 30 mg/kg BB
Kontrol Negatif	-	-70,12600*	-33,02800*	-44,89280*	-72,67760*
Kontrol Positif	70,12600*	-	37,09800*	25,23320*	-2,55160
Kelompok Minyak Ikan dosis 10 mg/kg BB	33,02800*	-37,09800*	-	-11,86480*	-39,64960*
Kelompok Minyak Ikan dosis 20 mg/kg BB	44,89280*	-25,23320*	11,86480*	-	-27,78480*
Kelompok Minyak Ikan dosis 30 mg/kg BB	72,67760*	2,55160	39,64960*	27,78480*	-

Keterangan: \* = ada perbedaan bermakna pada  $\alpha=0,05$



Gambar 1. Kurva Hubungan %MPE terhadap Waktu



Gambar 2. Grafik Perbandingan Nilai Rata-Rata Respon Kelima Kelompok

Data %MPE pada masing-masing kelompok terlebih dahulu diuji normalitasnya dengan Kolmogorov-Smirnov didapatkan probabilitas sebesar 0,200 ( $P \geq 0,05$ ) menunjukkan data %MPE terdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas Levene didapatkan probabilitas sebesar 0,178 ( $P \geq 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa data bervariasi homogen. Untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang bermakna %MPE dari kelima kelompok digunakan analisis statistik *One Way ANOVA*. Probabilitas kelima kelompok tersebut sebesar 0,00 ( $P < 0,05$ ) dan nilai F sebesar 67,393 ( $F > F$  tabel) menunjukkan bahwa ada perbedaan

bermakna %MPE kelompok uji minyak ikan salmon (dosis 10 mg/kg BB; 20 mg/kg BB dan 30 mg/kg BB), kelompok kontrol positif (parasetamol 100 mg/kg BB) dan kelompok kontrol negatif (kombinasi Tween 80 dan Span 80 5%) pada menit ke-60. Hasil penelitian ini didukung dengan penelitian Nobre (2013) yang menunjukkan bahwa adanya perbedaan bermakna %MPE antarkelompok kontrol, minyak ikan (dosis 2,5 mg/kg BB dan 5 mg/kgBB) serta pembandingan morfin. Hasil penelitian Nakamoto juga menunjukkan hasil pemberian DHA dosis 25



mmol/kg terdapat perberbedaan secara bermakna dengan kelompok kontrol.

Dari hasil penelitian di atas, baik perbandingan %MPE rata-rata pada tiap-tiap kelompok (Gambar 1) maupun perbandingan jumlah respon mencit pada lima kelompok (Gambar 2) dapat terlihat bahwa cara kerja dari minyak ikan salmon dan parasetamol memiliki cara kerja yang sama. Pada kelompok kontrol pemberian minyak ikan salmon dan parasetamol terlihat efek analgesiknya mulai dari menit ke 15. Kedua zat ini juga mencapai efek analgesik maksimalnya pada menit ke 60. Meskipun kedua zat uji tersebut yaitu minyak ikan salmon dan parasetamol mencapai efek maksimalnya pada menit ke 60, pada menit ke 120 kedua zat ini juga masih memperlihatkan efek analgesiknya.

Penelitian sebelumnya dilakukan pada mencit yang diinduksi karagenan menunjukkan bahwa minyak ikan dapat menurunkan nyeri dan inflamasi dibandingkan dengan aspirin [13]. EPA dan DHA yang terkandung dalam minyak ikan dapat memberikan efek analgesik dan antiinflamasi pada penelitian yang dilakukan terhadap mencit. Suplemen EPA dan DHA yang diberikan pada mencit yang mengalami cedera saraf tibialis menunjukkan penurunan nyeri [14]. Penelitian lain yang mendukung adalah DHA memiliki efek analgesik kuat dalam mencegah nyeri kronik [15].

## ■ Kesimpulan

Minyak ikan salmon mempunyai aktivitas analgesik terhadap mencit putih (*Mus musculus*) jantan galur BALB/C dengan metode *hot plate*.

## ■ Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan pada Prodi Farmasi Universitas Hang Tuah atas bantuan dana penelitian ini.

## ■ Daftar Pustaka

- [1] Guyton dan Hall. 2014. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi keduabelas. Singapura: Elsevier.
- [2] Corey R, Schilling A, Leonard M, Eghtesad B. 2010. Acetaminophen: Old Drug, New Warnings. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. Vol. 77. No.1.
- [3] Dianne, Yusri., Yorva Sayoeti & Marlia Moriska. 2015. Kelainan Hati Akibat Penggunaan Antipiretik. *Jurnal Kesehatan Andalas*. No.4.
- [4] Carlos, H. 2017. The Use of Omega-3 PUFAS in Pain Therapy. *Journal of Pharmacology and Clinical Research*. Vol.3.
- [5] Nobre, et al. 2013. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid exert anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents at low doses. *Nutrition research* 33. 422–433.
- [6] Martiningsih. 2012. Penggunaan Terapi Komplementer Fish Oil dalam Menurunkan Nyeri Akibat Inflamasi Pada Rheumatoid Arthritis. *Jurnal Kesehatan Prima*. Vol. 6 No. 2
- [7] Faizah AK, Kresnamurti A. 2019. Evaluation of Antiinflammatory Activity of Marine Omega-3 in Rats. *Indonesian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2(2):1-5.
- [8] Lien EJ. SAR. 1987. Side Effect and Drug Design. NewYork: Marcel Dekker Inc.
- [9] Vogel, G. H. 2008. *Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [10] Nobre, et al. 2013. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid exert anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents at low doses. *Nutrition research* 33: 22–433.
- [11] Faizah AK, Andhiarto Y, Riwanti P. 2019. In Vivo Analgesic Activity of Omega-3 on Mice Induced Peripheral Pain. *Biomed Pharmacol J*. 12(2): 961-3. Available from: <https://bit.ly/2IO1Ss5>
- [12] Nakamoto K, Nishinaka T, Mankura M, Fujita-Hamabe W, Tokuyama S. (2010). Antinociceptive effects of docosahexaenoic acid against various pain stimuli in mice. *Pharm Biol* Vol. 33.
- [13] Zadeh-Ardabili PM, Rad SK. 2019. Anti-pain and anti-inflammation like effects of Neptune krill oil and fish oil against carragenan induced inflammation in mice models: Current statues and pilot study. *Biotechnology Reports*. Biotechnology Reports. Volume 22: e00341, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00341>.
- [14] Zillioux J, Chamessian A, Mauck M, Buchheit T, Van de Ven TJ (2016, 19 Februari). *Oral Supplementation with omega-3 fatty acids docosahexaenoic and eicosapentaenoic attenuates mechanical allodynia in a mouse model of peripheral nerve injury*. Dikutip 28 Januari 2020 dari Sciencematters: <https://sciencematters.io/articles/201602000029>
- [15] Zhang L, Terrando N, Xu Z, Bang S et al. 2018. Distinct Analgesic Actions of DHA and DHA-Derived Specialized Pro-Resolving Mediators on Post-operative Pain After Bone Fracture in Mice. *Frontiers in Pharmacology*. 9:412