

**BAB 2****TINJAUAN PUSTAKA****2.1 Retinoid**

Vitamin A dan derivatnya (retinoid) adalah suatu zat yang esensial diperlukan untuk pertumbuhan dan diferensiasi sel pada saluran makanan, pernafasan, kulit, tulang, sistem syaraf, sistem imune dan haematopoises. Vitamin A juga berperan dalam sistem reproduksi, sintesis protein dan RNA (Sharon, 2000).

Defisiensi vitamin A akan menghambat sintesa protein dengan akibat terjadi gangguan terhadap pertumbuhan tulang, bentuk tulang tidak normal, sehingga mengganggu pertumbuhan tubuh secara keseluruhan (Almatsier, 2005).

Menurut Lesson (1996) bahwa asam retinoat berfungsi seperti hormon steroid yang mendorong pertumbuhan dan deferensiasi normal jaringan epitel, mengoptimalkan pertumbuhan tulang dan meningkatkan perkembangan janin. Hormon ini berikatan dengan nucleus pada sel target dan kompleks asam retinoat berikatan dengan elemen respon di DNA yang kemudian akan merangsang transkripsi gen. Protein yang dihasilkan oleh gen diaktifkan oleh asam retinoat yang berperan menimbulkan efek vitamin A pada pertumbuhan, diferensiasi, reproduksi dan perkembangan janin.

Vitamin A berperan dalam mengatur permeabilitas membran yang meliputi seluruh sel maupun membran struktural yang membentuk organel di dalam sel, kekurangan atau kelebihan vitamin A akan mengganggu stabilitas dari membran (Ganiswara, 1997).

Vitamin A konsentrasi tinggi atau konsumsi sepuluh kali lebih dari Recommended Dietary Allowance (RDA) dapat menimbulkan keracunan dan efek teratogenik. Vitamin A yang sering menimbulkan efek teratogenic adalah retinoid acid dan hasil metabolismentya yaitu : *all-trans-retinoic acid* (*alltrans-RA*), *13-cis-retinoic acid* (*13-cis-RA*), dan *13-cis-4-oxoretinoic acid* (*13-cis-4-oxo-RA*) (Vliet, 2001).

Karotenoid adalah zat prekursor vitamin A. Semua prekursor vitamin A merupakan zat organik yang berwarna kuning, orange dan merah, tetapi sering warna karoten ini ditutupi oleh warna hijau dari klorofil, sebab karoten dan klorofil berada bersamaan pada organel klorofil dan keduanya mempunyai hubungan fungsional dalam proses fotosintesis. Karotenoid tidak menimbulkan keracunan, disamping itu karotenoid yang terserap tidak diubah menjadi vitamin A tetapi disimpan dalam bentuk lemak, sehingga bila lemak di bawah kulit banyak mengandung karotenoid akan berwarna kekuningan (Almatsier, 2005).

### **2.1.1 Sumber Vitamin A dan Kebutuhan**

Retinol ditemukan dalam makanan hewani yang berlemak, karena hewan menyimpan retinol didalam hati, selain itu vitamin A juga bisa ditemukan dalam mentega, susu, keju, telur dan ikan yang berminyak. Sedangkan sumber karotenoid terdapat dalam sayuran terutama wortel dan sayuran yang berwarna hijau tua dan buah-buahan yang berwarna kuning (Sherington, 1994).

Kebutuhan vitamin A yang dianjurkan untuk wanita perhari adalah 500 RE dan untuk pria adalah 600 RE. Dosis karotane yang diperlukan kurang lebih dua kali dosis Vitamin A. (Ganiswara, 2005). Sedangkan RDA menganjurkan

pemakaian untuk wanita dewasa 800 RE dan pria dewasa adalah 1000 RE yang setara dengan 1mg retinol, dan untuk wanita hamil dianjurkan antara 700-1000 RE. Kadar normal vitamin A dalam plasma ialah 100-230 unit / 100 ml. Bila cadangan di hati cukup, kadar normal akan dipertahankan dan penurunan terjadi kalau persediaan vitamin A dalam hati sudah berkurang. Gejala defisiensi vitamin A timbul bila kadar di bawah 10-20 unit / 100 ml (Hoffman, 2000).

### **2.1.2 Penyimpanan Vitamin A**

Vitamin A yang diserap akan disimpan dalam bentuk palmitat atau ester asam lemak di dalam hati (Linder, 1992). Dari jumlah penyimpanan 90 % (Okita, 1997), lebih kurang 80% disimpan dalam sel-sel stelata perisinoidal dan semua vitamin A hepatic dalam bentuk rantai panjang retinil ester (Combs, 1992, dan Hennekes, 1996). Dalam keadaan normal cadangan vitamin A bertahan hingga enam bulan. Bila tubuh kekurangan vitamin A, asam retinoat dimobilisasi dari hati.

### **2.1.3 Transport dan Metabolisme**

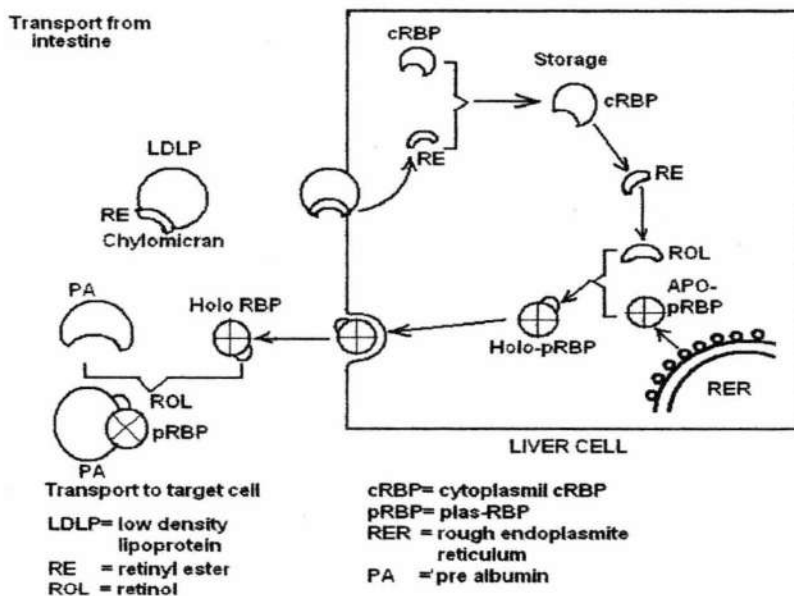
Didalam tubuh efisiensi penyerapan dan transport vitamin A serta karotenoid dipengaruhi adanya lemak, protein, cairan empedu, dan komponen normal dari enzim pankreas dalam lumen usus dan kesempurnaan sel-sel mukosa usus (Ganiswara, 2005).

Vitamin A dalam makanan sebagian besar dalam bentuk ester retinil setelah masuk lambung bersama lipid yang ada dilambung dan mukosa usus halus ester retinil dihidrolisis oleh enzim pankreas esterase menjadi retinol. Kemudian retinol didalam mukosa usus halus bereaksi dengan asam lemak dan membentuk

ester dengan batuan cairan empedu untuk dapat diserap oleh sel-sel vili dinding usus halus bagian proksimal untuk kemudian diangkut dengan kilomikron melalui sistem limfe kedalam aliran darah menuju ke hati (Almatsier, 2005). Garam empedu diperlukan dalam proses ini karena akan meningkatkan penyerapan vitamin A. Penyerapan ini adalah penyerapan aktif yang memerlukan energi dari ATP (Ganiswara, 2005).

Dengan konsumsi lemak yang cukup hanya sekitar 80-90 % ester retinil dan 40-60 % karotenid dapat diabsorpsi. Bila tubuh memerlukan vitamin A akan dimobilisasi dari hati dalam bentuk retinol yang diangkut oleh *retinol binding protein* (RBP) yang disintesis di hati. Pengambilan retinol oleh berbagai sel tubuh bergantung pada receptor pada permukaan membran yang spesifik untuk RBP. Kemudian retinol diangkut melalui membran sel untuk kemudian diikatkan pada *cellular retinol binding protein* (CRBP) setelah itu RPB dilepaskan kembali. (Almatsier, 2005)

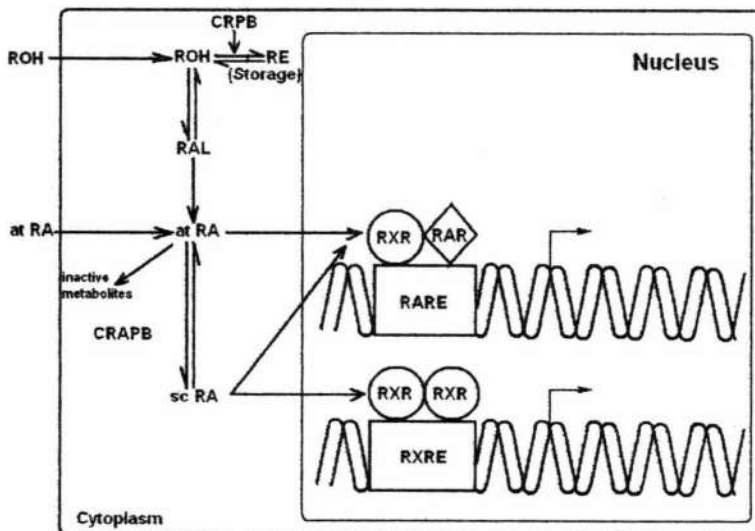
#### Proses Penimbunan Vitamin A dalam Sel Hati



Gambar 2.1. Transport vitamin A (Almatsier, 2005)

Ada tiga binding protein yaitu di ekstra seluler, sitoplasma dan nukleus, adapun yang berada di sitoplasma adalah CRBP I, II dan CRABP I, II dan dua famili retinoid reseptor yang ada di nukleus adalah RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) serta RXR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) dimana kedua reseptor nukleus ini juga berfungsi untuk hormon steroid, vitamin D dan retinoid itu sendiri (Tzimas and Nau, 2001).

Salah satu aktivitas retinoid adalah mengikat reseptor nukleus yaitu RARs dan RXRs. Reseptor heterodimer berikatan dengan DNA *retinoid acid response element* (RARE) pada gene target (Mangelsdorf, 1995). Di dalam nukleus dengan adanya all-trans retinoid acid dan 9-cis-retinoid acid, RXR / RAR heterodimer akan berikatan dengan retinoid acid receptor elemen (RAREs) dan akan berperan dalam transkripsi gen, bila DNA tidak berikatan dengan receptor akan menghambat ekspresi gen (Tzimas and Nau, 2001).



Gambar 2.2. Model mekanisme metabolisme retinoid dengan Retinoid reseptor melalui respon retinoid asid elemens (Mangelsdorf, 1995)

## 2.2 Kelebihan Retinoid

Hipervitaminosis A terjadi bila mengkonsumsi vitamin A secara berlebihan, sebaliknya kelebihan mengkonsumsi  $\beta$ -karotene tidak menimbulkan gejala, tetapi kulit akan berwarna kuning (*hiperkerotenemia*). Kondisi ini tidak menimbulkan gejala klinik, hanya mengganggu estetika. Dengan dihentikanya konsumsi  $\beta$ -karotin, warna kuning akan hilang dengan sendirinya (Almatsier, 2005).

Embrio mencit yang terpapar vitamin A dalam dosis tinggi dan akan menyebabkan kelainan (Shenelfet, 1972). Beberapa penelitian yang dilakukan pada hewan coba didapatkan bahwa retinoid dosis tinggi yang diberikan pada masa organogenesis menunjukkan adanya kelainan pada anggota (Kochhar, 1973). Retinoid juga menyebabkan perubahan proliferasi sel (Kochhar, 1985) dan perubahan adhesi sel (Kwasigroch and Kochhar, 1980), meningkatkan apoptosis (Zakeri and Ahuja, 1994) dan menurunkan kondrogenesis pada pertumbuhan tunas anggota (Kwasigroch, 1986). Retinol juga menghambat pertumbuhan anggota dan kondrogenesis serta menstimulasi terjadinya apoptosis pada anggota selama masa organogenesis (Ali-Khan dan Hales, 2006) dan retinoid menyebabkan perubahan gen sehingga menyebabkan kecacatan (Qin, 2002 dan Williams, 2004).

Vitamin A yang berlebihan akan mengaktifkan lisosom untuk melepas protease yang berakibat akan menurunkan komponen protein struktural pada matrix tulang rawan dan mengakibatkan hilangnya mukopolisakarida (Goodman and Gilman, 1985).

Pemberian vitamin A secara oral dengan dosis 25 atau 50 mg/kg/BB pada mencit dengan usia kebuntingan 8,5 sampai 10,5 menimbulkan kelainan pada

ekor, kelainan tulang rangka dan semua embrio mengalami kelainan *craniofacial*, *exencephaly*, *spina bifida* dan tidak terbentuk daun telinga (Okuda, 2003). Sedangkan pemberian vitamin A oral dengan dosis 60 mg/kg/BB pada mencit dengan umur kebuntingan 2-16 hari, didapatkan malformasi pada fetus mencit seperti *anencephaly*, bibir dan langit-langit terbelah dan kelainan pada mata (Tzimas and Nau, 2001).

Hasil metabolit asam retinoat yang sering menimbulkan kecacatan pada manusia adalah 13-cis-RA dan etretinate terutama pada kehamilan trimester pertama. Kelainan yang sering ditimbulkan adalah abortus spontan, persalinan prematur, kelainan pada otak, hati, *craniofasial* dan kelenjar timus (Tzimas and Nau, 2001).

### 2.3 Khitosan

Saat ini budidaya udang telah berkembang dengan pesat sehingga udang dijadikan komoditas ekspor non migas yang dapat diandalkan dan merupakan biota laut yang mempunyai nilai ekonomis tinggi. Udang seringkali dimanfaatkan sebagai bahan maknanan yang memiliki nilai gizi tinggi. Udang di Indonesia pada umumnya diekspor dalam bentuk beku yang telah dibuang kepala, ekor dan kulitnya. Limbah udang dapat dimanfaatkan menjadi senyawa khitosan. Namun sampai saat ini limbah tersebut belum diolah dan dimanfaatkan secara maksimal sehingga menyebabkan pencemaran lingkungan khususnya bau dan estetika lingkungan yang sangat buruk.

Udang merupakan anggota filum Arthropoda, sub filum Mandibulata dan tergolong dalam kelas Crustacea (Jasin, 1987). Seluruh tubuh terdiri dari

ruas-ruas yang terbungkus oleh kerangka luar atau eksoskeleton dari zat tanduk atau khitin dan diperkuat oleh bahan kapur kalsium karbonat (Soetomo, 1990).

Sebagian besar limbah udang yang dihasilkan oleh usaha pengolahan udang berasal dari kepala, kulit dan ekornya. Kulit udang mengandung protein (25%-40%), khitin (15%-20%) dan kalsium karbonat (45%-50%) (Margarof, 2003). Kandungan khitin dari kulit udang lebih sedikit dibandingkan dengan kulit atau cangkang kepiting. Kandungan khitin pada limbah kepiting mencapai 50-60%, sementara limbah udang menghasilkan 42-57%, sedangkan cumi-cumi dan kerang masing-masing menghasilkan 40% dan 14%-35%. Namun karena bahan baku yang mudah diperoleh adalah udang, maka proses khitin dan khitosanya lebih banyak memanfaatkan limbah udang (Anonim, 2003).

Tercatat bahwa produksi udang Indonesia rata-rata meningkat 7,4% per tahun. Pada tahun 2001 produksinya mencapai 633.681 ton. Dengan asumsi laju peningkatan produksi tetap, maka pada tahun 2004 potensi udang diperkirakan sebesar 785.025 ton. Dari jumlah itu 60-70 persen menjadi limbah, dan melalui proses demineralisasi dan deproteinisasi dengan rendemen 20 persen akan menghasilkan khitin sebesar 157.005 ton. Dan dari proses deasetilasi khitin dengan rendemen 80 persen akan dihasilkan khitosan sebesar 125.604 ton (Prasetyo, 2004).

Isolasi khitin dari limbah udang/rajungan dilakukan secara bertahap yaitu tahap pemisahan mineral (demineralisasi), tahap deproteinasi, tahap pemutihan (*bleaching*) dan transformasi khitin menjadi khitosan (tahap deasetilasi) dengan basa konsentrasi tinggi (Ferrer, 1996; Fahmi, 1997). Melalui teknologi yang tepat, potensi limbah ini dapat diolah lebih lanjut menjadi senyawa polisakarida, di



dalamnya termasuk khitin ( $C_8H_{13}NO_5$ ) dan khitin ini dapat diolah lebih lanjut menjadi khitosan ( $C_6H_{11}NO_4$ ) serta glukosamin ( $C_6H_{13}NO_5$ ). Ketiganya mempunyai sifat mudah terurai dan tidak beracun sehingga sangat ramah terhadap lingkungan (Martin, 2004).

Perbedaan antara khitin dan khitosan didasarkan pada kandungan nitrogennya. Bila nitrogen kurang dari 7%, maka polimer disebut khitin dan apabila kandungan total nitrogennya lebih dari 7% maka disebut khitosan (Zakaria, 2000). Khitin mempunyai sifat hidrofobik sehingga aplikasi terbatas dengan dilakukan deasetilasi dalam larutan NaOH pekat menjadi khitosan yang bersifat hidrofilik sehingga aplikasi menjadi lebih luas.

Khitosan yang mempunyai rumus kimia  $\beta$ -1,4-2 amino-2 dioksi-D-glukosamin (Hirano, 1976) merupakan senyawa yang tidak berbentuk (*amorphous*), tidak larut dalam air, asam organik encer, alkali encer dan pekat, alkohol dan pelarut organik lainnya tetapi larut dalam asam-asam mineral pekat. Pelarut khitosan yang baik adalah asam asetat (Jawa : asam cuka) (Prasetyo, 2004).

Khitosan relatif lebih banyak digunakan pada berbagai bidang industri terapan dan industri kesehatan (Muzzarelli, 1986). Khitosan juga merupakan suatu polimer multifungsi karena mengandung tiga jenis gugus fungsi yaitu asam amino, gugus hidroksil primer dan sekunder, dengan adanya tiga gugus fungsi ini menyebabkan khitosan mempunyai kereaktifan kimia yang sangat tinggi (Tokura, 1986).

Khitosan mempunyai kemampuan untuk memperbaiki jaringan kondrosit dan tulang yang mengalami kerusakan (Masashi, 2004). Khitosan dan khitin juga mampu menghambat produksi *nitric oxide* (NO) (Shiaw, 2000). Merangsang

pembentukan matriks protein *extra celluler* dari osteoklas dan kondrosit pada manusia (Lahiji, 2002).

Sifat khas yang lain dari khitosan adalah kemampuannya untuk menurunkan LDL sekaligus meningkatkan HDL kolesterol dalam serum darah dan khitosan dapat mengekresi lemak sampai dengan 51% dibandingkan selulosa yang hanya 5-7% (Milanda, 2005).

Glukosamin adalah khitosan oligosakarida merupakan senyawa turunan khitosan dengan berat molekul kurang dari 5.000. Keuntungan dari glukosamin yaitu sifatnya lebih mudah larut dalam air sehingga mudah diabsorpsi usus dan cepat masuk dalam aliran darah. Juga mempunyai muatan positif kuat sehingga dapat berinteraksi dengan senyawa lain yang berlawanan muatannya (Tokura, 1995).

Glukosamin dan kondroitin sulfat merupakan bahan utama dari tulang rawan dan memegang peran penting dalam pembentukan dan perbaikan tulang rawan. Glukosamin juga merangsang sel tulang rawan untuk membentuk proteoglikan dan kolagen yang merupakan protein esensial untuk memperbaiki tulang rawan (Milanda, 2005).

## **2.4 Morfogenesis Tulang Rangka**

Sistem rangka berkembang dari mesoderm (lapisan somatik) paraksial dan lempeng lateral serta dari krista neuralis. Mesoderm paraksial membentuk sederetan balok-balok jaringan bersegmen pada masing-masing sisi tubal neuralis, yang dikenal sebagai somi di daerah kepala dan somit dari daerah oksipital ke kaudal (Sadler, 2000).

Somit berdeferensiasi menjadi bagian ventromedial, sklerotom, dan satu bagian dorsolateral dermomiometom. Pada akhir minggu keempat, sel-sel sklerotom menjadi polimorf dan membentuk jaringan yang longgar yang dikenal sebagai mesenkim. Ciri khas sel mesenkim adalah berdeferensiasi dan bermigrasi ke segala arah dan sel mesenkim ini dapat berubah menjadi fibroblas, kondroblas atau osteoblas (Rugh, 1968).

Kemampuan mesenkim untuk membentuk tulang tidak terbatas pada sel sklerotom saja, tetapi juga dilapisan mesoderm tubuh, membentuk tulang panggul dan bahu serta tulang panjang dari ekstremitas. Sel-sel krista neuralis di daerah kepala menjadi mesenkim dan turut membentuk tulang muka dan tengkorak. Pada beberapa tulang seperti tulang pipih tengkorak mesenkim langsung berdeferensiasi menjadi tulang, tetapi seperti kebanyakan tulang, sel mesenkim pertama-tama akan membentuk model tulang rawan hialin yang kemudian mengalami penulangan melalui penulangan endokondral (Sadler, 2000).

Pada embrio stadium awal, mesenkim ditemukan diantara organ embrio yang sedang tumbuh, dimana kemudian mesenkim berdeferensiasi menjadi berbagai struktur. Sel-sel mesenkim disebut juga jaringan penunjang primitive yang menumbuhkan *chondroblast* untuk membentuk kondrosit dan bahan dasar cartilage juga menumbuhkan osteoblast untuk membentuk osteosit dan bahan dasar tulang atau matriks tulang (Syahrur, 1994).

Rangka axial berdeferensiasi dari mesenkim serta dari mesoderm somit. Pada embrio usia 4 minggu, bagian ventromedial somit sel-selnya akan menyebar dan membentuk suatu masa sel yang disebut sklerotom. Sklerotom ini bergerak mendekati notokor, sklerotom akan menjadi tulang vertebrata dan tulang rusuk.

Mesenkim dari sklerotom adalah kelompok sel yang berpasangan di sepanjang notokor. Dimana kelompok sklerotom ini akan bergerak ke arah medial disekitar notokor yang akhirnya akan membentuk korpus vertebralis, kemudian ada kelompok yang bergerak ke arah dorsal mengitari tuba neuralis akan membentuk arcus vertebra, dan sekelompok lagi akan bergerak ke arah ventrolateral yang akan membentuk prosesus vertebralis yaitu prosesus transversalis dan prosesus spinosus disamping juga akan menjadi primordial dari tulang rusuk (Rugh, 1968).

Pada awal kehidupan fetal, untuk masa tertentu sebageian besar kerangka terdiri atas tulang rawan. Sel tulang rawan atau kondrosit merupakan sel besar yang menempati ruang didalam matrix yang disebut lakuna. Sedangkan matrix terdiri atas substansi dasar dan serat. Substansi dasar berbentuk jel terdiri atas kondromukoprotein, mukopolisakarida, lipid dan asam. Serat dalam matrix berupa serat kolagen halus, serat kolagen tebal dan panjang atau serat elastin. Berdasarkan serat yang ada tulang rawan dibedakan menjadi tulang rawan hialin, fibrosa dan elastis, adapun rangka embrio sebageian terbesar terdiri dari tulang rangka hialin ini (Bevelander, 1988).

Seperti jaringan ikat lainnya, tulang rawan berkembang dari mesenkim, pada tempat yang akan dibentuk tulang rawan sel mesenkim membentuk serat kolagen diletakan di substansi dasar atau matrix, sel ini yang disebut dengan kondroblas. Kemudian tiap sel membentuk lapisan matrix yang mengelilingi mereka dan membungkus dalam suatu lacuna, karena pertumbuhan dan perkembangan berjalan terus jumlah matrix diantara sel akan meningkat dan mendorong sel-sel itu jauh berpisah dalam bahan matrix yang relative lebih

banyak jumlahnya ini merupakan ciri khas tulang rawan dewasa atau kondrosit (Lesson, 1996).

Selama pertumbuhan janin tersebut cartilage memulai formasi dan kondensasi dari mesenkim sel, kemudian akan berubah menjadi kondrosit yang kemudian berdeferensiasi dan terjadi proliferasi, prehipertrofi dan hipertrofi selanjutnya sel-sel saling berinteraksi dan membantu proses kondroblas berdeferensiasi.

## 2.5 Mencit (*Mus musculus*)

Mencit yang digunakan sebagai binatang coba termasuk dalam kelas mamalia, Ordo : Rodensia, Famili : Muridae dan species : *Mus Musculus* (Jasin, 1984).

Mencit memiliki karakter yang lebih aktif pada malam hari dari pada siang hari. Mempunyai kemampuan hidup selama lebih kurang 2,5-3 tahun. Mencit tergolong hewan menyusui yang dapat dikawinkan pada umur 8 minggu, dengan lama kebuntingan 18-20 hari. Masa reproduksinya antara 2-14 bulan dengan siklus birahi (estrus) setiap 4-5 hari.

Masa estrus dapat diidentifikasi dengan apusan vagina pada masa proestrus lama 12 jam didapatkan sel kecil inti bulat, masa estrus lama 12 jam didapatkan sel-sel kornifikasi, masa metestrus lama 20 jam didapatkan sel kornifikasi dan leukocyt dan masa diestrus 57-60 jam didapatkan sel epitel dan leukocyt (Kusumawati, 2004). Mencit rata-rata melahirkan pada umur kebuntingan 19 hari dengan rata-rata jumlah anak 10 ekor dan menyusui anaknya selama 21 hari (Rugh, 1968).

Tidak ada hewan coba yang terbaik untuk uji teratogenik (Kusumawati, 2004), pemilihan mencit karena hewan ini mudah didapat dalam jumlah banyak karena mudah berkembang biak dan harganya murah. Perkembangan embrio mencit terjadi segera setelah terjadi fertilisasi pertumbuhan tulang terjadi awal usia kebuntingan 7½ hari. Sel mesenkim pada tahap ini sangat peka sehingga trauma pada sel ini akan mengganggu berlangsungnya kondrofikasi dan ossifikasi pada pertumbuhan selanjutnya.

Pertumbuhan tulang (kondrofikasi) dapat terlihat pertama kali pada awal usia kebuntingan 11 hari, dan pada hari ke 11½ terbentuk scapula, humerus dan ulna dari blastema yang kemudian mengalami kondrofikasi mulai umur kebuntingan 12½ hari, biasanya pertumbuhan ini terus berlangsung sampai terbentuk metacarpal. Pada saat ini saraf juga terbentuk bersama-sama dengan selesainya pembentukan tulang radius, ulna, dan verterbrae dari mesenkim. Kondrofikasi dan penulangan terjadi pada beberapa bagian terlihat sejak usia kebuntingan 14½ hari kemudian akan diikuti penulangan (*ossification*) secara keseluruhan pada usia kebuntingan 16 hari (Rugh, 1968).

Pertumbuhan tulang ataupun kelainan yang terjadi pada tulang rangka tergantung dari kondisi tulang rawan. Sel-sel mesenkim pada saat ini sangat peka terhadap trauma dari lingkungan, trauma yang terjadi pada awal usia kebuntingan 7½ hari dapat menyebabkan kerusakan pada sel mesenkim, sehingga akan mengganggu berlangsungnya kondrofikasi dan ossifikasi pada pertumbuhan selanjutnya.

Tulang rusuk anterior (thorasic) tumbuh pada usia kebuntingan 12 hari yang selanjutnya akan diikuti dengan pertumbuhan kepala. Juga pada potongan

parasagital embrio mencit pada saat ini terlihat pembelahan dan mesenkim vertebrae yang berasal dari sklerotome. Pada hari ke 12 ini adalah periode kritis pembentukan digit dari mesenkim menjadi tulang rawan. Pada hari ke 14 ossifikasi pada frontal dan zygomaticus dimulai. Pada usia kebuntingan 16 hari seluruh bagian skeletal sudah mengalami kondrifikasi, yang akan dilanjutkan dengan ossifikasi pada scapula, radius dan ulna.