

BAB 6

PEMBAHASAN

Pembahasan hasil penelitian ini dibedakan menjadi dua bagian yaitu kelainan rangka fetus mencit yang terdiri dari kelainan rangka aksial yang terdiri dari tulang supraoksipital, vertebra servikalis, vertebra torakalis, vertebra lumbalis, vertebra sakrokaudalis, rusuk, sternum dan kelainan rangka apendikular yang terdiri dari rangka anggota depan dan rangka anggota belakang, sedangkan kelambatan penulangan rangka fetus mencit terdiri dari jumlah tulang servikalis, jumlah tulang sakrokaudalis, jumlah tulang digit yaitu falanks distal, falanks medial, falanks proximal, metakarpal dan metatarsal serta tulang supra oksipital.

6.1 Kelainan Morfologis Rangka Aksial Fetus Mencit Akibat Pengaruh Khitosan

6.1.1 Kelainan Morfologi pada Kolumna Vertebralis

Pembentukan kolumna vertebralis dimulai pada usia kebuntingan 10 hari dimana pola kondensasi sel-sel mesenkim untuk pembentukan kolumna vertebralis sudah terbentuk tetapi dengan terpaparnya asam retinoat dosis tinggi akan menghambat proliferasi sel-sel mesenkim untuk membentuk kolumna vertebralis secara sempurna. Hal ini sesuai dengan pendapat Kochlar (1985) bahwa asam retinoat juga menyebabkan perubahan proliferasi sel dan perubahan adhesi sel (Kwasigroch and Kochlar, 1980).

Selain itu usia kebuntingan 9-10 hari adalah usia kebuntingan dari mencit yang paling rentan terhadap terjadinya kelainan kolumna vertebralis. Pada usia kebuntingan 10 hari terjadi proliferasi dari migrasi sel-sel skeleton mengelilingi

notokord. Dengan adanya asam retinoat akan menghambat proses proliferasi dan adhesi sehingga mitosis dan migrasi sel akan terhambat.

Rerata kelainan morfologi dari vertebra servikalis, vertebra torakalis, vertebra lumbalis dan vertebra sakrokaudalis persentase tertinggi kelainan terjadi pada vertebra lumbalis yaitu 17,9%. Kelainan yang terjadi yaitu dengan tidak terbentuknya vertebra lumbalis (absent dan rudimenter) yang bila terbentuk sempurna berjumlah 6 ruas tulang. Tetapi bila dilihat dari rata-rata persentase fetus yang mengalami kelainan pada vertebra lumbalis setelah diberi perlakuan khitosan 15 mg/kg/BB, 30 mg/kg/BB dan 45 mg/kg/BB, pemberian perlakuan dengan dosis 30 mg/kg/BB dan 45 mg/kg/BB mengalami penurunan bila dibandingkan dengan kontrolnya.

Sesuai dengan hasil analisis pemberian khitosan tidak berpengaruh terhadap pengurangan kelainan morfologi rangka fetus mencit. Khitosan berperan terhadap proses proliferasi sel, seperti diketahui khitosan yang mempunyai rumus kimia β -1,4-2 amino-2 dioksi-D-glukosamin yang mampu merangsang proliferasi dan diferensiasi sel-sel mesenkim (Hirano, 1976). Sedangkan glukosamin merupakan unsur pembentuk hialuronat yang mempunyai konsentrasi tinggi di dalam jaringan embrio (Murray, 1996). Hialuronat mempunyai kemampuan tinggi di dalam mengikat fibronektin di dalam plasma darah. Dengan terikatnya fibronektin ini akan membantu stabilitas dari *Extra Cellular Matrix* (ECM). Selain itu fibronektin berperan dalam perbaikan jaringan migrasi dan adhesi sel (Downie, 1995).

Dengan kemampuan khitosan seperti tersebut di atas seharusnya khitosan mampu mengurangi kelainan morfologi rangka fetus mencit. Sehingga diduga

belum diketemukannya dosis yang efektif di dalam mengurangi atau menghambat kelainan morfologi yang disebabkan oleh pemberian asam retinoat.

Untuk dapat menentukan dosis yang tepat harus diketahui potensi relatif farmakologi dan efikasi maksimal suatu zat dalam kaitannya dengan efek terapiutik yang diharapkan. Keefektifan suatu zat tidak tergantung pada potensinya tetapi pada efikasi maksimalnya dan kemampuan mencapai sel target. Hal ini sangat tergantung pada cara pemberian, penyerapan, distribusi di dalam tubuh dan klirens dari darah serta titik tangkap kerja (Katzung, 2001).

6.1.2 Kelainan Morfologi pada Tulang Rusuk

Berdasarkan Gambar 5.6 pemberian asam retinoat dosis 60 mg/kg/BB menyebabkan kelainan pada rusuk dengan rata-rata 7,7% (kontrol). Sedangkan pada kelompok perlakuan baik pada dosis khitosan 15 mg/kg/BB, 30 mg/kg/BB maupun dosis 45 mg/kg/BB tidak ditemukan kelainan pada rusuk.

Sedangkan kelainan pada kontrol sebesar 7,7% adalah adanya ekstra ribs (2,4%), short ribs (3,6%), rudimenter/absent (1,8%) dan sebagian kecil poorly ossifikasi. Kelainan pada rusuk ini diduga disebabkan gangguan mekanisme penyusunan sel mesenkim dari sklerotum yang terganggu akibat induksi asam retinoat secara berlebih, sehingga pembentukan sklerotum untuk menjadi rusuk terganggu. Menurut Rugli (1968) jumlah rusuk torakalis adalah 13 pasang.

Perlakuan pada P₁, P₂ dan P₃ tidak menunjukkan perbedaan nyata ($p > 0,05$) terhadap kelainan rusuk fetus mencit baik antar kelompok perlakuan maupun dengan kontrol. Meskipun demikian penurunan rerata antar kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan menunjukkan khitosan diduga berperan dalam memperbaiki sel-sel mesenkim yang rusak karena khitosan mempunyai kemampuan untuk membantu

proses penyembuhan luka (Downie, 1995). Selain itu khitosan juga mempunyai potensi di dalam memperbaiki jaringan tulang dan gangguan kondrogenesis (Wiley, 2000).

6.1.3 Kelainan Morfologi pada Sternum

Berdasarkan Gambar 5.9 rerata kejadian kelainan pada sternum fetus mencit yang disebabkan oleh pemberian asam retinoat sebagai kontrol adalah 38,0%. Kelainan ini berupa asimetris (30,8%) dan bifurkasio (7,1%).

Hal ini diduga disebabkan karena adanya pengaruh pemberian asam retinoat pada induk mencit pada usia kebuntingan 10 hari dan usia kebuntingan 10 hari adalah usia kehamilan yang paling peka. Vitamin A dari derivatnya (retinoid) adalah suatu zat yang essensial diperlukan untuk pertumbuhan dari differensiasi sel (Sharon, 2000).

Kelainan asimetris dan bifurcatio diduga karena asam retinoat menghambat differensiasi sel-sel mesoderm somatik sehingga pembentukan pita sternum pada sisi kanan dan kiri garis tengah sternum terganggu.

Pemberian perlakuan dengan khitosan dengan dosis 15 mg/kg/BB, 30 mg/kg/BB dan 45 mg/kg/BB tidak menunjukkan penurunan kelainan seiring dengan peningkatan dosis khitosan. Pada pemberian dosis 45 mg/kg/BB terjadi penurunan persentase dibandingkan dengan kontrol, hal ini diduga disebabkan oleh dosis khitosan 45 mg/kg/BB mempunyai kemampuan meningkatkan redifferensiasi kondrosit dengan meningkatkan ekspresi protein kinase Ca (PKCa) dan p38 mitogen activated protein (MAP) (Lee, 2007). Protein kinase Ca (PKCa) adalah fosfolipid yang berperan di dalam intra seluler signaling pathway, pertumbuhan tulang di dalam endochondral dipertahankan adanya koordinasi antara proliferasi dan hipertrofi saat

terjadi diferensiasi. p38 mitogen activated factor juga berperan di dalam hipertrofi dan diferensiasi dengan merangsang transkripsi dan juga berkurangnya zone siaco protein. Keadaan ini diduga karena belum diketahui dosis efektif di dalam menghambat kelainan morfologi sternum pada fetus mencit atau faktor yang lain yang belum diteliti dalam penelitian ini.

6.1.4 Tulang Supra Oksipital

Pada tulang supra oksipital baik pada kontrol maupun pada perlakuan P₁, P₂ maupun P₃ tidak terdapat kelainan akibat induksi asam retinoat. Tulang supraoksipital fetus mencit mulai mengalami kondrofikasi dan ossifikasi pada usia kebuntingan 16 hari (Rugh, 1968).

Pemberian asam retinoat pada usia kebuntingan 10 hari dan 1 jam kemudian diberikan khitosan tidak mempengaruhi terhadap pembentukan tulang supra oksipital. Tulang supra oksipital tumbuh sempurna dengan penyatuan dua pusat penulangan dengan ukuran yang normal.

6.1.5 Kelainan Morfologi Rangka Apendikular (Rangka Anggota Depan dan Rangka Anggota Belakang)

Pada penelitian ini persentase kejadian kelainan rangka anggota depan dan rangka anggota belakang fetus mencit setelah diberi asam retinoat dengan dosis 60 mg/kg/BB komponen falanks medial yang sering terjadi kelainan.

Pembuatan pola jari tergantung pada sel yang terletak di dasar anggota badan, pada tepi posterior yang disebut dengan zona aktivitas polarisasi (ZAP). Sel ini menentukan gradien morfogen yang melibatkan asam retinoat dan gen homeoboks untuk menghasilkan urutan jari yang normal (Sadler, 2000).

Pemberian asam retinoat dengan dosis 60 mg/kg/BB pada induk mencit dengan usia kebuntingan 10 hari akan mengikat retinoid acid receptor (RARs) secara berlebihan sehingga menyebabkan gangguan kelainan morfogenesis yang akhirnya menyebabkan kelainan dari rangka anggota (Kochhar, 1995).

Pemberian khitosan dosis 45 mg/kg/BB secara gavage pada induk mencit usia kebuntingan 10 hari menurunkan persentase kelainan rangka anggota mencit baik yang di depan maupun belakang.

Pembentukan anggota depan lebih awal yaitu hari ke-9 dibandingkan dengan rangka anggota belakang yang terbentuk pada hari ke-10. Pemberian khitosan yang mempunyai sifat *biocompatible* memperbaiki fungsi kondrosit dan osteoblast pada manusia sehingga khitosan dapat dipergunakan sebagai “tissue engineering” untuk memperbaiki kondrosit dan tulang yang mengalami gangguan (Lahiji, 2002).

Sedikit diketahui kemampuan khitosan di dalam memperbanyak kondrosit dan osteoblast pada manusia. Lahiji (2002) melakukan penelitian dengan mengkultur kondrosit dan osteoblast manusia pada khitosan 4% diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari didapatkan 90% dari kondrosit dan osteoblast masih bertahan hidup dan jumlah menjadi semakin bertambah.

6.2 Kelambatan Penulangan Fetus Mencit Akibat Pengaruh Khitosan

6.2.1 Kelambatan Penulangan Vertebra Servikalis dan Vertebra Sakrokaudalis

Kelambatan penulangan pada sentrum vertebra servikalis tampak nyata pada kontrol karena induksi asam retinoat 60 mg/kg/BB. Sentrum vertebra servikalis seharusnya sudah mengalami penulangan dengan sempurna pada usia kebuntingan 18 hari (Rugh, 1968).

Sentrum pada vertebra servikalis pada Gambar 5.6 tidak terbentuk penulangan baik pada kontrol maupun pada perlakuan. Sentrum vertebra servikalis pada hari ke-18 masih belum dapat diamati penulangannya karena fetus dikorbankan pada hari ke-18.

Menurut Rugh (1968) penulangan lengkung vertebra servikalis dimulai pada usia kebuntingan 14 hari. Adapun penulangan lengkung dan sentrum pada vertebra sakralis dimulai pada usia kebuntingan 16 hari. Vertebra kaudalis penulangan lengkung dimulai pada usia kebuntingan 17 hari dan penulangan pada sentrum vertebra kaudalis dimulai pada usia kebuntingan 16 hari.

Sentrum vertebra dibentuk dari sel-sel mesoderm yang berasal dari bagian sklerotum somit (Carlson, 1988).

Tahap paling awal dalam pembentukan sentrum vertebra adalah migrasi sel-sel dari bagian sklerotum somit membentuk kondensasi sel yang mengelilingi notokord dan bumbung neural dan membentuk blastema yang selanjutnya menjadi vertebra (Kent, 1983).

Sel-sel sklerotum dari masing-masing pasangan somit tersusun secara padat di bagian kaudal dan tersusun secara longgar di bagian kranial. Sel-sel sklerotum padat bermigrasi ke arah kaudal, sedangkan sel-sel sklerotum bagian longgar bermigrasi ke arah kranial.

Massa sel hasil migrasi yang berasal dari dua pasangan somit yang berurutan selanjutnya bersatu menempati posisi di antara dua miotom, untuk membentuk suatu bakal sentrum vertebra. Selanjutnya massa sel bakal sentrum vertebra meluas ke arah dorsal dan lateral untuk membentuk bakal lengkung vertebra dan rusuk (Carlson, 1988).

Wiley (1983) mengamati induksi asam retinoat terhadap kelainan kolumna verterbralis pada hamster yang diperlakukan pada usia kebuntingan 7 sampai 9 hari dengan dosis 80 mg/kg/BB. Didapatkan kelainan berupa vertebra yang tidak terbentuk, bentuk vertebra yang tidak teratur dan sentrum vertebra berfusi. Dari hasil pengamatan kelainan vertebra tersebut disebabkan karena pembentukan somit mengalami gangguan sehingga penyusunan sklerotum tidak sempurna dan perkembangan akhir akan menghasilkan kelainan vertebra.

Polimer H-acetylglucosamin adalah senyawa keturunan khitosan dari proses degradasi pemutusan molekul besar khitosan dengan enzim khitonase dan asam hyaluronidase yang diketahui berfungsi sebagai *Cartilage Tissue Engineering* dan mampu memperbaiki gangguan pada kondrogenesis.

Asam hyoluronidase juga dapat mengikat fibronectin sehingga kerusakan dari proteoglycan dapat dihambat dan kontrolisis tidak terjadi. Selain itu khitosan juga mampu meningkatkan ekspresi extra cellular matrix pada osteoblast dan kondrosit manusia dan juga meningkatkan kepadatan dari pada tikus percobaan (Kang, 2002).

6.2.2 Kelambatan Penulangan pada Anggota Depan dan Anggota Belakang

Tingkat penulangan pada falanks, metakarpal dan metatarsal dapat digunakan sebagai indikator keadaan perkembangan rangka secara umum (Taylor, 1986).

Pada penelitian ini rerata persentase kelambatan penulangan pada rangka anggota depan dan belakang yang menunjukkan kelainan terbanyak adalah falanks medial. Pada kontrol dapat dilihat pada Gambar 5.12 bahwa falanks medial untuk

rangka anggota depan kanan dan rangka anggota depan kiri reratanya masing-masing adalah 70,8% dan 83,3%.

Tunas anggota depan tumbuh pada usia kebuntingan 9 hari, sedangkan tunas anggota belakang baru tumbuh pada usia kebuntingan 10 hari (Rugh, 1968), sehingga tingginya persentase kelambatan tulang rangka anggota depan dan belakang adalah karena pada saat usia kebuntingan 9 dan 10 hari merupakan masa peka bagi pertumbuhan rangka anggota. Oleh karena itu induksi asam retinoat akan menyebabkan kelambatan penulangan pada rangka anggota. Masa organogenesis adalah masa kritis terhadap suatu zat yang bersifat teratogen (Underwood, 1999).

Sistem organ tertentu dapat memiliki satu atau banyak masa kepekaan (Sadler, 2000). Pembentukan alat tubuh (ektoderm, mesoderm dan endoderm) ada suatu saling ketergantungan, misalnya $X \rightarrow Y \rightarrow Z$ dan seterusnya. Z tidak akan terbentuk atau berkembang tanpa adanya Y begitu juga dengan X.

Apical ectoderm ridge (AER) terbentuk dari mesoderm bila mesoderm tidak terbentuk AER juga tidak akan terbentuk, yang akhirnya akan menghambat perkembangan rangka distal anggota berikutnya. Jika mesoderm anggota di bawah dihilangkan maka AER akan menyusul dan perkembangan anggota akan berhenti.

Disamping itu peran *fibroblast growth factor 8* (FGF 8) yang dihasilkan oleh intermediate mesoderm akan merangsang mesoderm untuk berproliferasi FGF 8 akan memicu keluarnya Sonic hedgehog (Shh) yang secara bersama-sama akan merangsang proliferasi dan diferensiasi.

Khitosan di antara bersifat biokompatibel artinya sebagai polimer alami tidak mempunyai efek samping, tidak beracun dan mampu berperan dalam pembentukan tulang.

Khitosan adalah polimer alami dari polisakarida dan mempunyai sifat *hydrogradable*, merupakan faktor yang sangat penting agar khitosan mudah diabsorpsi oleh jaringan sekitarnya. Selain itu khitosan mempunyai porositas yang tinggi dan ukuran pori yang adekuat untuk memfasilitasi pemberian nutrisi bagi sel dan difusi melalui semua struktur sel. Menurut Mardinally (1999) bahwa sifat porous khitosan dapat dimanfaatkan sebagai bahan perancah atau *scaffolds* dari *tissue engineering*.

Bahan perancah (*scaffold*) diperlukan untuk regenerasi jaringan dengan meningkatkan jumlah sel seperti rekonstruksi matrix ekstra seluler untuk mendukung proliferasi dan differensiasi sel dalam menghindari regenerasi jaringan meskipun faktor pertumbuhan (*growth factor*) selalu dibutuhkan untuk meningkatkan regenerasi jaringan.

Dengan digunakannya khitosan sebagai bahan perancah atau *scaffold* dalam tindakan *tissue engineering*, maka khitosan juga diduga mampu memperbaiki sel atau jaringan tulang yang mengalami kelainan atau hambatan penulangan akibat paparan asam retinoat. Jadi dapat disimpulkan bahwa khitosan dapat menghambat timbulnya kelainan morfologi dan kelambatan penulangan pada rangka fetus mencit yang telah terpapar oleh asam retinoat dengan jalan memperbaiki dan memacu regenerasi sel atau jaringan.