

TESIS

**PENGARUH HIPERVITAMINOSIS A PADA PERTUMBUHAN  
TULANG FEMUR ANAK MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK



**MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**RIAMI**

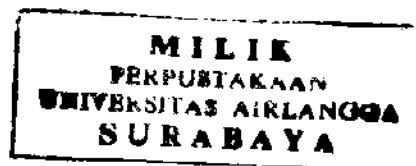
**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**2005**

**TESIS**

**PENGARUH HIPERVITAMINOSIS A PADA PERTUMBUHAN  
TULANG FEMUR ANAK MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK**



**RIAMI**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**2005**

**PENGARUH HIPERVITAMINOSIS A PADA PERTUMBUHAN  
TULANG FEMUR ANAK MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK**

**TESIS**

**Untuk memperoleh Gelar Magister  
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

**RIAMI**

**NIM. 090214758. M**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**2005**

**9 Agustus 2005**

Lembar Pengesahan


TESIS TELAH DISETUJUI  
PADA TANGGAL : 9 AGUSTUS 2005

Pembimbing Ketua



Abd. Kamid Iskandar, dr, MS  
NIP. 130 541 811

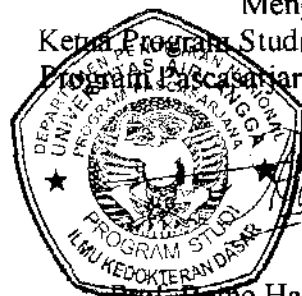
Pembimbing



Prof Ari Gunawan, dr, MS, Ph.D  
NIP. 130 531 759

Mengetahui :

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Prof Retno Handajani, dr, MS, Ph.D  
NIP. 130 541 984

Diuji pada

Tanggal 9 Agustus 2005

**PANITIA PENGUJI TESIS**

Ketua : M. Wirono Aman Santoso, dr, MS

Anggota : Abd. Kamid Iskandar, dr, MS  
Prof Ari Gunawan, dr, MS, Ph.D  
Subagio, dr, MS  
Chairul Anwar, drh, MS

## UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan memanjatkan puji syukur atas rahmat dan karunia Allah yang Maha Pengasih lagi Penyayang sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada H. Abdoel Kamid Iskandar dr, MS, sebagai pembimbing ketua yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Terimakasih sebesar-besarnya dan penghargaan setinggi-tingginya pula penulis ucapkan kepada Prof. H. Ari Gunawan, dr, MS, Ph.D, atas perkenanya menjadi pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran dan senantiasa memacu semangat belajar agar lebih maju dan lebih baik.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankan saya mengucapkan terimakasih kepada Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Med. H. Puruhito, dr, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Magister.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr, SpP atas kesempatan yang diberikan pada penulis untuk mengikuti Program Magister di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Prof. Retno Handajani, dr, MS, Ph.D yang selama ini telah membantu dalam kelancaran proses pelaksanaan ujian tesis.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Prof. Dr. HMS Wiyadi, dr,SpTHT atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Program Magister.

Ketua Bagian Anatomi-Histologi H. Abdoel Kamid Iskandar,dr, MS, yang telah memberi dorongan, semangat dan mengizinkan penulis mengikuti Program Pendidikan Magister.

Moch. Wirono Aman Santoso, dr, MS, Subagio, dr, MS dan Chairul Anwar, drh, MS yang telah memberikan bimbingan dan saran dengan tulus serta bersedia sebagai penguji.

Rektor Universitas Hang Tuah Prof. Dr. Sapto J. Poerwowidagdo, yang telah membcrikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Program Magister.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hang Tuah Sartono,dr, SpPD. yang telah banyak memberikan dorongan dan memberikan ijin untuk mengikuti Program Magister.

Kepada para staf pengajar dan karyawan pada bagian Anatomi - Histologi atas kerjasama dan dukungannya selama mengikuti pendidikan Program Magister.

Sahabat sekaligus teman-teman seperjuangan dalam mengikuti Program Magister Unair pada bagian Anatomi-Histologi angkatan tahun 2002: Anike, dr, Antonius Oktavian Ibo Ilambra Christianto Ngadji Foa, dr, Elieser, dr, Irianto Ramandey, dr, atas dukungan dan kerjasamanya selama pendidikan. Semoga kerjasama ini akan tetap terjalin di waktu-waktu mendatang.

Demikian pula kepada teman saya Agnes Supraptiwi Rahayu, dr, MKes dan Aries Dewobroto, SE, yang telah banyak membantu dalam penyelesaian tesis ini.

Seluruh keluarga, Bapak dan Ibu serta Mertua yang selalu mendoakan dan memberi dukungan.

Teristimewa dan yang tercinta suami, Sutaji, SE. atas dorongan semangat, pengertian dan pemahamannya yang luar biasa.

Semua sahabat dan rekan-rekan yang tidak dapat saya sebutkan satu-persatu, yang sangat membantu dan mendorong terselesaikannya tesis ini.



## RINGKASAN

### Pengaruh Hipervitaminosis A Pada Pertumbuhan Tulang Femur Anak Mencit (*Mus musculus*) Jantan

Riami

Pada umumnya masyarakat awam lebih memahami dampak dari kekurangan konsumsi berbagai jenis vitamin, dan sebaliknya pengetahuan mereka akan akibat kelebihanannya sangat rendah, meskipun secara medik dampaknya juga sangat berbahaya.

Di satu sisi vitamin A sangat penting bagi kesehatan mata, pertumbuhan, reproduksi, maupun sistem kekebalan tubuh, namun bila kadarnya berlebihan justru akan berdampak negatif antara lain dapat menghambat pertumbuhan tulang dan meningkatkan resiko patah tulang, yang disebabkan hambatan proliferasi kondrosit dan mengurangi sintesis dari RNA dan protein

*Retinoid acid* merupakan salah satu metabolit dari vitamin A, tidak disimpan dalam tubuh karena kurang beracun dari pada retinol dan retinal, tetapi tidak tanpa pengaruh yang serius pada tulang kalau dikonsumsi dalam jumlah yang banyak dalam waktu yang lama.

*Retinoid acid* menghambat pertumbuhan tulang melalui 3 mekanisme: yaitu 1) menghambat proliferasi kondrosit, 2) menghambat hipertropi kondrosit, 3) menghambat sintesis matriks tulang.

Tujuan penelitian ini, untuk membuktikan bahwa hipervitaminosis A menyebabkan gangguan pertumbuhan tulang femur. Dengan menggunakan variabel, panjang tulang femur dan jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi dan zona hipertrofi/ maturasi.

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *posttest only control group design* dengan hewan coba mencit (*Mus musculus strainBALB/C*) jantan, umur sekitar 3-4 minggu, sebanyak 40 ekor. Diberikan vitamin A berlebihan secara oral dalam bentuk emulsi dengan dosis, (1) 1/8LD<sub>50</sub> (160,62 IU)/grBB/hr, (2) 1/6LD<sub>50</sub> (214,16 IU)/grBB/hr, (3) 1/4LD<sub>50</sub> (321,25 IU)/grBB/hr, selama 9 hari. Dua hari setelah pemberian terakhir, hewan coba dikorbankan, tulang femur diambil, diukur panjangnya kemudian dibuat preparat histologis .

Data panjang tulang femur dan jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi dan zona hipertrofi/ maturasi dianalisis dengan Uji Anova dengan taraf kepercayaan 95%, dan dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference* (LSD).

Dari hasil penelitian dan pengolahan data secara analisis kuantitatif dapat disimpulkan pemberian Vitamin A dosis berlebihan dengan dosis 1/8 LD50, 1/6 LD50, 1/4 LD50 pada anak mencit jantan umur 3-4 minggu, selama 9 hari berturut-turut menyebabkan terjadinya penurunan secara signifikan ( $p < 0,05$ ) pada panjang tulang femur, dan penurunan secara signifikan ( $p < 0,05$ ) jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi serta zona hipertrofi/maturasi.

## SUMMARY

### The Effect of Hypervitaminosis A in Femoral Growth of Male Young Mice (*Mus musculus*)

Riami

Public generally have more knowledge on the effects of under-consumption of various vitamins. However, contrastingly, they have less knowledge on the effects of excessive vitamin consumption, although the medical effects are similarly hazardous. In one side, vitamin A is important for ocular health, growth, reproduction, and immune system. In the other side, if the concentration is excessive, it may induce negative effects, such as the inhibition of bone growth and increasing the risk of fracture, which results from the inhibition of chondrocyte proliferation and reduced RNA and protein synthesis.

Retinoic acid, one of vitamin A metabolites, is not stored in the body although it is less toxic than retinol and retinal. However, it is not without serious effects on bone if it is consumed excessively in a longer period. Retinoic acid inhibits bone growth by three mechanisms. First, it restrains chondrocyte proliferation and chondrocyte hipertrophy, and, finally, it inhibits bone matrix synthesis. The objective of this study was to prove that hypervitaminosis A resulted in femoral growth disorder. This study observed femoral length and chondrocyte counts in proliferation zone and hipertrophy/maturation zone.

This study used posttest only control group design involving 40 male mice (*Mus musculus* BALB/C strain), aged 3-4 weeks. Excessive vitamin A was given per oral in emulsion with the doses of (1) 1/8LD50 (160.62 IU/grBW/day, (2) 1/6LD50 (214.16 IU)/grBW/day, and (3) 1/4LD50 (321.25 IU)/grBW/day, for 9 days. Two days after the final administration, the animals were sacrificed to remove femoral bones. The length of the bones was measured, and histological preparations were made using HE staining. Data on femoral length and chondrocyte count in proliferation and hipertrophy/maturation zones were analyzed using Anova with confidence level of 95%, followed with Least Significant Difference (LSD) test.

Results of observation and data processing using quantitative analysis revealed that the administration of vitamin A in excessive dose of 1/8 LD50, 1/6 LD50, 1/4 and LD50 in young male mice for 9 consecutive days resulted in inhibited increase of femoral length and reduction of chondrocyte count in proliferation as well as hipertrophy/maturation zones.

## ABSTRACT

### **The Effect of Hypervitaminosis A in Femoral Growth of Male Young Mice (*Mus musculus*)**

**Riami**

Vitamin A is important for ocular health, growth, reproduction, and immune system. However, if the concentration is excessive, it may induce negative effects, such as the inhibition of bone growth and increasing the risk of fracture, which results from the inhibition of chondrocyte proliferation and reduced RNA and protein synthesis. Retinoic acid, one of vitamin A metabolites, is not stored in the body although it is less toxic than retinol and retinal. However, it is not without serious effects on bone if it is consumed excessively in a longer period. Retinoic acid inhibits bone growth by three mechanisms. First, it restrains chondrocyte proliferation and chondrocyte hypertrophy, and, finally, it inhibits bone matrix synthesis. The objective of this study was to prove that hypervitaminosis A resulted in femoral growth disorder. This study observed femoral length and chondrocyte counts in proliferation zone and hypertrophy/maturation zone.

This study used posttest only control group design involving 40 male mice (*Mus musculus* BALB/C strain), aged 3-4 weeks. Excessive vitamin A was given per oral in emulsion with the doses of (1) 1/8LD50 (160.62 IU)/grBW/day, (2) 1/6LD50 (214.16 IU)/grBW/day, and (3) 1/4LD50 (321.25 IU)/grBW/day, for 9 days. Two days after the final administration, the animals were sacrificed to remove femoral bones. The length of the bones was measured, and histological preparations were made using HE staining. Data on femoral length and chondrocyte count in proliferation and hypertrophy/maturation zones were analyzed using Anova with confidence level of 95%, followed with Least Significant Difference (LSD) test.

Results of observation and data processing using quantitative analysis revealed that the administration of vitamin A in excessive dose of 1/8 LD50, 1/6 LD50, 1/4 and LD50 in young male mice for 9 consecutive days resulted in inhibited increase of femoral length and reduction of chondrocyte count in proliferation as well as hypertrophy/maturation zones.

**Keywords:** *hypervitaminosis A, bone length, chondrocyte cells*

## DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan .....	i
Sampul Dalam .....	ii
Prasyarat Gelar .....	iii
Persetujuan .....	iv
Penetapan Panitia Penguji .....	v
Ucapan Terima Kasih .....	vi
Ringkasan .....	ix
Summary .....	xi
Abstract .....	xii
Daftar Isi .....	xiii
Daftar Tabel .....	xvi
Daftar Gambar .....	xvii
Daftar Lampiran .....	xviii

### BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.3.1 Tujuan umum .....	3
1.3.2 Tujuan khusus .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
1.4.1 Manfaat akademis .....	4
1.4.2 Manfaat terapan .....	4

### BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Vitamin A.....	4
2.1.1 Sumber vitamin A dan kebutuhan .....	7
2.1.2 Transport dan metabolisme vitamin A .....	9
2.1.3 Penyimpanan vitamin A .....	12

2.1.4 Pengaruh hormonal vitamin A .....	12
2.2 Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....	13
2.3 Hipervitaminosis A .....	16
2.4 Anatomi .....	19
2.5 Histologi .....	20

### **BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian .....	27
3.2 Hipotesis Penelitian .....	29

### **BAB 4 METODE PENELITIAN**

4.1 Rancangan Penelitian .....	30
4.2 Sampel dan Besar Sampel .....	31
4.3 Variabel Penelitian .....	32
4.3.1 Klasifikasi variabel .....	32
4.3.2 Definisi operasional .....	32
4.4 Bahan Penelitian .....	33
4.5 Alat Penelitian .....	33
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	34
4.7 Persyaratan Etik .....	35
4.8 Prosedur Pengambilan Data .....	35
4.8.1 Penentuan dosis .....	35
4.8.2 Pemilihan hewan coba .....	36
4.8.3 Metode penelitian .....	36
4.8.4 Pembedahan .....	38
4.8.5 Pengolahan jaringan .....	38
4.8.6 Pengecatan jaringan .....	41
4.9 Analisis Data .....	42

### **BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA**

5.1 Hasil Pengamatan Makroskopis .....	43
5.1.1 Panjang tulang femur .....	43

5.2 Hasil Pengamatan Mikroskopis .....	46
5.2.1 Jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi .....	47
5.2.2 Jumlah sel kondrosit pada zona hipertrofi .....	50
 <b>BAB 6 PEMBAHASAN</b>	
6.1 Pemberian Vitamin A Dosis Berlebihan terhadap Panjang Tulang Femur .....	55
6.2 Pemberian Vitamin A Dosis Berlebihan pada Jumlah Sel Kondrosit Zona Proliferasi .....	56
6.3 Pemberian Vitamin A Dosis Berlebihan pada Jumlah Sel Kondrosit Zona Hipertrofi /Maturasi .....	57
 <b>BAB 7 PENUTUP</b>	
7.1 Kesimpulan .....	59
7.2 Saran .....	59
 <b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	60
<b>LAMPIRAN</b> .....	65

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 : RDA vitamin A untuk Indonesia .....	9
Tabel 5.1 : Rata-rata dan simpangan baku panjang tulang femur .....	43
Tabel 5.2 : Ringkasan Anava panjang tulang femur setelah pemberian emulsi vitamin A .....	45
Tabel 5.3 : Ringkasan hasil uji BNT panjang tulang femur mencit setelah pemberian vitamin A selama 9 hari .....	46
Tabel 5.4 : Rata-rata dan simpangan baku jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi setelah diberi vitamin A selama 9 hari .....	47
Tabel 5.5 : Ringkasan Anova jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi setelah diberikan emulsi vitamin A selama 9 hari .....	49
Tabel 5.6 : Ringkasan hasil uji BNT jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi .....	49
Tabel 5.7 : Rata-rata dan simpangan baku sel kondrosit pada zona hipertrofi / maturasi .....	50
Tabel 5.8 : Ringkasan Anova jumlah sel kondrosit pada zona hipertrofi setelah diberikan larutan emulsi vitamin A selama 9 hari .....	52
Tabel 5.9 : Ringkasan Hasil uji BNT sel kondrosit pada zona hipertrofi .....	52



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Dua macam penggambaran unit Isopren .....	5
Gambar 2.2 : Retinol .....	6
Gambar 2.3 : Struktur kimia sekelompok vitamin A .....	6
Gambar 2.4 : $\beta$ - Karoten .....	8
Gambar 2.5 : Anatomi tulang femur .....	20
Gambar 2.6 : Pembentukan tulang panjang .....	23
Gambar 2.7 : Gambaran histologis dari potongan memanjang melalui <i>epifiseal plate</i> tulang panjang .....	24
Gambar 5.1 : Pengaruh pemberian vitamin A dosis berlebihan pada panjang tulang femur mencit jantan ( <i>Mus musculus</i> ) .....	44
Gambar 5.2 : Pengaruh pemberian vitamin A dosis berlebihan pada jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi .....	48
Gambar 5.3 : Pengaruh pemberian vitamin A dosis berlebihan pada jumlah sel kondrosit zona hipertrofi/maturasi .....	51

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Data kontrol dan perlakuan panjang tulang femur pada hewan coba setelah pemberian vitamin A berlebihan .....	65
Lampiran 2 : Hasil analisis Anova satu arah dan LSD pengaruh pemberian vitamin A berlebihan terhadap panjang tulang femur mencit jantan .....	66
Lampiran 3 : Data kontrol dan perlakuan gambaran histologis jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi pada garis pertumbuhan tulang .....	68
Lampiran 4 : Hasil analisis Anova satu arah dan LSD jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi pada mencit jantan .....	69
Lampiran 5 : Data kontrol dan perlakuan gambaran histologis jumlah sel kondrosit pada zona hipertrofi/maturasi pada garis pertumbuhan tulang femur .....	71
Lampiran 6 : Hasil analisis Anova satu arah dan LSD jumlah sel kondrosit pada zona hipertrofi/maturasi .....	72
Lampiran 7 : Gambaran mikroskopis .....	74
Lampiran 8 : Foto Kelompok Kontrol .....	75
Lampiran 9 : Foto Kelompok Perlakuan Vitamin A 1/8 LD <sub>50</sub> .....	77
Lampiran 10 : Foto Kelompok Perlakuan Vitamin A 1/6 LD <sub>50</sub> .....	79
Lampiran 11 : Foto Kelompok Perlakuan Vitamin A 1/4 LD <sub>50</sub> .....	81

BAB 1  
PENDAHULUAN



**1.1 Latar Belakang Masalah**

Dalam dunia kedokteran, berbagai fungsi vitamin A sudah dipelajari secara intensif selama bertahun-tahun yang lalu, sejalan dengan penelitian tentang dampak dari kekurangan (defisiensi) dan kelebihan (hipervitaminosis) pada manusia. Hingga saat ini, setidaknya diketahui ada 4 fungsi utama vitamin A yaitu (1) terkait dengan fungsi penglihatan (visual), (2) diferensiasi sel-sel epitel, (3) pertumbuhan dan (4) reproduksi (Linder, 1992).

Berbagai dampak defisiensi vitamin A (DVA) telah banyak dilaporkan, antara lain disebutkan bahwa DVA dapat mengakibatkan terjadinya, kebutaan dan *Bitot's spot* (Mimawati, 1977; Agus, 1995). Telah banyak diungkap bahwa DVA sering disertai penurunan imunitas pada anak, sehingga anak mudah terserang infeksi, antara lain ; bronchitis, pneumonia dan diare (Sommer, 1984; Muhilal, 2001).

Menurut Gooman, vitamin A (retinoid) dan analognya sering digunakan dalam manajemen klinik penanganan penyakit-penyakit dermatologi seperti akne (jerawat), psoriasis, ichthyosis, dan oncology (Liss, 1987).

Pada umumnya masyarakat awam lebih memahami dampak dari kekurangan konsumsi berbagai jenis vitamin, dan sebaliknya pengetahuan akan akibat kelebihan sangat rendah, meskipun secara medik dampaknya juga sangat berbahaya.

Pemberian megadosis vitamin-vitamin yang larut dalam air pada umumnya tidak membawa akibat yang buruk oleh sebab kelebihanannya akan diekskresikan oleh ginjal, tetapi lain halnya dengan kelompok vitamin yang larut dalam lemak seperti vitamin A, D, E dan K. Kelebihan vitamin-vitamin ini ditimbun dalam jaringan hingga dapat meracuni tubuh (Solihin, 2000).

Pemberian vitamin A yang berlebihan akan merupakan racun bagi tubuh. Keadaan demikian disebut hipervitaminosis A atau *vitamin A toxicity* (Solihin, 2000).

Di satu sisi vitamin A sangat penting bagi kesehatan mata, pertumbuhan, reproduksi, maupun sistem kekebalan tubuh, namun bila kadarnya berlebihan akan berdampak negatif antara lain dapat menghambat pertumbuhan tulang dan meningkatkan resiko patah tulang (Anonim, 2003).

Cacat bawaan berupa pemendekan tulang-tulang ekstremitas setelah pemberian vitamin A berlebih terjadi pada kehamilan hari ke-8 maupun ke-11. Hal ini sesuai dengan teori yang mengatakan bahwa cacat bawaan tersebut kemungkinan disebabkan oleh adanya hambatan proses kondrogenesis (Kochar, 1985 cit Wahyuni, 1991)

Mengingat pentingnya proses pertumbuhan tulang pada anak dan pubertas, kiranya perlu dicari informasi lebih lanjut untuk mengungkap sejauh mana peranan pemberian vitamin A dosis berlebihan terhadap proses pertumbuhan tulang.



## **1.2 Rumusan Masalah**

Atas dasar latar belakang yang telah dikemukakan, masalah yang diajukan adalah sebagai berikut :

1. Apakah pemberian vitamin A berlebihan pada masa pertumbuhan dapat mengakibatkan pemendekan tulang femur anak mencit jantan ?
2. Apakah pemberian vitamin A berlebihan pada masa pertumbuhan dapat mengakibatkan pemendekan zona proliferasi pada garis pertumbuhan tulang femur anak mencit jantan ?
3. Apakah pemberian vitamin A berlebihan pada masa pertumbuhan dapat mengakibatkan pemendekan zona hipertrofi/maturasi pada garis pertumbuhan tulang femur anak mencit jantan ?

## **1.3. Tujuan Penelitian**

### **1.3.1. Tujuan umum**

Tujuan umum dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian vitamin A pada masa pertumbuhan terhadap tulang femur anak mencit.

### **1.3.2. Tujuan khusus**

1. Mengetahui pengaruh pemberian vitamin A berlebihan pada masa pertumbuhan terhadap panjang tulang femur anak mencit jantan.
2. Mengetahui pengaruh pemberian vitamin A berlebihan pada masa pertumbuhan terhadap zona proliferasi dari garis pertumbuhan tulang femur anak mencit jantan.



3. Mengetahui pengaruh pemberian vitamin A berlebihan pada masa pertumbuhan terhadap zona hipertrofi/maturasi dari garis pertumbuhan tulang femur anak mencit jantan.

#### **1.4. Manfaat penelitian.**

##### **1.4.1. Manfaat akademik**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai acuan dalam upaya untuk :

1. Mengetahui adanya pengaruh hambatan pertumbuhan pada pemberian vitamin A berlebihan.
2. Mengetahui adanya pengaruh pemberian vitamin A berlebihan pada gambaran histologik pada zona-zona penulangan pada garis pertumbuhan.

##### **1.4.2. Manfaat terapan.**

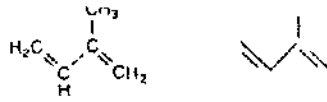
1. Sebagai bahan masukan dan pertimbangan agar produsen obat-obatan dalam memproduksi suplemen vitamin terutama vitamin yang larut dalam lemak senantiasa mencantumkan kandungan dari suplemen tersebut serta pengaruh negatifnya apabila dikonsumsi secara berlebihan.
2. Sebagai informasi bagi masyarakat agar tidak mengkonsumsi suplemen terutama vitamin A secara berlebihan serta mengetahui sisi buruk yang ditimbulkannya.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA.

#### 2.1 Vitamin A

Vitamin A adalah salah satu vitamin yang larut dalam lemak. Merupakan molekul hidrofobik apolar yang semuanya adalah derivat isoprene. Molekul-molekul ini tidak dapat disintesis oleh tubuh dalam jumlah yang memadai sehingga harus dipasok dari makanan. Pemasokan vitamin yang larut lemak memerlukan penyerapan lemak yang normal agar vitamin tersebut dapat diserap dengan efisien. Setelah diserap, molekul vitamin tersebut harus diangkut dalam darah seperti halnya lipid apolar yang lain, di dalam lipoprotein atau protein pengikat yang spesifik (Murray,2000).

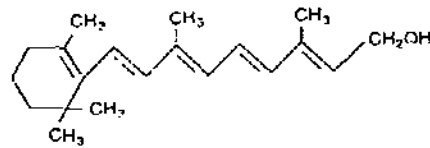


Gambar 2.1. Dua macam penggambaran unit Isopren (Murray, 2000)

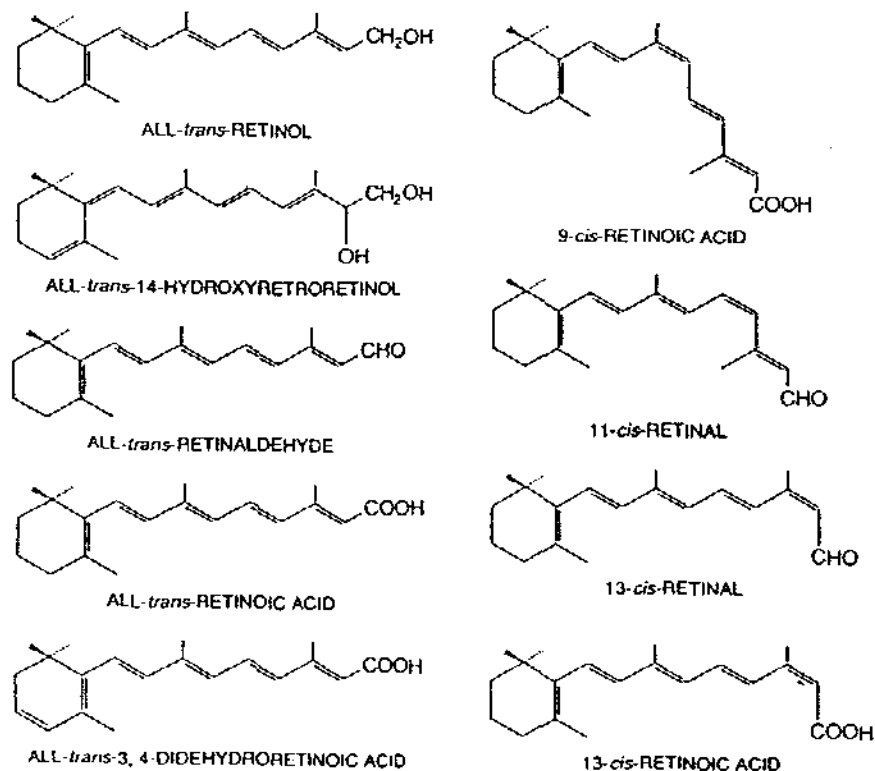
Vitamin A bisa ditemukan sebagai alkohol (retinol), sebagai aldehid (retinal), atau sebagai *acid (retinoid acid)* pada bentuk bebas atau telah mengalami esterifikasi dengan asam lemak contohnya sebagai vitamin A palmitat (Church *et al*, 1988).

$\beta$ -karoten merupakan provitamin A penting, dapat membentuk 2 molekul vitamin A, ditemukan pada semua bagian tanaman yang hijau dan sebagian besar

yang berwarna kuning, banyak terdapat dalam sejenis kol, bayam, dan wortel (Mutschler, 1991).



Gambar 2.2. Retinol (Vitamin A) (Murray, 2000)



Gambar 2.3. Struktur kimia sekelompok vitamin A (Combs, 1992)

Vitamin A, atau retinol, merupakan senyawa poliisoprenoid yang mengandung cincin sikloheksinil. Vitamin A merupakan istilah generik untuk semua senyawa dari sumber hewani yang memperlihatkan aktivitas biologik vitamin A. Hanya retinol yang memiliki aktivitas penuh vitamin A. Vitamin A terdiri dari beberapa



macam. Berdasarkan struktur kimianya terdapat sekelompok vitamin A, antara lain : *all-trans-retinol*, *13-cis-retinoic*, *acid-all-trans-3dehydroretinol*, *all-trans-retynil phosphate*.

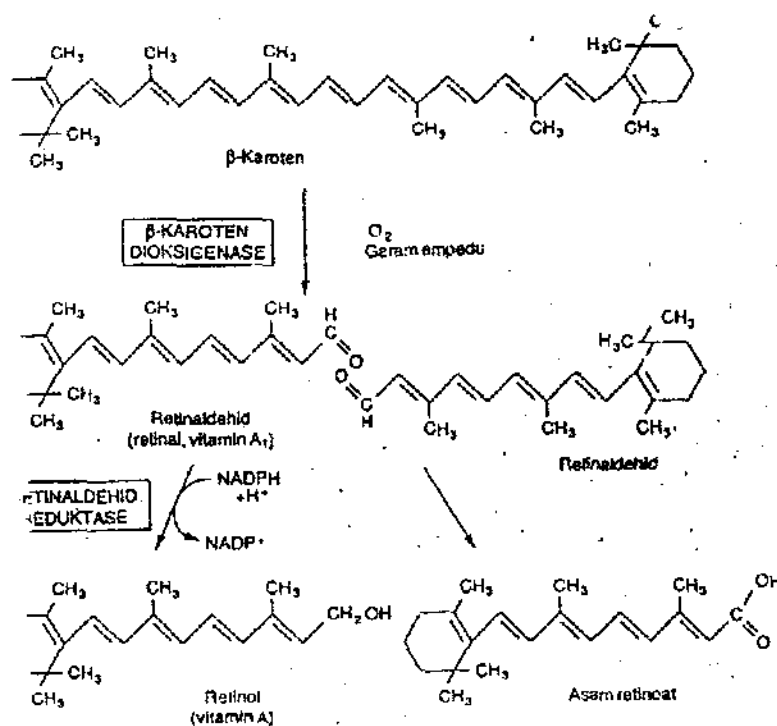
### 2.1.1 Sumber vitamin A dan kebutuhan

Vitamin A dapat ditemukan dalam mentega, telur, hati dan daging, dan terdapat dalam beberapa bentuk, yaitu retinol (vitamin A<sub>1</sub>) dan 3-dehidro retinol (vitamin A<sub>2</sub>). Asam retinoat (tretionin, isotretionin) merupakan hasil oksidasi grup alkohol dari retinol (Hedi, 1995).

Pada sayuran, vitamin A terdapat sebagai *provitamin* dalam bentuk pigmen berwarna kuning β karoten, yang terdiri atas dua molekul retinal yang dihubungkan pada ujung aldehid rantai karbonnya. Namun demikian, karena β-karoten tidak mengalami *metabolisme* yang efisien menjadi vitamin A, yakni berat asal tidak sama dengan berat yang dihasilkan, maka β-karoten mempunyai efektivitas sebagai sumber vitamin A hanya kira kira seperenam retinol (Murray, 2000).

Karoten atau provitamin A, banyak terdapat pada sayuran berwarna hijau atau kuning dan buah-buahan seperti wortel, pepaya dan tomat. Terdapat beberapa jenis karoten yaitu karoten alfa, beta, dan gama, dan bentuk yang paling aktif adalah beta karoten (Hedi, 1995).

Karotenoid berperan sebagai katalisator dalam fotosintesis yang dilakukan klorofil oleh karena itu karotinoid paling banyak terdapat dalam sayuran berwarna hijau (Gardner, 1982).



Gambar 2.4  $\beta$ -Karoten (Murray, 2000)

Kebutuhan vitamin A sehari-hari adalah 1.000-4.000 IU bagi anak-anak, 4.000-5.000 IU bagi orang dewasa, dan 5.000-6.000 IU pada waktu hamil dan laktasi dan WHO menganjurkan maksimal 8.000 IU/hari untuk wanita hamil karena pada dosis tinggi (25.000 IU sehari atau lebih) dapat meningkatkan resiko teratogen atau cacat pada janin (Tjay, 2002).

Kebutuhan akan vitamin A menurut daftar RDA (*Recommended Daily Allowance*) untuk Indonesia dapat dilihat pada daftar tabel di bawah ini :

Tabel 2.1 RDA Vitamin A untuk Indonesia

Kelompok Umur		Kebutuhan Vitamin A (SI / hari)
6 – 12 bulan		1.200
1 – 3 tahun		1.500
4 – 6 tahun		1.800
7 - 9 tahun		2.400
10 -	Pria	Wanita
10 – 12 tahun	3.450	3.400
13 - dst	4.000	4.500
Wanita hamil, tambahan		500
Wanita menyusui		2.500

(Widya Karya Nasional Pangan dan Gizi, Bogor 1978 *cit* Sediaoetama, 2000)

### 2.1.2 Transport dan metabolisme vitamin A

Metabolisme vitamin A terpusat di sekitar transport dari retinol dengan berbagai jalan pada konversi meliputi esterifikasi, konjugasi, oksidasi dan isomerasi. Retinol telah diesterifikasi pada sel intestinal dan sebagian besar jaringan lainnya melalui enzim-enzim retikulum endoplasma dengan menggunakan kelompok *acyl* dari fosfatidilkolin, atau *acylated coenzim-A* (*Acyl CoA, Retinol Acyl Transverase, ARAT*).

Retinol kemungkinan terkonjugasi dari salah satu cara ini, yaitu pertama melalui reaksi katalisis oleh *Retinol-UDP-Glukonidase* yang ada di hati atau mungkin pada jaringan lain. Reaksi ini menghasilkan *retinyl beta lukorinida* yaitu suatu metabolit yang diekskresi dalam empedu. Kedua, melalui konjugasi ATP

yang tergantung pada fosforilasi, yang menghasilkan *retinyl phosphat* yang dikatalisis oleh *retinol-phosphorilase*. Pada konjugasi ini dihasilkan *guanosin diphosphomanose* (GDP-Man) yang telah diubah menjadi *glikosida retinil phosphomanose*, yang kemudian akan dibawa ke reseptor-reseptor glikoprotein. Retinol yang dihasilkan melalui fosforilase secara *in vivo* jumlahnya sedikit. Secara fisiologis, reaksi melalui jalur ini belum diketahui dengan jelas (Combs, 1992).

Retinol dioksidasi kembali oleh  $\text{NADH}^+$  atau NADPH menjadi retinal tergantung pada *retinol dehidrogenase*. Reaksi ini bisa terjadi pada jaringan-jaringan lain tapi yang terbesar terjadi pada testis. Retinol bersifat ireversibel setelah mengalami oksidasi oleh *retinol oksidase* menghasilkan *retinoic acid*. Rentangan reaksi ini pada umumnya lebih besar pada *retinol dehidrogenase*, dengan rentangan reduksi retinal menjadi retinol yang relatif besar. Akibatnya di dalam jaringan terdapat konsentrasi retinol yang sangat rendah (Cooms, 1992). Konsumsi karoten yang berlebihan rupanya tidak mempunyai konsekuensi sedangkan konsumsi retinal sangat beracun. Vitamin A makanan terutama dalam bentuk  $\beta$ -karoten atau retinal masing masing dari ester retinol yang terlarut dalam lemak makanan akan terdispersi di dalam tetesan-tetesan getah empedu dan dihidrolisis dalam lumen intestinum, yang diikuti oleh penyerapan langsung pada epitel intestinal.  $\beta$ -karoten yang dikonsumsi mungkin dipecah lewat reaksi oksidasi oleh enzim  *$\beta$ -karoten dioksidase*. Pemecahan ini menggunakan oksigen molekuler dengan adanya garam garam empedu, dan menghasilkan 2 molekul retinaldehid (retinal). Demikian pula di dalam mukosa intestinal, retinal direduksi menjadi retinol oleh enzim spesifik *retinaldehid reduktase*,

sedangkan konsentrasi retinol ditentukan oleh tingkat sekresi hati dan kadarnya dipertahankan sangat konstan kecuali dalam keadaan defisiensi dan keracunan. Untuk sekresi hati dalam plasma, retinol atau retinoid lainnya bersatu dengan *retinol binding protein* (RBP) yang disintesis di hati. Pada waktu meninggalkan hati dalam plasma vitamin A-RBP membentuk kompleks dengan pra-albumin dalam plasma dengan ratio 1:1. Kompleks tersebut membawa vitamin A ke berbagai sel target dimana reseptor yang berada di permukaan sel dapat menjadi perantara dalam pengambilan dan pemindahan *celluler retinol binding protein* (CRBP) (Goddman,1981 cit Linder,1992).

Transport vitamin A di dalam darah dan sel adalah sebagai berikut :

- a. Retinol dilepaskan dari hati kemudian berikatan dengan *retinol binding protein* (RBP). Retinol dan RBP bergabung dengan *trans-tyretin* (TTR, juga mengikat tiroksin) dalam sirkulasi darah dengan perbandingan 1:1:1, suatu kompleks trimolekuler.
- b. Pada kelompok plasma normal, retinol dipertahankan hingga vitamin A yang disimpan di dalam hati habis.
- c. Retinol RBP kompleks kemudian diambil oleh sel pada saat retinol berikatan dengan *celluler binding protein* (CRBP) (Okita 1977 cit Kiptiyah, 2002)

Kadar normal Vitamin A dalam plasma darah 100-230 unit/100ml. Selama cadangan vitamin A dalam hati cukup, kadar normal akan dipertahankan. Bila terjadi penurunan kadar vitamin A berarti persediaan vitamin A dalam hati sudah berkurang. Gejala defisiensi vitamin A timbul bila kadar plasma di bawah 10-20 $\mu$ g/100 ml (0,3 $\mu$ g=1unit) (Hedi,1995).

Oksidasi retinol menjadi retinaldehida membutuhkan  $\text{NAD}^+$  dan bersifat bolak balik, langkah berikutnya menjadi *retinoic acid* tidak reversibel dalam jaringan hewan. Oleh karena itu hanya konsumsi retinol dan retinal yang dapat menghasilkan penyimpanan vitamin (Linder,1992).

Vitamin A dimobilisasi dari penyimpanannya dalam hati sebagai retinol, retinol ini ditransfer ke jaringan perifer setelah berikatan dengan protein spesifik dalam plasma *Retinol Binding Protein (RBP)* (Combs, 1992).

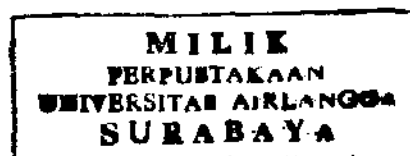
### 2.1.1 Penyimpanan vitamin A.

Dalam hati, vitamin A disimpan dalam bentuk ester dalam liposit (sel stelata/perisinusoidal), yang mungkin sebagai suatu kompleks lipoglikoprotein (Murray *et al*,1995).

Hati berfungsi sebagai gudang untuk menyimpan vitamin A dalam tubuh. Sebagian besar (kira-kira 80%) disimpan di dalam sel-sel stelata (sekitar 2% dari total volume hati) dan dalam keadaan seimbang didalam sel-sel parenkim. Hampir semua vitamin A hepatic dalam bentuk rantai panjang retinil ester, sedang yang bersifat predominan menjadi satu retinal palmitat (Coombs,1992).

### 2.1.2 Pengaruh hormonal vitamin A.

Diketahui pula bahwa vitamin A berperan dalam sintesis hormon-hormon steroid. Terdapat sejumlah hormon steroid yang bersangkutan dengan proses kehamilan dan proses pengaturan keseimbangan garam dan cairan tubuh (Sediaoetomo, 2000).



dipakai untuk penelitian biomedis adalah *Mus musculus*. Berbeda dengan hewan-hewan lainnya, mencit tidak memiliki kelenjar keringat. Pada umur 4 minggu berat badannya mencapai 18-20 gram. Jantung terdiri dari 4 ruang dengan dinding atrium yang tipis dan dinding ventrikel yang lebih tebal. Peningkatan temperatur tubuh tidak mempengaruhi tekanan darah, sedangkan frekuensi jantung dan *cardiac output* berkaitan dengan ukuran tubuhnya. Mencit memiliki karakter yang lebih aktif pada malam hari dibanding siang hari.

Traktus respiratorius terdiri dari 3 bagian yaitu :

- anterior : nostril, cavum nasi, nasopharynx
- intermediate : larynx, trachea, bronchi.
- posterior : paru-paru kiri dan kanan, paru kiri terdiri dari 1 lobus dan paru kanan terdiri dari 4 lobus.

Di antara spesies-spesies hewan lain, mencit paling luas digunakan untuk tujuan penelitian medis (60-80 %), karena selain murah juga mudah berkembang biak.

Mencit memiliki 3 pasang kelenjar saliva yakni submaksilaris (submandibularis), parotids dan sublingualis yang terdapat di bagian ventral daerah leher, sedangkan lambung seperti pada tikus, terbagi dalam glandular-glandular.

Traktus urinarius terdiri dari ginjal, ureter, vesica urinaria dan uretra. Urin yang dikeluarkan setiap kali hanya satu atau dua tetes tetapi konsentrasinya sangat tinggi (Jacoby,1984; Kusumawati, 2003).

Kebutuhan vitamin A mencit untuk makanan alam bahan formula adalah :15.000 IU/kgBB (Knapka *et al*, 1974), dari makanan murni : 4.000 IU/kgBB (AIN 76, 1977), 1.100 IU/kgBB (Hurley and Bell, 1974), dan dari serapan bahan kimia : 1.730 IU/kgBB (Pleasants *et al*, 1973 *cit* Jacoby,1984)

Data normatif mencit (Jacoby, 1984):

Berat badan : dewasa : jantan = 20 – 40 gram

betina = 18 – 35 gram

Lama hidup : umumnya : 1 – 3 tahun

maksimum : 4 tahun

Luas permukaan tubuh : 0,03 – 0,06 cm<sup>2</sup>

Jumlah kromosom (diploid) : 40

Kebutuhan air : 6,7 ml / usia 8 minggu

Kebutuhan makanan : 5,0 gr / usia 8 minggu

Temperatur tubuh : 98,8<sup>0</sup> – 99,3<sup>0</sup>F

Pubertas (jantan-betina) : 28 – 49 hari

Musim kawin : None

Lama kebuntingan : 19 – 21 hari

*Litter size* : 4-12 pups

Berat Lahir : 1,0 - 1,5 gr

Mata membuka : 12 - 13 hari

Penyapihan : 21 hari

Kecepatan jantung : 310 – 840 denyut/menit

Tekanan darah :

Sistolik : 133 – 160 mmHg

Diastolik : 102 – 110 mmHg

Volume darah :

Plasma : 3,15 ml/100 gr

Whole Blood : 5,85 ml/100 gr



Frekuensi pernafasan	: 163 / menit
Tidal Volume	: 0,18 (0,09 – 0,38)
Minute volume	: 24 (11 – 36 ml) / menit
Stroke volume	: 1,3 – 2,0 ml / denyut
Plasma :	
PH	: 7,2 – 7,4
CO <sub>2</sub>	: 21,9 mol.cs mM
CO <sub>2</sub> pressure	: 40 + 5,4 mmHg
Leukosit	
Total	: 8,4 (5,1 – 11,6) x 10 <sup>3</sup>
Neutrophil	: 17,9 (6,7 – 37,2) %
Limfosit	: 69 (63 - 75) %
Monosit	: 1,2 (0,7 – 2,6) %
Eosinofil	: 2,1 (0,9 – 9,8) %
Basofil	: 0,5 (0 – 1,5)%
Platelets	: 600 (100-1000) x 10 <sup>3</sup> / µl
Hematokrit	: 44 (42 - 44) %
Sel darah merah	: 8,7 – 10,5 x 10 <sup>8</sup> / mm <sup>3</sup>
Hemoglobin	: 13,4 (12,2 – 16,2) gr / dl
Volume maksimum darah	: 5 ml / kg
Perdarahan tunggal	
Waktu bekuan	: 2 – 10 menit
PTT	: 55 – 110 detik
Prothrombin time	: 7-9 detik

### 2.3 Hipervitaminosis A

Pemberian vitamin A yang berlebihan akan merupakan racun bagi tubuh. Keadaan demikian disebut hipervitaminosis A atau *vitamin A toxicity* (Pudjadi, 2000).

Hipervitaminosis A biasanya terjadi akibat penggunaan vitamin A lebih dari 700-3000 IU/kgBB/hari selama waktu beberapa bulan sampai beberapa tahun. Gejala pada anak antara lain, tinitus, pelebaran sutura dan ubun-ubun menonjol, meningkatnya tekanan intrakranial, nyeri tulang, letargi, dermatitis eksfoliativa, pruritus, stomatitis angularis, dan paronikia. Dapat terjadi diplopia dan papil udem dan selanjutnya atrofi N. Optikus dan kebutaan. Terhambatnya pertumbuhan karena penutupan epifisis yang terlalu cepat dapat terjadi pada anak. Gejala yang umum pada orang dewasa ialah muntah, perubahan kulit, sakit kepala *hipermenore* dan kelemahan, dapat terjadi gangguan fungsi hati yang mungkin disertai hepatosplenomegali. Selain itu hiperkalsemia berat dan asites juga dilaporkan terjadi. Hipervitaminosis A pada anak dan dewasa dapat menyebabkan kekeringan kulit dan membrana mukosa, *alopesia*, *anoreksia*, *brittle nails*, *mialgia*, *ostealgia*, *artralgia*, nyeri perut, splenomegali, anemia hipoplastik, dan leukopenia (Rosmiati, 1995).

Kasus hipervitaminosis A biasanya terjadi pada individu yang mengkonsumsi megadosis vitamin A atau pasien yang telah lama mendapat pengobatan dermatologi dengan dosis vitamin A yang tinggi. Diperkirakan bahwa gejala keracunan disebabkan oleh kerusakan membran hati dan berbagai sel lainnya oleh retinol bebas dalam jumlah besar dari pada yang dapat diikat oleh *retinol binding*

*protein* (RBP); meningkatkan kerapuhan lisosom (Roberts, 1981 *cit* Linder, 1992).

Vitamin A serum dalam keadaan puasa melebihi 250 µg /100 ml merupakan tanda hipervitaminosis. Jika pemberian vitamin A cepat dihentikan gejala hilang dalam beberapa minggu (Pudjiadi, 2000).

Keracunan akut vitamin A dilaporkan terjadi pada penjelajah kutub utara yang mengalami ngantuk, mudah tersinggung, sakit kepala dan muntah dalam beberapa jam setelah memakan hati beruang kutub atau hati anjing laut yang banyak mengandung vitamin A (Tanner, 1991; Marks *et al*, 1996; Ganong, 2001).

Keracunan kronis dapat terjadi pada pemberian vitamin A dalam waktu yang lama dengan dosis yang lebih rendah dibandingkan dengan pemberian tunggal dosis tinggi yang menghasilkan toksisitas akut (Melbus, 1998).

WHO menganjurkan maksimal 8000 IU sehari bagi wanita hamil berhubungan pada dosis tinggi (25.000 IU sehari atau lebih) dapat meningkatkan resiko teratogen atau cacat pada janin (Tjay, 2003).

Ditemukan adanya cacat bawaan berupa pemendekan tulang-tulang ekstremitas setelah pemberian vitamin A berlebihan pada mencit yang bunting. Hal tersebut sesuai dengan teori Kochar (1977) yang menyatakan bahwa cacat bawaan tersebut kemungkinan disebabkan oleh hambatan proses kondrogenesis (Wahyuni, 1991).

Pemberian pengobatan kronis dengan vitamin A dan derivatnya (retinoid) pada manusia diketahui dapat menyebabkan penutupan epifiseal lebih dini (Standeven *et al*, 1996).

De Luca *et al* (2000) menyatakan bahwa *retinoic acid* menghambat pertumbuhan tulang melalui 3 mekanisme yaitu : (1) *retinoic acid* menghambat

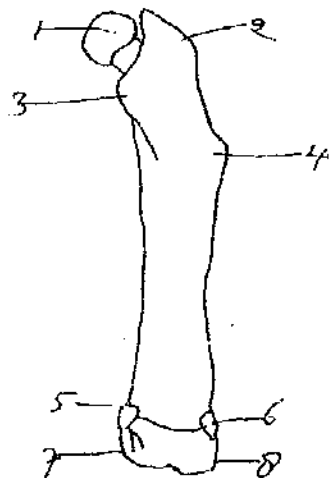
proliferasi kondrosit, (2) menghambat hipertrofi kondrosit, dan (3) menghambat sintesis matrik tulang.

Pada penelitian vitamin A dosis berlebihan juga ditemukan adanya kelainan pada langit-langit mulut (*palatochysis*), dan hambatan folikulogenesis (Soeradji, 1982; Kiptiyah, 2002).

## 2.4 Anatomi

Dari segi anatomi, bagian-bagian dari tulang femur mencit dapat dilihat pada Gambar 2.5 (Cook, 1965 *cit* Endang, 1985).

Anatomi Tulang Femur :



Bagian proximal terdiri dari :

1. Head of femur.
2. Greater trochanter.
3. Lesser trochanter.
4. Third trochanter.

Bagian Distal :

5. Medial fabella.
6. Lateral fabella.
7. Medial condyle.
8. Lateral condyle.

Bagian ujung baik proximal maupun distal disebut sebagai epifisis, dan bagian tengahnya disebut sebagai diafisis.

Bagian di antara epifisis dan diafisis disebut sebagai *epiphyseal plate*, yang pada waktu hewan masih muda merupakan daerah pertumbuhan.

## 2.5 Histologi :

Pertumbuhan tulang femur.

Tulang rawan penting untuk pertumbuhan tulang panjang baik sebelum lahir maupun setelah lahir. Suatu jaringan tulang baru, dibentuk melalui jaringan tulang rawan hialin sebagai model. Ini disebut tulang muda atau trabekel tulang (Tobing, 1979).

Dasar dari proses penulangan adalah dari sel-sel mesenchym yang merubah dirinya menjadi sel-sel osteoblast, yang menghasilkan bahan mukoid dan sabut-sabut kolagen serta dengan pengendapan bahan mineral khususnya bahan kapur menjadi bahan dasar tulang. Tulang menjadi makin tebal dengan penambahan lapisan lapisan matriks tersebut sebagai akibat dari kegiatan sel osteoblast. Sel-sel tulang (osteoblast) yang terjebak dalam matriks (bahan dasar tulang) yang dihasilkan disebut osteosit. Jaringan tulang muda ini dalam proses pertumbuhan selanjutnya akan diganti dengan jaringan tulang dewasa melalui pembentukan sistem Havers (Tobing , 1979).

Proses pembentukan tulang dewasa ini disebut sebagai ossifikasi atau proses penulangan.

Macam macam ossifikasi :

- Ossifikasi primer = Ossifikasi Intramembranosa, yaitu proses penulangan yang langsung dari jaringan ikat. Terjadi pada tulang pipih. Ossifikasi ini juga membantu pertumbuhan tulang pendek dan penebalan tulang panjang.
- Ossifikasi sekunder = Ossifikasi Endokondral, yaitu proses penulangan melalui terjadinya tulang rawan hialin sebagai model. Jenis ossifikasi ini terutama terjadi pada pembentukan tulang pendek dan tulang panjang (Junqueira *et al*, 1980)

Pada tulang femur yang terjadi adalah ossifikasi sekunder, dimana pada tulang ini dikenal dua daerah ossifikasi, yaitu ossifikasi di daerah diafisis dan ossifikasi di daerah epifisis.

Proses ossifikasi di daerah diafisis tulang femur.

Sebagai model disini adalah tulang rawan hialin, dimana pada bagian tengahnya yang diliputi perichondrium timbul kapiler-kapiler darah. Bagian dari periconchondrium ini tidak berdiferensiasi menjadi kondrosit tetapi berdeferensiasi menjadi osteoblast sehingga terbentuk jaringan tulang di sekitar model tulang rawan hialin tersebut. Perikondrium berubah menjadi periosteum dan jaringan tulang disekitar tulang rawan hialin disebut *periosteal bone collar*. Ossifikasi di tepi tulang rawan tersebut disebut ossifikasi perichondral.

Sebelum atau segera setelah terbentuknya *periosteal bone collar*, terjadi perubahan pada tulang rawan hialin, dimana sel-selnya mengalami hipertrofi, menghasilkan fosfatase dan bahan dasarnya mengalami pengapuran. Akibat

pengapuran ini, maka sel-sel kondrosit yang telah mengalami hipertrofi akan mati dan timbul ruang-ruang di dalam model tulang rawan hialin tersebut.

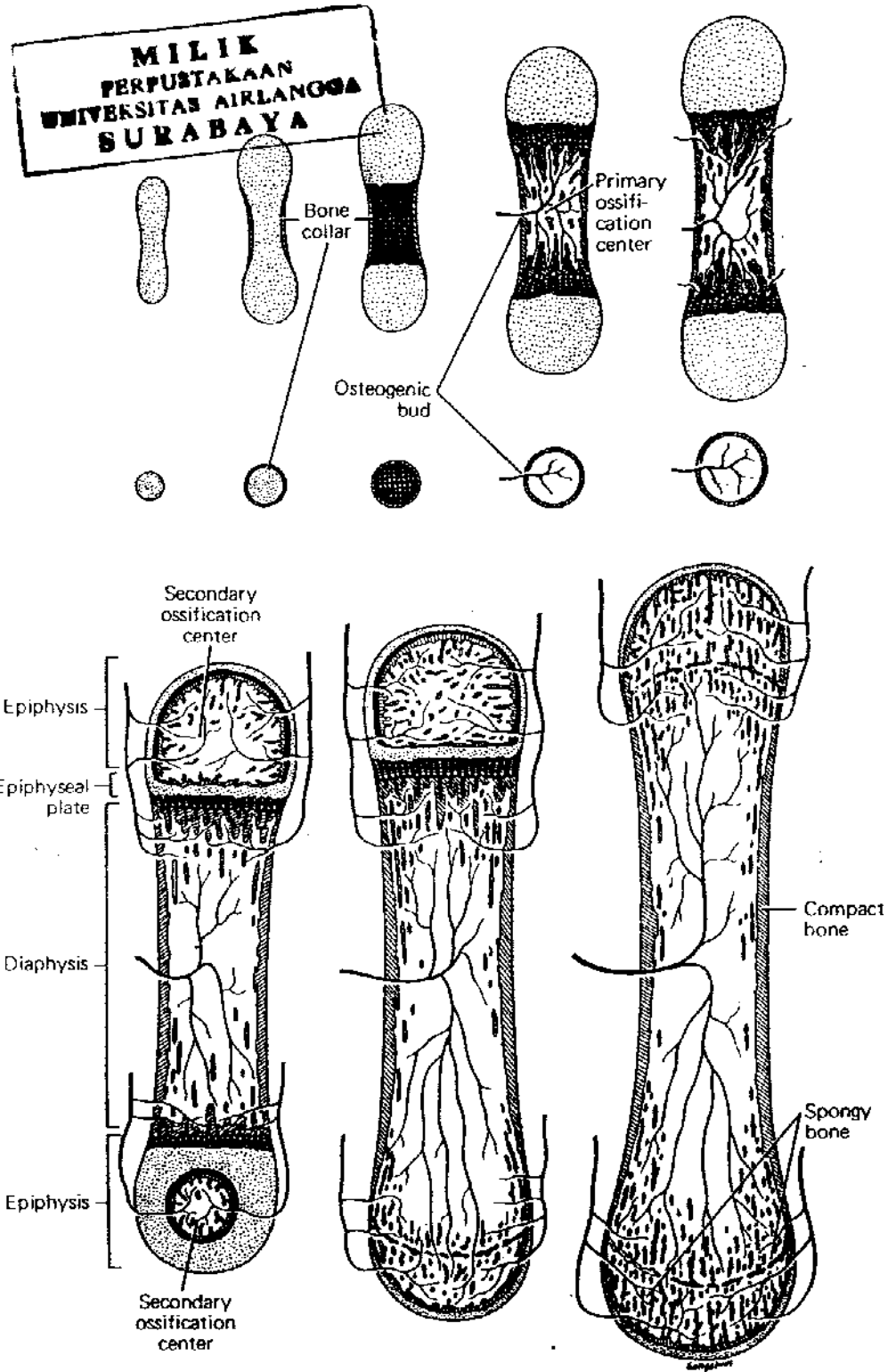
Pada waktu tulang rawan hialin mengalami pengapuran dan mengalami degenerasi, sel-sel osteoblast, sel-sel osteogenik yang lain dan kapiler-kapiler darah mulai timbul dari lapisan periosteum, dan masuk ke dalam ruangan-ruangan dalam model tulang rawan tersebut. Sel-sel osteoblast, sel-sel osteogenik dan kapiler-kapiler darah yang masuk disebut *periosteal buds*.

Di dalam ruangan-ruangan tersebut, sel-sel osteoblast, meletakkan diri secara epitelial pada sisa-sisa tulang rawan yang telah mengapur. Sel osteoblast kemudian membentuk bahan osteoid. Setelah terjadi pengapuran bahan-bahan osteoid, terbentuk tulang muda dan kerangka sisa-sisa tulang rawan yang mengapur.

Dengan cara yang sama proses ossifikasi ini meluas ke arah ujung-ujung tulang rawan yang sedang mengadakan proliferasi.

Dengan adanya proses ossifikasi dan proliferasi tersebut tulang rawan dapat tumbuh ke arah memanjang, setidaknya dengan adanya *periosteal bone collar* akan menghalangi pertumbuhan tulang rawan ke arah tepi.

Setelah bagian perifer dari model tulang rawan menjadi tulang muda yang kuat dan menjadi lebih tebal secara aposisi, maka tulang muda yang berada di tengah, tidak lagi diperlukan sebagai jaringan penyangga, dan akan diserap sehingga meninggalkan ruangan-ruangan yang disebut sebagai ruang sumsum tulang atau *cavum medulare* yang nantinya dalam perkembangan selanjutnya akan berisi sumsum tulang (Gambar 2.6).



Gambar 2.6 Pembentukan tulang panjang (Junquera, 1980)

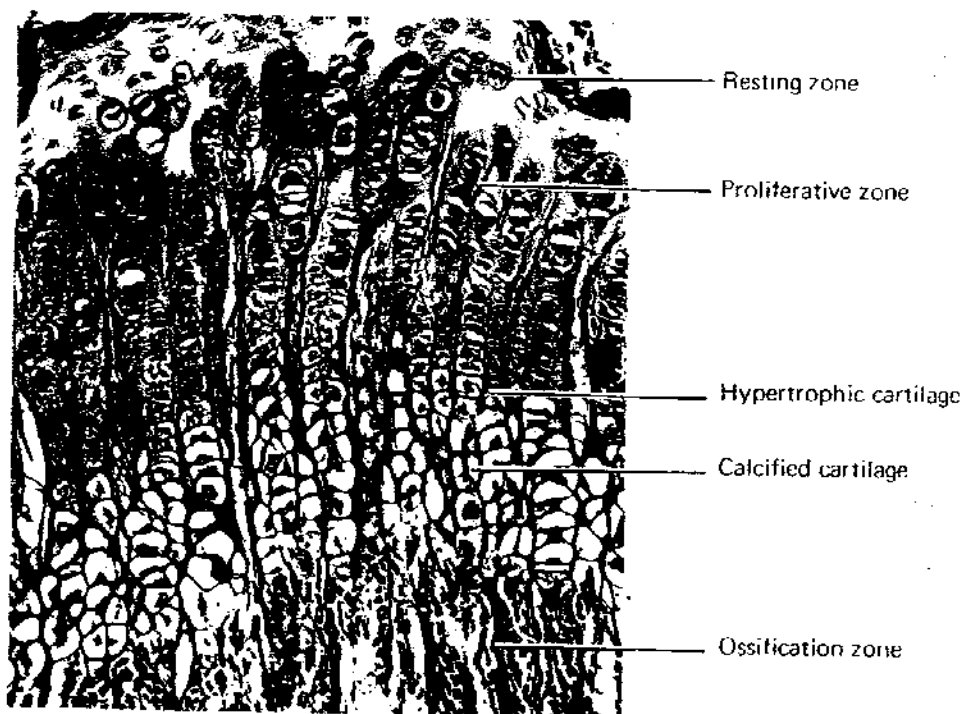


Proses ossifikasi pada epifisis tulang :

Pada tulang panjang, pusat ossifikasi timbul pada ujung-ujung tulang model rawan hialin yang sudah tumbuh dan disebut pusat ossifikasi epifisial.

Proses ossifikasi pada daerah epifisis ini berjalan secara radier tanpa didahului pembentukan *periosteal bone collar*. Proses ini akan segera berhenti apabila seluruh tulang rawan telah diganti dengan jaringan tulang muda, kecuali pada ujung-ujung persendian yang membentuk articular *cartilage* dan tulang rawan hialin yang berbentuk cakram atau lempeng yang melintang antara tulang tulang muda yang terbentuk dari ossifikasi pada daerah epifisis dan diafisis, yang kemudian disebut *epiphisial disc (epiphiseal plate)*.

*Epiphiseal disc* akan tetap ada sebagai tulang rawan hialin sampai pertumbuhan *postnatal* lengkap (Tobing, 1979).



Gambar 2.7 Gambaran histologik dari potongan memanjang melalui *epiphiseal plate* tulang panjang (Junqueira, 1980)

Setelah pertumbuhan lengkap maka tulang rawan hialin pada epifiseal plate akan diganti dengan jaringan tulang. Bagian epifisis dan diafisis akan dipersatukan dengan tulang, dan bagian persatuan ini dapat dilihat pada orang dewasa sebagai garis epifiseal (Bloom *et al*, 1971).

Pada daerah lempeng epifisial yang masih merupakan tulang rawan hialin, mulai dari daerah epifisis ke daerah diafisis terlihat adanya daerah-daerah :

- The resting zone
- The proliferative zone.
- The hypertrophic zone.
- The calcified zone.
- The ossification zone.

Adapun gambaran histologik dari tiap-tiap zona adalah sebagai berikut :

- The resting zone :

Terdiri dari tulang rawan hialin tanpa perubahan bentuk morfologi dalam sel sel tersebut.

-The proliferative zone :

kondrosit membelah diri dengan cepat dan membentuk deretan sejajar tumpukan sel sepanjang sumbu panjang tulang tersebut.

-The hipertrophic zone :

Pada daerah ini tampak kondrosit besar yang sitoplasmanya telah mengumpulkan glikogen. Matriks yang diresorpsi telah berkurang menjadi septum tipis di antara kondrosit-kondrosit.

-The calcified zone:

Pada saat bersamaan dengan kematian kondrosit yang terjadi di dalam daerah tulang rawan mengalami kalsifikasi dengan pengendapan hidroksiapatit.

-The ossification zone:

Pada daerah ini muncul jaringan tulang endokondral. Kapiler darah dan sel belum berdiferensiasi yang dibentuk oleh mitosis sel yang berasal dari periosteum memasuki rongga-rongga yang ditinggalkan oleh kondrosit. Sel yang belum berdiferensiasi tersebut membentuk osteoblas, yang kemudian membentuk suatu lapisan tak kontinu di atas septum matriks tulang rawan yang sudah mengalami kalsifikasi (Junqueira, 1980; Copenhaver, 1987).

## BAB 3

### KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Vitamin A sangat penting untuk penunjang pertumbuhan tubuh, antara lain untuk fungsi penglihatan, mempertahankan fungsi integrasi sel-sel epitelial, fungsi reproduksi dan pertumbuhan tulang.

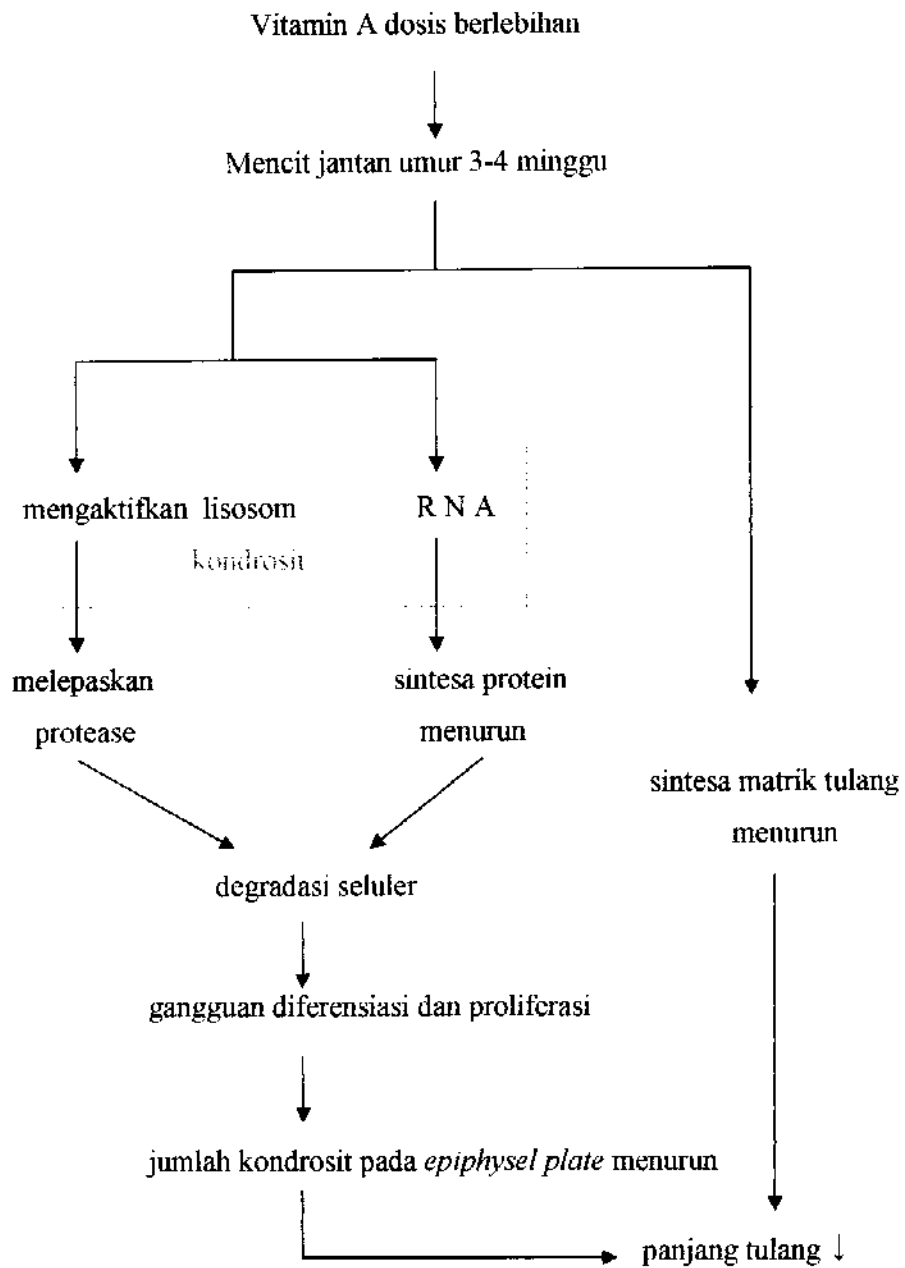
Pada defisiensi vitamin A sering terjadi penurunan imunitas pada anak, sehingga anak mudah terserang infeksi, bronchitis, pneumoni dan diare. Pada binatang defisiensi dapat memberikan kemandulan, baik pada yang jantan maupun betina, pada yang betina tidak terjadi pembuahan dan tikus menjadi steril, demikian pula pada yang jantan.

Pemberian dosis besar vitamin yang larut air pada umumnya tidak membawa akibat yang buruk. Lain halnya pada vitamin yang larut lemak. Vitamin tersebut apabila dikonsumsi secara berlebihan dapat meracuni tubuh.

Hipervitaminosis A dapat terjadi cacat lahir apabila diberikan selama kehamilan. Pada anak dan dewasa hipervitaminosis A dapat menyebabkan kekeringan kulit dan membrana mukosa, *alopesia*, *atralgia*, nyeri perut, splenomegali dan hambatan pertumbuhan karena penutupan *epiphysel plate* terlalu cepat dapat terjadi pada anak.

Kelebihan vitamin A mempercepat ossifikasi *epiphysel plate* tanpa disertai efek pertumbuhan tulang rawan di dalam *epiphysel plate* ini. Sebagai akibatnya tulang rawan *epiphysel plate* cepat digantikan oleh tulang, dan pertumbuhan badan terhenti.

Atas dasar kerangka konseptual di atas maka disusun bagan kerangka konseptual sebagai berikut :



Gambar 3.1 Bagan kerangka konseptual pengaruh hipervitaminosis A

### **3.1 Hipotesis Penelitian**

Dari kerangka konseptual yang telah dipaparkan, dirumuskan hipotesis sebagai berikut:

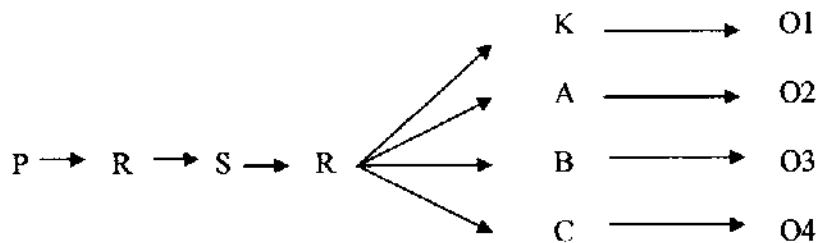
1. Pemberian vitamin A dosis berlebihan menyebabkan pemendekan tulang femur anak mencit jantan.
2. Pemberian vitamin A dosis berlebihan menyebabkan pemendekan zona proliferasi dari garis pertumbuhan tulang femur anak mencit jantan.
3. Pemberian vitamin A dosis berlebihan menyebabkan pemendekan zona hipertrofi / maturasi dari garis pertumbuhan tulang femur anak mencit.

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Eksperimental Murni (*True Experimental*) yaitu dengan melakukan pengelompokan subyek berdasarkan teknik random (*Random Assignment*) (Pratikya, 2001). Rancangan ini biasanya disebut *The Posttest Only Control Group Design*, dimana pengukuran awal tidak dilakukan, karena dianggap sama untuk semua kelompok yang berasal dari populasi yang sama. Dalam penelitian ini oleh karena menggunakan lebih dari 1 kelompok perlakuan, disamping perlakuan kontrol atau banding, maka bentuk rancangan penelitian ini (Zainuddin, 2000) adalah



- P : Populasi
- R : Randomisasi
- S : Sampel
- K : Kelompok kontrol
- A : Kelompok perlakuan 1
- B : Kelompok perlakuan 2
- C : Kelompok perlakuan 3
- P0 : Perlakuan kontrol (larutan emulsi)
- P1 : Perlakuan 1 (vitamin A 160,62 IU/gr BB)
- P2 : Perlakuan 2 (vitamin A 214IU/gr BB)
- P3 : Perlakuan 3 (vitamin A 321,25IU/gr BB)
- O1 : Data post test kelompok kontrol

- O2 : Data post test kelompok perlakuan 1  
 O3 : Data post test kelompok perlakuan 2  
 O4 : Data post test kelompok perlakuan 3

#### 4.2 Sampel dan Besar Sampel

Dalam penelitian ini digunakan sampel 40 ekor mencit jantan umur 3 - 4 minggu strain BALB/C, setiap kelompok besarnya sampel 10 ekor mencit, yang digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian vitamin A dosis berlebihan pada pertumbuhan tulang femur dan perubahan gambaran histologik dari zona zona penulangan pada tulang femur kanan.

Mencit dipilih sebagai binatang coba dengan pertimbangan murah dan juga paling luas digunakan untuk tujuan penelitian medis.

Besar sampel minimal yang digunakan 10 ekor anak mencit jantan untuk setiap kelompok perlakuan. Jadi besarnya sampel keseluruhan adalah 40 ekor. Jumlah sampel dalam penelitian tersebut berdasarkan rumus dari Snedecor (1967).

$$n = \sigma D^2 / \delta^2$$

bila berpasangan,  $\sigma D^2 / \delta^2 = 1$ , maka

$$n = (Z\alpha + Z\beta)^2$$

$$n = (1,65 + 1,28)^2$$

$$n = 8,41 \text{ dibulatkan menjadi } 9$$

keterangan

n = besar sampel

Z $\alpha$  = harga standar  $\alpha$  0,05 = 1,65

Z $\beta$  = harga standar  $\beta$  0,1 = 1,28



### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Klasifikasi variabel

Variabel dalam penelitian ini adalah :

##### 1. Variabel bebas (variabel independen)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah bermacam dosis vitamin A yang diberikan pada anak mencit jantan .

##### 2. Variabel tergantung (variabel dependen)

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah :

1. panjang tulang femur
2. gambaran histologik sel kondrosit pada zona proliferasi dan zona hipertrofi / maturasi pada garis pertumbuhan tulang femur

##### 3. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah :

1. galur
2. kandang
3. pakan
4. perawatan

#### 4.3.2 Definisi operasional variabel

1. Dosis Vitamin A adalah jumlah vitamin A yang dalam bentuk emulsi vitamin A sebanyak 160,62 IU/grBB (Kelompok A), 214,16 IU/grBB (Kelompok B), dan 321,25 IU/ gr BB (Kelompok C) .
2. Panjang tulang adalah panjang tulang femur kanan hewan coba yang diukur dengan jangka sorong Schlieper satuan mm (millimeter) dengan ketelitian 2 angka di belakang koma.

3. Gambaran histologik zona-zona penulangan adalah dengan menghitung rata-rata jumlah sel tulang rawan pada kedua bagian tepi dan bagian tengah yang terdapat pada, zona proliferasi dan zona hipertrofi/maturasi dengan menggunakan mikroskop cahaya.

#### **4.4 Bahan Penelitian**

Dalam penelitian ini digunakan bahan, yang terdiri dari :

1. Vitamin A palmitat yang tiap gramnya mengandung 500.000 IU (dibuat sediaan larutan emulsi)
2. Ether sebagai bahan untuk membius mencit pada saat akan dilakukan pembedahan.
3. Bahan untuk teknik pewarnaan preparat histologik tulang femur terdiri dari larutan formalin untuk menyimpan tulang femur yang akan difiksasi, aquades sebagai pengencer, larutan Cal -Ex untuk decalsifikasi, alkohol untuk dehidrasi, xylol untuk clearing, paraffin untuk infiltrasi dan blocking.
4. Bahan untuk pengecatan HE, yang terdiri dari xylol, larutan heamatoxylin, air kran, alkohol asam 5%, lithium carbonat, larutan eosin, alkohol 96%, alkohol absolut, balsam Canada.

#### **4.5 Alat Penelitian**

1. Kandang, tempat pemeliharaan mencit terdiri dari kandang individual dari bak plastik dengan ukuran 23 x 17 x 9,5 cm. Sistem kandang yang dipakai yang paling penting untuk diperhatikan adalah persyaratan fisiologis meliputi menjaga lingkungan tetap kering dan bersih, suhu yang memadai, dan

memberi ruang cukup untuk bergerak dengan bebas dalam berbagai posisi, harus dilengkapi makanan dan minuman yang mudah dicapai oleh hewan coba dan kandang tidak boleh diisi sampai berdesak-desakan agar hewan dapat bergerak bebas (Smith, 1988)

2. Kawat kasa sebagai tutup kandang individual
3. Timbangan roti untuk menimbang makanan mencit
4. Sekam, ditempatkan di bagian bawah sebagai alas, juga dimaksudkan supaya dapat menyerap kotoran serta air kencing mencit, dan mudah untuk membuang/mengantinya
5. Sonde lambung adalah alat suntik yang ujung jarumnya dipasang logam sehingga dapat berfungsi sebagai sonde
6. Satu set alat seksi untuk seksi dan pengambilan organ / jaringan tulang
7. Tabung-tabung pengecatan
8. Mikrotom
9. Mikroskop cahaya
10. Stoples kecil dan tutupnya sebagai tempat penyimpanan organ
11. Alat pengukur jangka sorong
12. Alat fotografi

#### **4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian.**

Penelitian ini dilakukan selama kurang lebih 4 bulan, mulai pertengahan Agustus sampai akhir Desember 2004 di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

#### 4.7 Persyaratan Etik

Implikasi etik pada mencit sebagai hewan coba mengikuti *Animal Ethic*. Hal yang perlu dilaksanakan sesuai dengan etik antara lain perawatan mencit dalam kandang, pemberian makanan dan minuman, aliran udara dalam ruang kandang, perlakuan saat penelitian, pengambilan unit analisis penelitian dan pemusnahannya.

#### 4.8 Prosedur Pengambilan Data

##### 4.8.1 Penentuan dosis

Berdasarkan  $LD_{50}$  yang sudah diketahui = 2570 mg/kg berat badan untuk mencit yang diberikan per oral ( Robert, 1982), dapat dilakukan penentuan dosis teratogenik terhadap mencit (*Mus musculus*) sebagai berikut :

$$\begin{aligned} LD_{50} \text{ vitamin A} &= 2570 \text{ mg/kg berat badan} \\ &= 2,57 \text{ gr/kg berat badan} \end{aligned}$$

karena dalam 1 gr vitamin A mengandung 500.000 IU, maka :

$$\begin{aligned} &= 2,57 \text{ gr/kg BB} \times 500.000 \text{ IU} \\ &= 1,285 \text{ gr/kg BB (dosis letal)} \end{aligned}$$

Dalam penelitian ini ada 3 kelompok perlakuan dengan dosis yang berbeda, yaitu:

$$\text{Kelompok A : } 1/8 LD_{50} \rightarrow 160,62 \text{ IU/grBB/hr}$$

$$\text{Kelompok B : } 1/6 LD_{50} \rightarrow 214,16 \text{ IU/grBB/hr}$$

$$\text{Kelompok C : } 1/4 LD_{50} \rightarrow 321,25 \text{ IU/grBB/hr}$$

Sediaan vitamin A dalam bentuk serbuk, agar sediaan dapat diberikan secara oral pada hewan coba maka bentuk sediaan ini dibuat dalam bentuk emulsi. Diketahui bahwa volume maksimal lambung mencit dengan berat badan 20 – 30 gr adalah

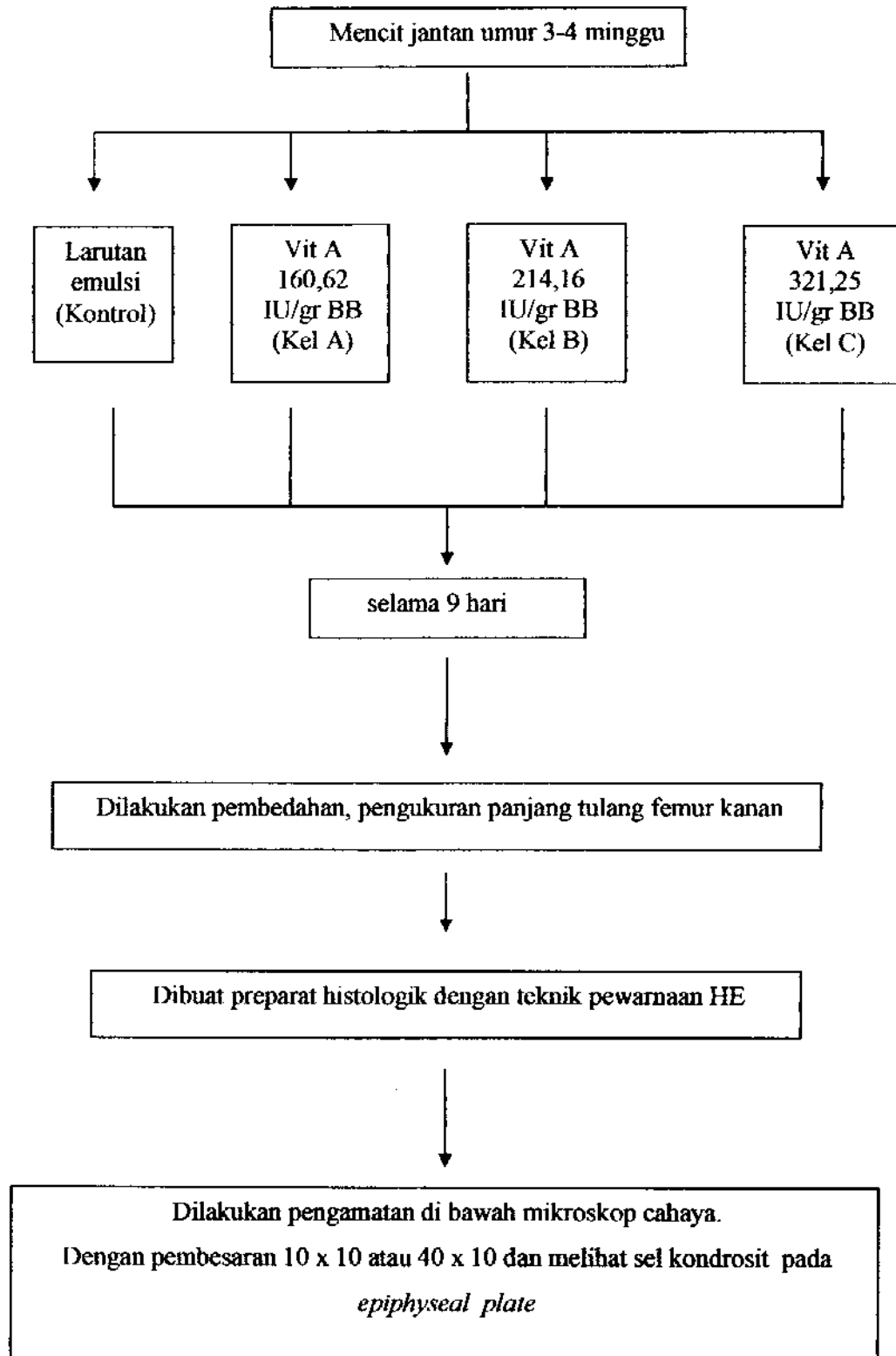
1 ml (Kusumawati, 2003). Untuk pembuatan emulsi vitamin A digunakan berat badan terbesar yaitu 30 gr, dengan menggunakan dosis kelompok A ( $1/4 LD_{50}$ ), maka, vitamin A yang diberikan 9.637,5 IU/ml. Jadi atas dasar inilah dapat dihitung berapa besar kebutuhan larutan emulsi vitamin A (dalam ml) untuk setiap hewan coba pada setiap kelompok perlakuan

#### 4.8.2 Pemilihan hewan coba

Anak mencit jantan berumur 3 – 4 minggu dipisahkan dari induknya untuk dilakukan perlakuan, kemudian mencit diberi nomor dengan mengecat bagian tubuhnya misalnya pada daun telinga, dan salah satu jari-jari mencit, kemudian dicatat tanggal pemberian vitamin A dan tanggal saat akan dikorbankan.

#### 4.8.3 Metode penelitian

Penelitian dibagi dalam empat kelompok anak mencit jantan diberi vitamin A per *oral* selama 9 hari berturut-turut dengan dosis perhari 160,62 IU/gr BB/hr (kelompok A), 214,16 IU/grBB/hr (kelompok B), 321,25 IU/grBB/hr (kelompok C), 0 IU/grBB/hr atau diberi blanko basis emulsi cair sorbiton 0,25 cc (kelompok K) sebagai kontrol pada awal penelitian. Satu hari setelah pemberian vitamin A yang terakhir, semua anak mencit dikorbankan dan dilakukan pembedahan, dan diambil tulang femur kanan, lalu masing masing diukur panjangnya dengan jangka sorong. Setelah itu tulang femur dibuat preparat histologik dengan pewarnaan HE. Kemudian dilakukan pengamatan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 10 x 10 atau 40 x 10 untuk melihat masing-masing zona penulangan.

**Kerangka Operasional**

#### 4.8.4 Pembedahan

Satu hari setelah perlakuan selesai, semua hewan coba dikorbankan,. Kemudian dengan hati-hati diambil secara utuh tulang femur sebelah kanan, diukur panjangnya dengan jangka sorong lalu dicatat. Lalu dibuat sediaan histologik dari tulang femur dengan pewarnaan H.E.

#### 4.8.5 Pengolahan jaringan

Teknik pembuatan sediaan tulang agak berbeda dengan pembuatan sediaan lunak, karena pembuatan sediaan dari jaringan keras, termasuk tulang/gigi, terlebih dahulu bahan pengerasnya harus dihilangkan dalam hal ini kalsium, proses penghilangan kalsium ini kita sebut sebagai proses dekalsifikasi, walaupun demikian hendaknya harus dilakukan fiksasi sebelum dilakukan dekalsifikasi (Sudiana).

Pada pemerosesan tulang kita mengenal 2 macam larutan fiksasi sesuai dengan penggunaannya yaitu :

1. Fiksasi primer : yaitu larutan fiksasi yang diberikan sebelum dilakukan dekalsifikasi.
2. Fiksasi sekunder : yaitu larutan fiksasi yang diberikan setelah dilakukan fiksasi.

Ada bermacam macam larutan dekalsifikasi, dari bermacam macam ini harus dapat memilih bahan tersebut yang mempunyai sifat sebagai berikut :

1. Dapat melarutkan kalsium secara sempurna.
2. Mempunyai pengaruh sangat kecil terhadap jaringan/sel.

3. Mempunyai sifat yang sedikit menghambat reaksi pewarnaan khususnya pewarnaan inti sel.

Dalam hal ini larutan dekalsifikasi yang digunakan adalah *Formic acid-hydrochloric acid* (Gridly, 1960).

Terdiri dari :

Formic acid 90 %.....100 cc  
 Hydrochloric acid.....80 cc  
 Air sampai dengan .....1000 cc

Prosedur pengolahan jaringan :

1. Setelah panjang femur diukur lalu dimasukkan kedalam larutan fiksasi *Formic acid-hydrochloric acid* selama kurang lebih 24 jam.
2. Kemudian dipindahkan kedalam larutan Cal-Ex selama 2 X 24 jam untuk melarutkan kalsium.
3. Sesudah itu dimasukkan kembali kedalam larutan *Formic acid-hydrochloric acid*.
4. Setelah fiksasi dan dekalsifikasi dilakukan dehidrasi untuk menghilangkan air dari jaringan, agar nantinya paraffin dapat masuk merata kedalam jaringan, sebab paraffin tak dapat bercampur dengan air. Dehidrasi dilakukan dengan mencelupkan jaringan kedalam larutan alkohol dengan kekuatan berbeda-beda, mulai alkohol 80%, 2 kali masing-masing selama 1 jam, kemudian alkohol 90% selama 1 jam, lalu alkohol 90% lagi 1 jam, lalu alkohol 95% 2 kali selama 1 jam, akhirnya ke dalam alkohol absolut



- 2 kali masing masing selama 1 jam. Alkohol masuk ke dalam jaringan secara berdifusi.
5. Dilanjutkan dengan proses *clearing* untuk menjernihkan jaringan. Untuk itu dipakai xylene karena dapat bercampur baik dengan paraffin. Jaringan dicelupkan kedalam 3 tabung xylene masing-masing selama 1 jam.
  6. Kemudian dimasukkan dilakukan di dalam paraffin solid yang dicairkan. Berturut-turut jaringan dimasukkan kedalam 3 tabung paraffin yang dicairkan masing-masing selama 1 jam. Parafin yang terlalu lunak menyebabkan jaringan sukar diiris. Bila terlalu panas menyebabkan jaringan mengkerut dan keras.
  7. Sesudah infiltrasi dilakukan *casting* yaitu jaringan jaringan dicetak dengan alat 2 metal yang berbentuk huruf L, dan sebagai dasarnya juga metal. Cetakan mula-mula diisi paraffin solid yang dicairkan, kemudian jaringan dijepit dengan pinset panas, dimasukkan kedalam cetakan dengan permukaan yang akan diiris menghadap ke dasar. Akhirnya diberi label identifikasi dan didinginkan.
  8. Untuk pengirisan dilakukan dengan *rotary microtome* dengan tebal irisan 6 sampai 10 micron.
  9. Irisan diapungkan dalam water bath dengan suhu  $56^{\circ}\text{C}$ , kemudian dijarang dengan gelas obyek yang telah dilapisi albumin telur, kemudian dikeringkan dan dilakukan pengecatan.

#### 4.8.6 Pengecatan jaringan

##### Prosedur Pengecatan

##### Pengecatan Sediaan dengan Hematoxyline dan Eosin.

1. Mula-mula dilakukan deparafinisasi dengan xylene selama 2,5 menit untuk menghilangkan parafin dari jaringan, ini dilakukan berturut-turut kedalam 3 tabung xylene.
2. Setelah itu dimasukkan kedalam alkohol berturut-turut alkohol absolut, alkohol absolut dan alkohol 95 % masing-masing 1 sampai 2 menit untuk menarik xylene.
3. Lalu dicuci dengan air kran beberapa kali.
4. Kemudian dicat dengan larutan hematoxyline selama 15 menit. Hematoxyline berguna untuk mengecat inti.
5. Lalu dicuci dengan air kran beberapa kali untuk mencuci/menghilangkan sisa-sisa pengecatan.
6. Kemudian dilakukan diferensiasi dengan alkohol asam 1% sebanyak beberapa celupan sampai intensitas warna inti seperti yang dikehendaki.
7. Lalu dicuci dengan air kran selama 1 menit untuk menghilangkan kelebihan kerja alkohol asam .
8. Setelah itu dicelupkan ke dalam larutan ammonia selama 30 detik untuk membirukan inti.
9. Kemudian dicuci beberapa kali di dalam air kran untuk menghilangkan sisa-sisa basa, sebab bila tidak dihilangkan akan menghambat pengecatan dengan eosin.

10. Untuk melihat apakah pengecatan inti sudah cukup maka sediaan dilihat di bawah mikroskop sinar. Pewarnaan dianggap cukup bila nukleus berwarna biru terang dengan latar belakang terang atau tidak tercat (bilamana diperlukan maka diferensiasi dapat diulangi).
11. Kemudian dicat dengan eosin beberapa kali celupan selama 2 menit untuk mengecat sitoplasma.
12. Setelah itu dilakukan dehidrasi dengan alkohol 95% beberapa kali celupan, yang juga berfungsi untuk menghilangkan sisa-sisa eosin.
13. Lalu dehidrasi diulangi lagi berturut-turut kedalam tabung alkohol 95 %, alkohol absolut dan alkohol absolut lagi masing-masing selama 1 menit.
14. Akhirnya dilakukan penjernihan dengan 3 tabung xylene, dimana masing-masing dicelupkan selama kurang lebih 2 menit untuk menghilangkan alkohol. Bila pengecatan baik, sitoplasma akan berwarna merah muda.
15. Setelah pengecatan selesai sediaan ditutup dengan gelas penutup, setelah terlebih dahulu diberi tetesan balsam Canada.
16. Terakhir sekali diberi label identifikasi dan dikeringkan.

#### **4.9. Analisa Data**

Hasil dari penimbangan berat tulang femur, dan pengamatan mikroskopis zona-zona penulangan yang dicatat dan dianalisis dengan analisis varians (Anava) pada taraf signifikansi 0,05. Jika terdapat perbedaan yang bermakna dilakukan uji lanjut dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) (Steel dan Torrie, 1991; Sastrosoepadi, 1995).

## BAB 5

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISA

#### 5.1 Hasil Pengamatan Makroskopis

Pengamatan secara makroskopis yang dilakukan meliputi pengukuran panjang tulang femur.

##### 5.1.1 Panjang tulang femur

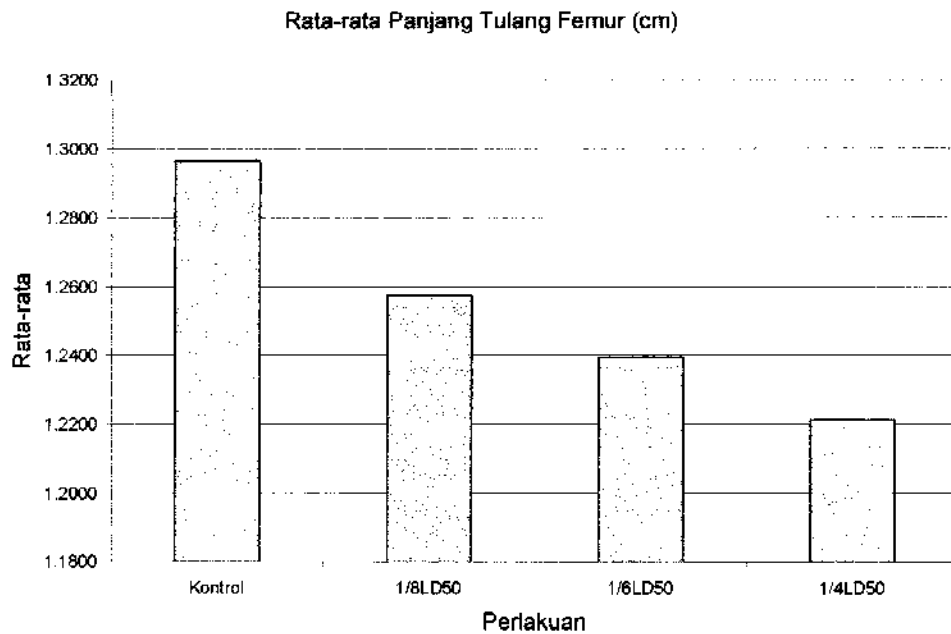
Untuk menganalisa hasil penelitian dalam hal ini digunakan uji satu arah (*one way*). Data deskriptif (lampiran 1) diolah maka akan didapatkan kesimpulan dari rata-rata dan standar deviasi dari pengukuran panjang tulang femur. Setelah diberikan perlakuan selama 9 hari dengan pemberian larutan emulsi vitamin A per oral, maka dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.1 Rata-rata dan simpangan baku panjang tulang femur

Perlakuan	n	Rata-rata panjang femur (cm) $\pm$ SD
K	10	1,29650 $\pm$ 0,06028
A	10	1,25750 $\pm$ 0,04843
B	10	1,23950 $\pm$ 0,03378
C	10	1,22150 $\pm$ 0,03317

Keterangan :

- K = kelompok kontrol
- A = kelompok 1/8 LD<sub>50</sub>
- B = kelompok 1/6 LD<sub>50</sub>
- C = kelompok 1/4 LD<sub>50</sub>



Gambar 5.1 Pengaruh pemberian vitamin A dosis berlebihan pada panjang tulang femur mencit jantan (*Mus musculus*).

Dari tabel 5.1 tersebut di atas terlihat panjang tulang femur K (kontrol) lebih panjang dari kelompok yang diberikan larutan emulsi vitamin A selama 9 hari. Sedangkan panjang tulang femur yang paling pendek terlihat pada kelompok C ( $1/4 LD_{50}$ ).

Selanjutnya dengan menggunakan *test of homogeneity of variances* dapat dianalisa varian dari 4 kelompok populasi. Seperti diketahui bahwa untuk melakukan uji ini harus mempunyai varian yang sama sesuai dengan hipotesis ( $H_0$ ; keempat populasi mempunyai varian yang sama,  $H_a$ ; keempat populasi mempunyai varian yang tidak sama). Dengan dasar bahwa pengambilan keputusan yaitu jika  $F_{hitung} < F_{tabel}$  atau probabilitas  $> 0,05$  maka  $H_0$  diterima. Dan apabila  $F_{hitung} > F_{tabel}$  atau probabilitas  $< 0,05$  maka  $H_0$  ditolak. Pada *test of homogeneity*

*of variances* (lampiran 2) nilai  $P = 0,052$ , artinya  $P > 0,05$  maka  $H_0$  diterima artinya keempat kelompok populasi tersebut mempunyai varians yang sama. Kemudian dilakukan uji *Anova* untuk menganalisa apakah keempat populasi dosis mempunyai rata-rata/mean yang sama dengan hipotesis yang diajukan  $H_0 =$  keempat populasi dosis vitamin A mempunyai rata-rata yang sama, sedangkan  $H_a$  sebaliknya. Dari perhitungan diperoleh nilai  $P = 0,005$  artinya  $P < 0,05$  ini berarti  $H_0$  ditolak artinya keempat populasi dosis vitamin A tidak sama. Seperti terlihat pada tabel *Anova* di bawah ini.

Tabel 5.2 Ringkasan *Anova* panjang tulang femur setelah pemberian emulsi vitamin A

Sumber	JK	DB	KT	F hitung	P
Perlakuan	3.085 E-02	3	1.028 E-02	5.003	0.005
Sisa	7.399 E-02	36	2.055 E-03		
Total	105	39			

Kemudian untuk mengetahui dosis berapa saja yang berbeda dan yang tidak berbeda dilakukan uji lanjut (*Post Hoc Test*) berupa *Bonferoni test* dan *Tukey test* untuk mengetahui perbedaan antara keempat kelompok populasi. Hasil uji BNT dari pengaruh vitamin A terhadap panjang femur dapat terlihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.3 Ringkasan hasil uji BNT panjang tulang femur mencit setelah pemberian vitamin A selama 9 hari

Antara perlakuan	Beda rata-rata panjang femur
A dengan B	0,01180
A dengan C	0,0360
A dengan K	0,0390
B dengan C	0,0180
B dengan K	0,0570 *
C dengan K	0,0750 *

Keterangan :

- K = kelompok kontrol  
 A = kelompok  $1/8$  LD<sub>50</sub>  
 B = kelompok  $1/6$  LD<sub>50</sub>  
 C = kelompok  $1/4$  LD<sub>50</sub>

Dari hasil uji BNT tersebut di atas panjang tulang femur setelah diberi vitamin A dengan dosis tertentu pada setiap kelompok kemudian dievaluasi terlihat perbedaan antara B ( $1/6$  LD<sub>50</sub>) dengan K (kontrol), dan C ( $1/4$  LD<sub>50</sub>) dengan K(kontrol), sedangkan kelompok A ( $1/8$  LD<sub>50</sub>) dengan B( $1/6$  LD<sub>50</sub>), A( $1/8$  LD<sub>50</sub>) dengan C ( $1/4$  LD<sub>50</sub>), A ( $1/8$  LD<sub>50</sub>) dengan K(kontrol) tidak ada perbedaan.

## 5.2 Hasil Pengamatan Mikroskopis

Untuk mengetahui apakah pemberian vitamin A dosis berlebihan berpengaruh terhadap jumlah sel kondrosit pada garis pertumbuhan tulang, maka dilakukan pengamatan secara mikroskopis terhadap rata-rata jumlah sel kondrosit pada

kedua sisi dan bagian tengah. Pada zona proliferasi dan zona hipertrofi pada garis pertumbuhan tulang.

### 5.2.1 Jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi

Rata-rata jumlah sel kondrosit setelah pemberian larutan emulsi vitamin A selama 9 hari dapat dilihat pada tabel berikut ini :

Tabel 5.4 Rata-rata dan simpangan baku jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi setelah diberi vitamin A selama 9 hari

Perlakuan	N	Jumlah sel kondrosit $\pm$ SD
K	10	5,80 $\pm$ 1,14
A	10	5,00 $\pm$ 0,94
B	10	4,30 $\pm$ 0,82
C	10	4,20 $\pm$ 0,92

Keterangan :

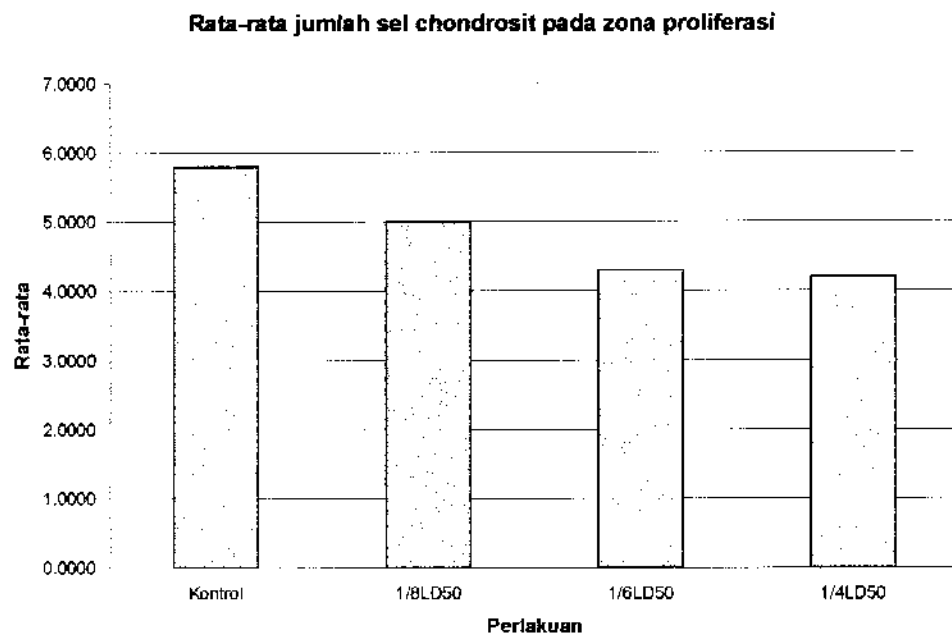
K = kelompok kontrol

A = kelompok  $1/8$  LD<sub>50</sub>

B = kelompok  $1/6$  LD<sub>50</sub>

C = kelompok  $1/4$  LD<sub>50</sub>





Gambar 5.2 Pengaruh pemberian vitamin A dosis berlebihan pada jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi.

Pada tabel 5.2 tersebut di atas terlihat jumlah sel kondrosit pada kelompok kontrol lebih banyak daripada jumlah sel kondrosit dari kelompok yang diberikan larutan emulsi vitamin A selama 9 hari. Sedangkan jumlah sel kondrosit yang paling sedikit terlihat pada kelompok C ( $\frac{1}{4}$  LD<sub>50</sub>).

Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dari ke-4 varians, dari perhitungan diperoleh  $P = 0.685$  (lampiran 4) ini berarti  $P > 0.05$  maka  $H_0$  diterima (variens dari keempat kelompok tersebut homogen).

Tabel 5.5 Ringkasan Anova jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi setelah diberikan emulsi vitamin A selama 9 hari.

Sumber	JK	DB	KT	F Hitung	P
Perlakuan	16.475	3	5.492	5.937	0.002
Sisa	33.300	36	0.925		
Total	49.775	39			

Dari tabel Anova di atas terlihat nilai P hitung 0,002 lebih kecil dari 0,05. Ini berarti  $H_0$  ditolak berarti ada perbedaan jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi di antara ke empat kelompok tersebut. Untuk mengetahui beda nyata terkecil tiap kelompok perlakuan dengan tes Bonferroni dan tes Tukey.

Tabel 5.6 Ringkasan hasil uji BNT jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi

Antara Perlakuan	Beda rata-rata sel proliferasi $\pm$ SD
A dengan B	0,70 $\pm$ 0,43
A dengan C	0,80 $\pm$ 0,43
A dengan K	0,80 $\pm$ 0,43
B dengan C	0,1 $\pm$ 0,43
B dengan K	1,50 $\pm$ 0,43 *
C dengan K	1,60 $\pm$ 0,43 *

Keterangan :

K = kelompok kontrol

A = kelompok  $1/8$  LD<sub>50</sub>

B = kelompok  $1/6$  LD<sub>50</sub>

C = kelompok  $1/4$  LD<sub>50</sub>

Dari hasil uji BNT tersebut di atas jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi setelah diberi larutan emulsi vitamin A dengan dosis tertentu pada setiap kelompok kemudian dievaluasi terlihat perbedaan antara B ( $1/6 LD_{50}$ ) dengan K (kontrol) dan C ( $1/4 LD_{50}$ ) dengan K (kontrol), sedangkan kelompok A ( $1/8 LD_{50}$ ) dengan B ( $1/6 LD_{50}$ ), A ( $1/8 LD_{50}$ ) dengan C ( $1/4 LD_{50}$ ), A ( $1/8 LD_{50}$ ) dengan K (kontrol) tidak ada perbedaan.

### 5.2.2 Jumlah sel kondrosit pada zona hipertrofi

Rata-rata jumlah sel kondrosit pada zona hipertrofi setelah pemberian larutan emulsi vitamin A selama 9 hari dapat dilihat pada tabel berikut ini :

Tabel 5.7 Rata-rata dan simpangan baku sel kondrosit pada zona hipertrofi / maturasi

Perlakuan	N	Rata-rata sel kondrosit $\pm$ SD
K	10	5,20 $\pm$ 0,42
A	10	4,80 $\pm$ 0,63
B	10	4,50 $\pm$ 0,53
C	10	4,40 $\pm$ 0,52

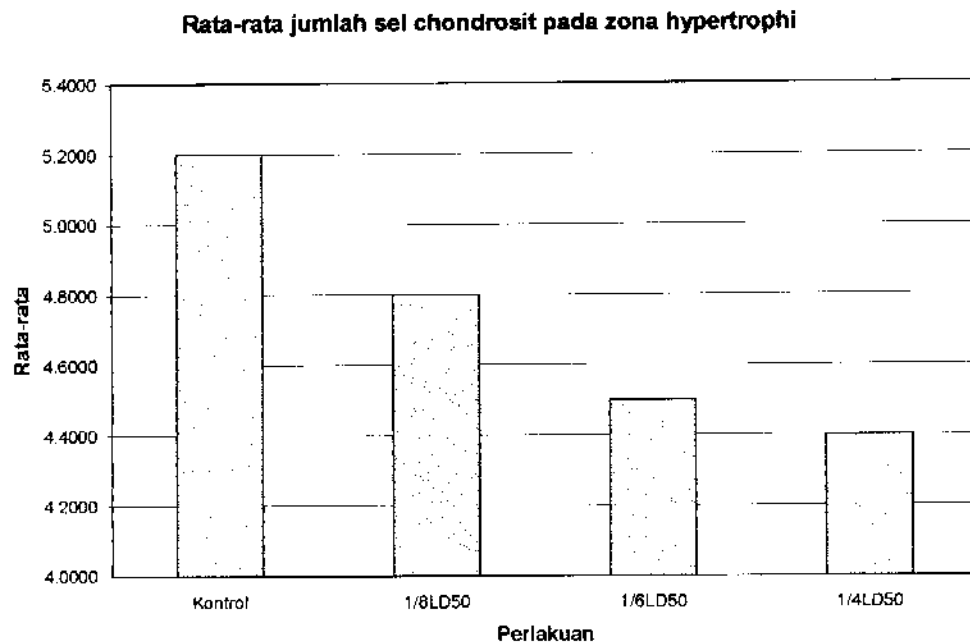
Keterangan :

K = kelompok kontrol

A = kelompok  $1/8 LD_{50}$

B = kelompok  $1/6 LD_{50}$

C = kelompok  $1/4 LD_{50}$



**Gambar 5.3 Pengaruh pemberian vitamin A dosis berlebihan pada jumlah sel kondrosit zona hipertrofi/maturasi**

Pada tabel 5.3 tersebut di atas terlihat jumlah sel kondrosit pada zona hipertrofi kelompok kontrol lebih banyak daripada jumlah sel kondrosit dari kelompok yang diberikan larutan emulsi vitamin A selama 9 hari. Sedangkan jumlah sel kondrosit yang paling sedikit terlihat pada kelompok C ( $\frac{1}{4} LD_{50}$ ).

Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dari ke-4 varians, dari perhitungan diperoleh  $P = 0.294$  (lampiran 6) ini berarti  $P > 0.05$  maka  $H_0$  diterima (variens dari keempat kelompok tersebut homogen).

Tabel 5.8 Ringkasan Anova jumlah sel kondrosit pada zona hipertrofi setelah diberikan larutan emulsi vitamin A selama 9 hari

Sumber	JK	DB	KT	F Hitung	P
Perlakuan	3.875	3	1.292	4.604	0.008
Sisa	10.100	36	0.281		
Total	13.975	39			

Dari tabel Anova di atas terlihat nilai P hitung 0,008 lebih kecil dari 0,05. Ini berarti  $H_0$  ditolak berarti ada perbedaan jumlah sel kondrosit pada zona hipertrofi di antara ke empat kelompok tersebut. Untuk mengetahui beda nyata terkecil tiap kelompok perlakuan dengan tes Bonferroni dan tes Tuckey.

Tabel 5.9 Ringkasan Hasil uji BNT sel kondrosit pada zona hipertrofi

Antara perlakuan	Beda rata-rata sel kondrosit $\pm$ SD
A dengan B	0,30 $\pm$ 0,24
A dengan C	0,40 $\pm$ 0,24
A dengan K	0,40 $\pm$ 0,24
B dengan C	0,10 $\pm$ 0,24
B dengan K	0,70 $\pm$ 0,24 *
C dengan K	0,80 $\pm$ 0,24 *

Keterangan :

K = kelompok kontrol

A = kelompok  $1/8$  LD<sub>50</sub>

B = kelompok  $1/6$  LD<sub>50</sub>

C = kelompok  $1/4$  LD<sub>50</sub>

Dari hasil uji BNT tersebut di atas jumlah sel kondrosit pada zona hipertrofi setelah diberi emulsi vitamin A dengan dosis tertentu pada setiap kelompok kemudian dievaluasi terlihat perbedaan antara B ( $1/6 LD_{50}$ ) dengan K (kontrol), dan C ( $1/4 LD_{50}$ ) dengan K (kontrol), sedangkan kelompok A ( $1/8 LD_{50}$ ) dengan B ( $1/6 LD_{50}$ ), A ( $1/8 LD_{50}$ ) dengan C ( $1/4 LD_{50}$ ), A ( $1/8 LD_{50}$ ) dengan K (kelompok kontrol) tidak ada perbedaan.

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Vitamin A sangat penting bagi kesehatan mata, pertumbuhan, reproduksi, maupun sistem kekebalan tubuh, namun bila kadarnya berlebihan justru akan berdampak negatif, antara lain dapat menghambat pertumbuhan tulang dan meningkatkan resiko patah tulang (Anonim, 2003).

Vitamin A diketahui mempunyai peranan sangat penting dalam aktifitas sel-sel pada epifisis tulang rawan yang harus menjadi suatu siklus pertumbuhan normal, maturasi/pendewasaan dan degenerasi selama proses osifikasi (Shaw dan Sweeney, 1992; Linder, 1992).

Hipervitaminosis A menyebabkan terhambatnya pertumbuhan oleh karena penutupan epifisis terlalu cepat dapat terjadi pada anak (Hedi, 1995).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh hipervitaminosis A terhadap panjang tulang femur, jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi dan hipertrofi/maturasi pada *epiphyseal plate* (garis pertumbuhan tulang). Rancangan penelitian menggunakan *Postest Only Control Group Design* (Zainuddin, 2000).

Sampel yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jantan, umur 3-4 minggu. Pengukuran variabel tergantung adalah panjang tulang femur, jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi dan hipertrofi/maturasi pada *epiphyseal plate*.

Pengamatan dilakukan terhadap tulang femur, preparat jaringan femur yaitu bagian zona proliferasi dan hipertrofi/maturasi dari *epiphyseal plate* yang diwarnai dengan HE. Dilakukan pengamatan setelah perlakuan selama 9 hari, dan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

### **6.1 Pemberian Vitamin A Dosis Berlebihan terhadap Panjang Tulang Femur**

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian vitamin A  $1/8 LD_{50}$ ,  $1/6 LD_{50}$  dan  $1/4 LD_{50}$  secara peroral selama 9 hari pada mencit (*Mus musculus*) jantan umur 3-4 minggu mempunyai pengaruh secara signifikan ( $p < 0,05$ ) terhadap panjang tulang femur dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penurunan panjang tulang femur terjadi akibat terhambatnya pertumbuhan oleh karena penutupan epifisis yang terlalu cepat (Hedi, 1995).

Penelitian pada mencit muda ditemukan bahwa hipervitaminosis A menghambat aktifitas diferensiasi dan proliferasi kondrosit dan osteoblast (Takaki *et al*, 1996).

Vitamin A yang diberikan dalam jumlah besar akan mengaktifkan lisosom untuk melepaskan protease yang berakibat pada penurunan komponen protein struktural pada matriks tulang rawan (kartilago) dan mengakibatkan hilangnya mukopolisakarida, sehingga akan menyebabkan pemendekan panjang tulang (Bangham, 1964 *cit* Kiptiyah, 2002).

Perpanjangan tulang ini secara keseluruhan, tergantung pada pertumbuhan tulang rawan yang terletak antara dua pusat penulangan yang menjalar kearahnya dari dua arah yang terus meninggi (Gunarso, 1978). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian dimana pada sel-sel kondrosit pada zona proliferasi dan zona hipertrofi/maturasi didapatkan jumlah sel yang menurun pada zona-zona tersebut dengan penambahan dosis yang semakin meningkat, sehingga akan mempengaruhi panjang tulang.



Kinney (1996) melaporkan bahwa pada keracunan vitamin A pada anak ayam menyebabkan pemendekan tulang panjang dan rotasi dari epifisis.

Hipervitaminosis A pada anak-anak menyebabkan terhentinya pertumbuhan yang terjadi terutama bagian distal dari tulang femur (Bryan, 2001).

## **6.2 Pemberian Vitamin A Dosis Berlebihan pada Jumlah Sel Kondrosit Zona Proliferasi**

Dalam penelitian ini pemberian vitamin A dosis berlebihan peroral mengakibatkan penurunan jumlah sel kondrosit secara signifikan pada zona proliferasi bila dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Mc Kinney (1996), pada pemberian vitamin A berlebihan mengakibatkan hambatan proliferasi kondrosit dan mengurangi sintesis dari RNA dan protein. Akibat langsung dari hambatan proliferasi sel kondrosit ini akan mengakibatkan hambatan bertambah banyaknya sel kondrosit pada zona proliferasi pada garis pertumbuhan, sehingga menyebabkan penurunan jumlah sel kondrosit .

*Retinoic acid* yang tidak disimpan kurang beracun daripada retinol dan retinal tetapi mempunyai pengaruh yang serius pada tulang kalau dikonsumsi dalam jumlah yang banyak dalam jangka waktu yang lama (Linder,1992).

Berdasarkan penelitian dari De Luca *et al* (2000) *retinoic acid* menghambat pertumbuhan tulang melalui 3 mekanisme : yaitu 1) *retinoic acid* menghambat proliferasi kondrosit, 2) *retinoic acid* menghambat hipertrofi kondrosit, 3) *retinoic acid* menghambat sintesis matrik tulang.

Pemberian *retinoid acid*, *all-trans-retinoic acid* dan *13-cis-retinoic acid* dosis tinggi pada kelinci yang diberikan secara injeksi intraperitoneal mengakibatkan penutupan dini *epiphyseal plate*, dan pada sediaan histologi tampak hilangnya warna basofilik pada matriks ekstraseluler dan invasi osteoklast pada *epiphyseal plate* (Standeven *et al*, 1996).

## 6.2 Pemberian Vitamin A Dosis Berlebihan pada Sel Kondrosit pada Zona Hipertrofi / Maturasi

Pada zona hipertrofi/maturasi jumlah sel kondrosit juga didapatkan hasil penurunan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) sesuai dengan besarnya dosis vitamin A yang diberikan. Hal ini disebabkan karena jumlah sel kondrosit pada zona maturasi merupakan pematangan dari zona proliferasi (Gunarso, 1979). Dengan menurunnya jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi akan mengakibatkan jumlah sel kondrosit pada zona hipertrofi juga menurun.

Dari hasil penelitian dikatakan bahwa *retinoic acid* mungkin berhubungan dengan osifikasi endokondral yaitu menghambat proses yang berhubungan dengan maturasi selama maturasi kondrosit (Pacifci *et al*, 1991).

Diketahui pula pada bayi babi dan ayam pemberian vitamin A dosis tinggi menyebabkan pemendekan tulang panjang, dan rotasi epifisis, secara histologik dikatakan penyempitan dan penipisan *epiphyseal plate* terjadi karena hambatan dari proliferasi kondrosit dan penurunan ukuran hipertrofi kondrosit. Keracunan vitamin A ini juga merangsang terjadinya osteoporosis karena penurunan jumlah sel osteoblast, sel osteoid, penipisan korteks, dan pemendekan bagian metafisis tulang panjang (Mc Kinney, 1996).

Pemberian *retinoid acid* berlebihan pada mencit muda mengakibatkan gangguan pada struktur kartilago, yaitu pada *epiphyseal plate* tampak penipisan dan hambatan pada proliferasi dan maturasi dari kondrosit, pada zona erosi ditemukan penurunan jumlah kondrosit dan osteoblast (Anonim, 2004).

## **BAB 7**

### **PENUTUP**

#### **7.1 Kesimpulan**

Dari hasil penelitian dan pengolahan data secara analisa kuantitatif ternyata hipotesis yang diajukan terbukti, sehingga dapat disimpulkan :

1. Pemberian vitamin A dosis berlebihan dengan dosis  $1/8 LD_{50}$ ,  $1/6 LD_{50}$ ,  $1/4 LD_{50}$  pada anak mencit jantan selama 9 hari berturut-turut terhadap panjang tulang femur kanan, ternyata pada ke-tiga kelompok perlakuan terjadi hambatan pertumbuhan panjang tulang femur.
2. Pemberian vitamin A dosis berlebihan dengan dosis  $1/8 LD_{50}$ ,  $1/6 LD_{50}$ ,  $1/4 LD_{50}$  pada anak mencit jantan selama 9 hari berturut-turut terhadap gambaran histologik dari zona proliferasi pada garis pertumbuhan tulang femur ternyata pada ketiga kelompok perlakuan terjadi penurunan jumlah sel kondrosit.
3. Pemberian vitamin A dosis berlebihan dengan dosis  $1/8 LD_{50}$ ,  $1/6 LD_{50}$ ,  $1/4 LD_{50}$  pada anak mencit jantan selama 9 hari berturut-turut terhadap gambaran histologik dari zona hipertrofi/maturasi pada garis pertumbuhan tulang femur ternyata pada ketiga kelompok perlakuan terjadi penurunan jumlah sel kondrosit.

#### **7.2 Saran**

Atas dasar hasil penelitian tentang pemberian vitamin A berlebihan pada pertumbuhan tulang femur anak mencit maka perlu dilakukan penelitian serupa untuk mengetahui :

1. Berapa dosis vitamin A yang tidak mengakibatkan kelainan pada tulang.
2. Adakah proses regenerasi dari pertumbuhan tulang yang terhambat dan berapa lama waktu yang diperlukan untuk proses regenerasi tersebut.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agus ZAN, 1995. Vitamin A dan Malnutrisi : Suatu Tinjauan Biokimia. Medika, Vol 21, No 12, hlm 959-960.
- Anonim, 2004, Vitamin A, [http// www.medicastore.com](http://www.medicastore.com), (diakses pada 26/5/2004)
- Anonim, 2004, Retinoids disrupt the ordered structure of bone and skin, while calcium-channel blockers alter gum structure. [http//www.roche/pages/facets/17/histopathoe.htm](http://www.roche/pages/facets/17/histopathoe.htm), (diakses pada 3/7/2004).
- Budiman H, 1994. Masalah kekurangan Vitamin A dan Penanggulangannya. Warta Kesehatan Perkotaan Jaringan Komunikasi Kelompok Studi Perkotaan. No 011, Agustus- Desember, hlm 20-21.
- Bloom W, Fawcett DW, 1971. A Textbook of Histology, 9<sup>th</sup> edition, Philadelphia : W.B.Sounders company, pp 235-252.
- Coom GF, 1992. The Vitamin : Fundamental Aspect In Nutrition And Health. New York : Akademik Press Inc, pp 123-135.
- Copenhaver WM, Kelly DE, Wood RL, 1987. Bailey's Textbook of Histology. 17<sup>th</sup> ed. Baltimore : Waverly Press Inc, pp 194.
- Churh DC, Pond WG, 1988. Fat Soluble Vitamins (In Basic Animal Nutrition And Feeding), pp 224.
- Dawn B, Marks, Alan D, Colen M, Smith, 1966. Biokimia Kedokteran Dasar : Sebuah Pendekatan Klinis. Jakarta : EGC, hlm 714-715.
- De Luca F, Uyeda JA, Mericq V, Mancilla EE, Yanovski JA, Barnes KV, Zile MH, Baron, 2000. Retinoic acid is potent regulator of growth plate chondrogenesis, J. Endocrinology Vol 141, No 1 346 -353
- Endang A, 1985. Gambaran Histologik Garis Pertumbuhan Tulang Femur Anak Mencit Setelah Penyuntikan Berganda Tetracyclin Intramusculer. Tesis. Universitas Airlangga, hlm 16.
- Fawcett DW, 1994. Tulang, Buku ajar Histologi. Ed 12. Jakarta : EGC, hlm193.
- Ganong WF, 2001. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Jakarta: EGC, hlm 302.
- Gardner J, 1982. What You Should Know About Vitamin In Eat Better, Live Better. New York : Printed in The United States Of America, pp 32-34

- Gunawan, 1974. Penyakit Mata yang berhubungan dengan kurangnya kemampuan masyarakat, *J.Ked. Gajah Mada*. 1974.6(3): 81-84
- Gridly MF, 1960. *Manual of Histologic and Special Staining Technics*. Amerika : Mc Graw Hill Book Company, pp 60.
- Hafez E, 1970. *Reproduksi and Breeding Techniques For Laboratory Animal*, Philadeldhia, pp 305-311.
- Hough S, Avioli LV, Mair H, 1988. Effects of hypervitaminosis A on the bone and mineral metabolism of the rat, *Abstracts Endocrinology* 122(6); 2933.
- Jacoby RO, Fox FG, 1984. *Biology and Disease of mice*. In (Fox JG, Gohen BJ, Loew FM). *Laboratory animal Medicine*. San Diego : Academic Press, Inc, pp 36-44.
- Junqueira LC , Carneiro J, 1980. *Basic Histology*, 3<sup>rd</sup> ed. Jakarta : EGC, pp 137-143.
- Kiptiyah, 2002. *Efek Teratogenik Vitamin A Pada Mencit (Mus musculus) Betina*. Tesis. Universitas Airlangga, hlm 66-67.
- Kusumawati D, 2003. *Bahan Ajar Tentang Hewan Coba*, Universitas Airlangga, Surabaya, hlm 45-46.
- Linder MC, 1992. *Biokimia Nutrisi dan Metabolisme*. Jakarta : Universitas Indonesia Press, hlm 180-184.
- Liss AR, 1987. *Teratology Society Position Paper : Recommendations For Vitamin A Use During Pregnancy*, *Journal Teratology* 35:269-275.
- LTC Lunn McKinney, 1996. *Results AFIP Wednesday Slide Conference-No.13*.
- Mahoney CP, 1990. *Vitamin A and D and Their Analogues*. In (Lester M, James F, Haddad). *Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose*. 3<sup>rd</sup> edition, New York : W.B Saunders Company, pp 1441.
- Mc Dowell LR, 1989. *Vitamin In Animal Nutrition Comperative Aspects to Human Nutition*. San Diego : Academic Press Inc, pp : 53-54
- Melhus H, Michaelsson K, Kindmark A, Bergstrom R, Halmberg, Mailman H, 1998. Excess dietary intake of vitamin A is associated with reduced bone mineral dencity and increased risk for hip fracture, *Anals of Internal Medicine*, Vol 29, No 10 : 770-778.

- Myrnawati, 1997. Kebijakan Pemberian Vitamin A dan Dampaknya pada Kesakitan dan Kematian Bayi dan Anak. *Jurnal Kedokteran YARSI*, Vol 5, No 1, hlm 106-117.
- Muhilal, 2001. Konsekuensi Kurang Vitamin A pada Anak. *Gizi Indonesia*, 25 : 30-36.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA., Rodwel VW, 2000. *Harper's Biochemistry*, 25<sup>th</sup> edition. Amerika : Mc Graw Hill Book Company, pp 642-643.
- Mustchler, Ernest, 1991. *Vitamin Dalam Dinamika Obat. Buku Ajar Farmakologi dan Toksikologi*. Edisi 5. Bandung : ITB, hlm 596-597.
- Obgyn-net, 1999, *Vitamin A woman's health*. San Diego : The Medicine Chest, pp1-4.
- Okita J, 1997. *Vitamin A*. London : WSU College of Pharmacy, pp 1-9.
- Pacifici M, Golden EB, Iwamoto M, Adams SL, 1991. Retinoic acid induced type x collagen gene expression in culture chick chondrogenesis. *Exp cell Res* 195 (1): 38-46.
- Pratikya AW, 2001. *Rancangan Penelitian Experimental Pola Umum Dalam Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan*. edisi 1. Jakarta: PT. Raja Corafindo Persana, hlm 129-130.
- Pujiadi S, 2000. *Ilmu Gizi pada Anak*. edisi 4. Jakarta : Balai Penerbit FKUI, hlm 157-158.
- Purjanto, 1994. *Social Marketing vitamin A*. *Majalah Kesehatan Masyarakat, Departemen Kesehatan R.I.*, No 49, Tahun XXIII.
- Robert, 1994. *Toxicology of Retinoid*. In (Googman Dewitts ). *The Retinoid : Biology, chemistry and Medicine*. 2<sup>nd</sup> edition. New York : Raven Press, pp 545-572.
- Rosmiati H, Wardhini S, 1995. *Vitamin dan Mineral dalam Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4, Jakarta : Gaya Baru, hlm 714-727.
- Sastrosoepadi A, 1995. *Rancangan Percobaan Praktis untuk bidang Pertanian*. Yogyakarta : Kanisus, hlm19, 38, 51, 193-199.
- Shaw JH, Sweeney, 1980. *Modern Nutr. In Health and Disease*. Edisi 6., Philadelphia : Lea & Febiger, pp 855.



- Sudiana. *Tehnik Praktis untuk Jaringan – Sel*. CV. Dharma Shandi : Bali, Indonesia, hlm 7 – 19.
- Smith BJ, Mangkoewidjojo S, 1988. *Pemeliharaan dan Penggunaan Hewan Coba di Daerah Tropis*. Jakarta : Universitas Indonesia Press, hlm 14.
- Standeven AM, Davies PJ, Chandraratna RA, Moder DR, 1996. Retinoid induce epiphyseal plate closure in guinea pigs. *Fundamental Appl Toxicolo*, Nov; 34(1):91-98.
- Snedecor GW, Cochran WG, 1976. *Statistical Methods* 6<sup>th</sup> ed. The Low a State. University Press – USA, pp 113.
- Sommer A, Tarwoto I, Husaini, Muhilal, Susanto D, 1980. History of Night Blindness: A Simple Tool For Xerophthalmia Screening. *Am.J.Clin.Nutr.* 1980:33:887-891.
- Soedioetama AD, 2000. *Vitamin A dalam Ilmu Gizi*. Jakarta : Dian Raya press, hlm116.
- Tjay TH, Raharja K, 2002. *Obat-obat Penting ; Khasiat, Penggunaan, dan efek-efek sampingnya*. Edisi ke 5. Jakarta : Elex Media Komputindo, Hlm 801.
- Tanner MS, Lama M, 1991. *Nutrition and Liver Disease*. In (Mc Laren D, Burma D, Belton NR, Williams AF, eds). *Text Book of Paediatric Nutrition*. 3<sup>rd</sup> edition. London : Churrchill Livingstone, pp:186.
- Tobing H, Sihotang J, 1979. *Tulang dalam Essential of Histologi*, edisi 8, Terjemahan Gunarso Wisnu. Jakarta: Erlangga, hlm 69-87.
- Wahyuni LA, Manoe ZJ, Yoshida, Wakaisaka H, Yohro T, 1991. Efek Hipervitaminosis A Terhadap Perkembangan Tulang Ektremitas Embrio Mencit dilihat dengan Pewarnaan Ganda. *Konas VII PAAI*, hlm 31-32.
- Zainuddin M, 2000. *Rancangan Penelitian Eksperimental*. Dalam *Metodologi Penelitian*. Surabaya : Universitas Airlangga, hlm 53-54.

## Lampiran I

**Data kontrol dan perlakuan panjang tulang femur pada hewan coba setelah pemberian Vitamin A berlebihan**

## Panjang Tulang Femur (cm)

No	Kontrol	1/8LD50	1/6LD50	1/4LD50
1	1.195	1.230	1.220	1.220
2	1.340	1.320	1.255	1.225
3	1.330	1.325	1.200	1.230
4	1.260	1.320	1.285	1.230
5	1.255	1.220	1.240	1.290
6	1.295	1.245	1.290	1.190
7	1.325	1.200	1.270	1.170
8	1.345	1.220	1.200	1.210
9	1.390	1.275	1.215	1.250
10	1.230	1.220	1.220	1.200

## Lampiran 2

**Hasil analisis Anova satu arah dan LSD pengaruh pemberian vitamin A  
berlebihan terhadap panjang tulang femur mencit jantan**

## Oneway

## Descriptives

Panjang tulang femur (cm)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	10	1.29650	6.028E-02	1.91E-02	1.25338	1.33962	1.195	1.390
1/8LD50	10	1.25750	4.843E-02	1.53E-02	1.22285	1.29215	1.200	1.325
1/6LD50	10	1.23950	3.378E-02	1.07E-02	1.21533	1.26367	1.200	1.290
1/4LD50	10	1.22150	3.317E-02	1.05E-02	1.19777	1.24523	1.170	1.290
Total	40	1.25375	5.185E-02	8.20E-03	1.23717	1.27033	1.170	1.390

## Test of Homogeneity of Variances

Panjang tulang femur (cm)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.839	3	36	.052

## ANOVA

Panjang tulang femur (cm)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.085E-02	3	1.028E-02	5.003	.005
Within Groups	7.399E-02	36	2.055E-03		
Total	.105	39			

## Lanjutan lampiran 2

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Panjang tulang femur (cm)

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	1/8LD50	3.90E-02	2.03E-02	.062	-2.12E-03	8.01E-02
	1/6LD50	5.70E-02*	2.03E-02	.008	1.588E-02	9.81E-02
	1/4LD50	7.50E-02*	2.03E-02	.001	3.388E-02	.11612
1/8LD50	Kontrol	-3.9E-02	2.03E-02	.062	-8.01E-02	2.12E-03
	1/6LD50	1.80E-02	2.03E-02	.381	-2.31E-02	5.91E-02
	1/4LD50	3.60E-02	2.03E-02	.084	-5.12E-03	7.71E-02
1/6LD50	Kontrol	-5.7E-02*	2.03E-02	.008	-9.81E-02	-1.6E-02
	1/8LD50	-1.8E-02	2.03E-02	.381	-5.91E-02	2.31E-02
	1/4LD50	1.80E-02	2.03E-02	.381	-2.31E-02	5.91E-02
1/4LD50	Kontrol	-7.5E-02*	2.03E-02	.001	-.11612	-3.4E-02
	1/8LD50	-3.6E-02	2.03E-02	.084	-7.71E-02	5.12E-03
	1/6LD50	-1.8E-02	2.03E-02	.381	-5.91E-02	2.31E-02

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

## Lampiran 3

**Data kontrol dan perlakuan gambaran histologik jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi pada garis pertumbuhan pada tulang.**

Jumlah sel kondrosit pada zona proliferasi

No	Kontrol	1/8LD50	1/6LD50	1/4LD50
1	7	5	5	5
2	6	5	4	3
3	7	6	5	5
4	4	3	4	4
5	6	5	5	5
6	6	6	5	4
7	4	5	3	5
8	5	4	4	3
9	7	5	3	5
10	6	6	5	3

## Lampiran 4

**Hasil Analisis Anova satu arah dan LSD jumlah sel kondrosit pada  
zona proliferasi pada mencit jantan**

## Oneway

## Descriptives

Jumlah sel chondrosit pada zona proliferasi

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	10	5.80	1.14	.38	4.99	6.61	4	7
1/8LD50	10	5.00	.94	.30	4.33	5.67	3	6
1/6LD50	10	4.30	.82	.26	3.71	4.89	3	5
1/4LD50	10	4.20	.92	.29	3.54	4.86	3	5
Total	40	4.83	1.13	.18	4.46	5.19	3	7

## Test of Homogeneity of Variances

Jumlah sel chondrosit pada zona proliferasi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.499	3	36	.685

## ANOVA

Jumlah sel chondrosit pada zona proliferasi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16.475	3	5.492	5.937	.002
Within Groups	33.300	36	.925		
Total	49.775	39			

## Lanjutan lampiran 4

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah sel chondrosit pada zona proliferasi  
LSD

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	1/8LD50	.80	.43	.071	-7.23E-02	1.67
	1/6LD50	1.50*	.43	.001	.63	2.37
	1/4LD50	1.60*	.43	.001	.73	2.47
1/8LD50	Kontrol	-.80	.43	.071	-1.67	7.23E-02
	1/6LD50	.70	.43	.112	-.17	1.57
	1/4LD50	.80	.43	.071	-7.23E-02	1.67
1/6LD50	Kontrol	-1.50*	.43	.001	-2.37	-.63
	1/8LD50	-.70	.43	.112	-1.57	.17
	1/4LD50	1.00E-01	.43	.817	-.77	.97
1/4LD50	Kontrol	-1.60*	.43	.001	-2.47	-.73
	1/8LD50	-.80	.43	.071	-1.67	7.23E-02
	1/6LD50	-1.00E-01	.43	.817	-.97	.77

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

## Lampiran 5

**Data kontrol dan perlakuan gambaran histologik jumlah sel kondrosit pada zona hipertrofi/maturasi pada garis pertumbuhan pada tulang femur**

Jumlah sel kondrosit pada zona hipertrofi/maturasi

No	Kontrol	1/8LD50	1/6LD50	1/4LD50
1	6	6	5	5
2	5	5	4	3
3	6	5	5	5
4	5	4	5	4
5	5	5	5	5
6	5	4	4	4
7	5	4	4	5
8	5	5	4	3
9	5	5	5	5
10	6	5	4	3



## Lampiran 6

**Hasil analisis Anova satu arah dan LSD jumlah sel kondrosit pada  
zona hipertrofi / maturasi.**

## Oneway

## Descriptives

Jumlah sel chondrosit pada zona hypertrophi

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	10	5.20	.42	.13	4.90	5.50	5	6
1/8LD50	10	4.80	.63	.20	4.36	5.25	4	6
1/6LD50	10	4.50	.53	.17	4.12	4.88	4	5
1/4LD50	10	4.40	.52	.16	4.03	4.77	4	5
Total	40	4.72	.60	9.46E-02	4.53	4.92	4	6

## Test of Homogeneity of Variances

Jumlah sel chondrosit pada zona hypertrophi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.287	3	36	.294

## ANOVA

Jumlah sel chondrosit pada zona hypertrophi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.875	3	1.292	4.604	.008
Within Groups	10.100	36	.281		
Total	13.975	39			

## Lanjutan lampiran 6

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

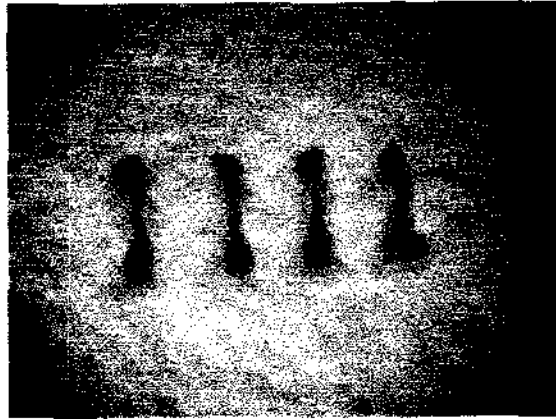
Dependent Variable: Jumlah sel chondrosit pada zona hypertrophi  
LSD

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	1/8LD50	.40	.24	.100	-8.04E-02	.88
	1/8LD50	.70*	.24	.005	.22	1.18
	1/4LD50	.80*	.24	.002	.32	1.28
1/8LD50	Kontrol	-.40	.24	.100	-.88	8.04E-02
	1/8LD50	.30	.24	.213	-.18	.78
	1/4LD50	.40	.24	.100	-8.04E-02	.88
1/6LD50	Kontrol	-.70*	.24	.005	-1.18	-.22
	1/8LD50	-.30	.24	.213	-.78	.18
	1/4LD50	1.00E-01	.24	.675	-.38	.58
1/4LD50	Kontrol	-.80*	.24	.002	-1.28	-.32
	1/8LD50	-.40	.24	.100	-.88	8.04E-02
	1/6LD50	-1.00E-01	.24	.675	-.58	.38

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

## Lampiran 7

## Gambar makroskopis

Tulang femur anak mencit (*Mus musculus*)

## Lampiran 8

**Foto Kelompok Kontrol**

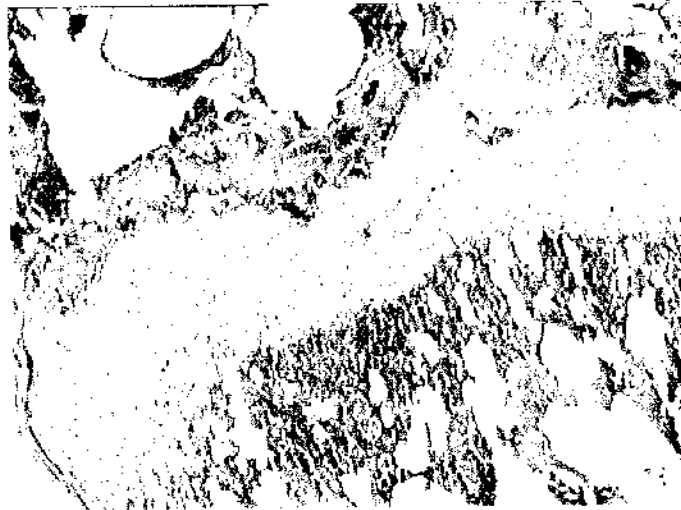
Gambar histologis tulang femur kelompok kontrol  
pewarnaan HE pada pembesaran 40X



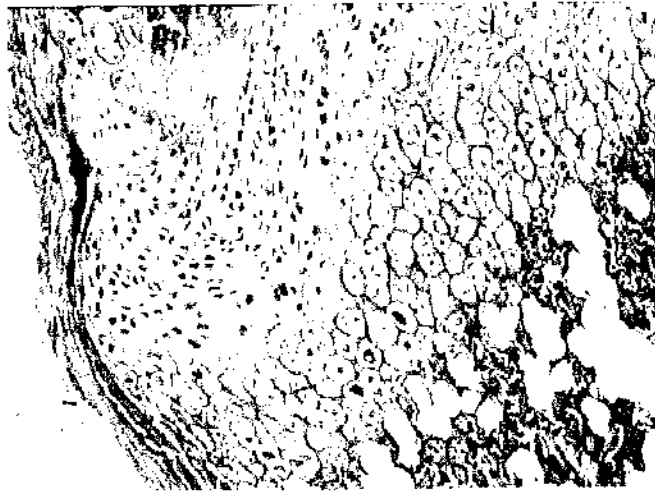
Gambar histologis tulang femur kelompok kontrol  
pewarnaan HE pada pembesaran 100X

## Lampiran 9

**Foto Kelompok Perlakuan  
Vitamin A 1/8 LD<sub>50</sub>**



Gambar histologis tulang femur kelompok 1/8 LD<sub>50</sub>  
pewarnaan HE pada pembesaran 40X



Gambar histologis tulang femur kelompok 1/8 LD<sub>50</sub>  
pewarnaan HE pada pembesaran 100X

## Lampiran 10

**Foto Kelompok Perlakuan  
Vitamin A 1/6 LD<sub>50</sub>**



Gambar histologis tulang femur kelompok 1/6 LD<sub>50</sub>  
pewarnaan HE pada pembesaran 40X



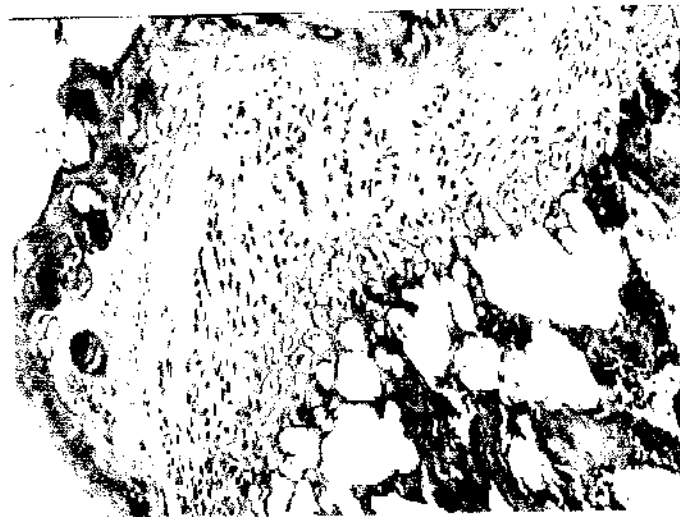
Gambar histologis tulang femur kelompok 1/6 LD<sub>50</sub>  
pewarnaan HE pada pembesaran 100X

## Lampiran 11

**Foto Kelompok Perlakuan  
Vitamin A  $\frac{1}{4}$  LD<sub>50</sub>**



Gambar histologis tulang femur kelompok  $\frac{1}{4}$  LD<sub>50</sub>  
pewarnaan HE pada pembesaran 40X



Gambar histologis tulang femur kelompok  $\frac{1}{4}$  LD<sub>50</sub>  
pewarnaan HE pada pembesaran 100X