

Pengaruh Pemberian Kitosan Cangkang Udang Putih (*Penaeus merguensis*) terhadap Ketebalan Trabekular Femur Tikus Wistar Betina Pasca Ovariectomi

(*The Effect of White Shrimp (Penaeus merguensis) Shells Chitosan on the Trabecular Thickness of Femoral Female Wistar Rats Post Ovariectomy*)

Suci Rizalah I, Muhammad Hasan, Septa Surya Wahyudi
Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Jl Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail: sucirizalah@gmail.com

Abstract

There are low bone density and defects in bone micro-architecture which led to a significant increases of bone fragility and bone fracture in osteoporosis, due to an oestrogen deficiency in post-menopause woman. Natural polymer which has potential action on bone remodelling is chitosan. Chitosan can reduce the production of IL-1, IL-6, TNF- α and PGE₂ osteoclast cell as well as increase osteoblast cell differentiation in bone formation process. The study aimed to determine the effect of chitosan white shrimp shell on the trabecular thickness of femur female wistar rats post-ovariectomy. This research was the quasi experimental laboratory research using female wistar rats that were divided into three groups; a non-ovariectomy as control, a negative ovariectomy, and an ovariectomy treatment group that was given chitosan 0,05 g/day. After 14 days, the experimental mice were euthanized and trabecular thickness was measured. There were 59,53 μ m, 32,44 μ m and 78,43 μ m trabecular thickness in the control group, the negative control group and the treatment group, respectively. The data were analysed using one way ANOVA and they showed a significant differences between all groups ($p=0,000$). It can be concluded that the chitosan of white shrimp shell can significantly increase trabecular thickness femur female wistar rats post-ovariectomy.

Keywords: Osteoporosis, Chitosan, Ovariectomy, Trabecular Thickness

Abstrak

Osteoporosis merupakan keadaan massa tulang rendah dan perubahan mikroarsitektur jaringan tulang yang mengakibatkan peningkatan fragilitas tulang dan risiko fraktur tulang akibat defisiensi estrogen pada wanita pasca menopause. Salah satu polimer alam yang berpotensi dalam *remodelling* tulang adalah kitosan. Kitosan dapat menurunkan IL-1, IL-6, TNF- α dan PgE₂ dari sel osteoklas serta meningkatkan diferensiasi sel osteoblas pada proses formasi tulang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kitosan cangkang udang putih (*Penaeus merguensis*) terhadap ketebalan trabekular femur tikus wistar betina pasca ovariectomi. Penelitian ini merupakan *quasi experimental laboratories* dengan menggunakan tikus wistar betina yang dibagi menjadi tiga kelompok penelitian yaitu kelompok kontrol non-ovariectomi, kontrol negatif ovariectomi dan perlakuan yang dilakukan ovariectomi serta diberikan kitosan 0.05 g/hari. Setelah 14 hari hewan coba dieuthanasia dan dilakukan preparasi untuk penghitungan sel osteoblas. Rata-rata hasil pengukuran ketebalan trabekular kelompok kontrol 59,53 μ m, kelompok kontrol negatif 32,44 μ m dan kelompok perlakuan 78,43 μ m. Analisis data menggunakan *One Way ANOVA* dan didapatkan perbedaan yang signifikan antar kelompok ($p=0,000$). Sehingga, dapat disimpulkan bahwa kitosan cangkang udang putih dapat meningkatkan ketebalan trabekular tulang femur tikus wistar betina pasca ovariectomi.

Kata kunci: Osteoporosis, Kitosan, Ovariectomi, Ketebalan Trabekular.

Pendahuluan

Osteoporosis merupakan salah satu penyakit degeneratif yang ditandai dengan keadaan massa tulang rendah dan perubahan mikroarsitektur jaringan tulang yang mengakibatkan peningkatan fragilitas tulang dan risiko fraktur tulang [1]. Salah satu faktor risiko kejadian osteoporosis adalah defisiensi estrogen pada wanita pascamenopause [2]. Defisiensi estrogen mengakibatkan penurunan diferensiasi osteoblas, penghambatan apoptosis osteoklas dan memicu pelepasan sitokin inflamatori sehingga proses resorpsi tulang terjadi berlebihan serta memicu penurunan densitas massa tulang [3,4].

Hasil survei data Departemen Kesehatan RI tahun 2008 menyatakan peningkatan prevalensi kejadian osteoporosis pada wanita sebesar 30%. Insiden fraktur tulang femur proksimal akibat osteoporosis mencapai 200/100.000 kasus [5, 6]. Angka kejadian kasus osteoporosis ini ditunjang dengan penatalaksanaan yang tidak sempurna meliputi alat pemeriksaan *Dual Energy X-ray Absorptiometry* (DEXA) yang tidak merata di Indonesia dan pemeriksaan biokimia berupa marker *remodelling* tulang yang mahal [3, 7].

Salah satu polimer alam yang berpotensi dalam *remodelling* tulang adalah kitosan. Kitosan didapat dari proses deasetilasi kitin dari cangkang kulit udang [8]. Sumber daya alam yang memiliki persentase kitosan yang cukup potensial dan mudah ditemui adalah cangkang udang putih (*Penaeus merguensis*) [9]. Food and Agriculture Organization United Nation menyatakan Indonesia sebagai negara dengan hasil tangkapan udang putih terbanyak di seluruh Indonesia dan produksi udang putih di Indonesia meningkat sebesar 7,4% per-tahun yang sampai saat ini limbah cangkang udang putih belum dimanfaatkan dengan baik [8, 9, 10]. Kitosan diduga dapat menstimulasi formasi dan menghambat resorpsi tulang [11].

Beberapa laporan penelitian menunjukkan kemampuan kitosan sebagai material dalam regenerasi tulang. Kitosan dapat digunakan sebagai pembawa faktor pertumbuhan seperti PDGF-BB untuk mendorong formasi tulang. Faktor pertumbuhan PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) diproduksi oleh platelet, osteoblas, dan monosit atau makrofag serta dilaporkan memiliki peran dalam migrasi MSCs ke daerah injuri [12]. Menurut Chandra 2014, PDGF berfungsi mendorong sel mesenkim dan osteoblas untuk

bermitosis [13]. Selain itu, kitosan juga dapat meningkatkan formasi dan diferensiasi osteoblas pada proses pembentukan tulang [8]. Namun belum ada pembuktian mengenai pengaruh kitosan cangkang udang putih (*Penaeus merguensis*) terhadap ketebalan trabekular tulang femur tikus wistar betina pasca ovariektomi.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh kitosan cangkang udang putih (*Penaeus merguensis*) terhadap ketebalan tulang femur tikus wistar betina pasca ovariektomi.

Metode Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *quasi experimental laboratory* dengan rancangan penelitian *post test only control group design* [14]. Variabel yang terdapat pada penelitian ini adalah variabel bebas yang merupakan kitosan cangkang udang putih, variabel terikat yaitu ketebalan trabekular pada tulang femur pasca ovariektomi dan variabel terkontrol pada penelitian ini meliputi kriteria sampel penelitian, cara pemberian kitosan serta dosis kitosan.

Sampel yang digunakan adalah 15 ekor tikus wistar betina dengan berat \pm 150-250 gram berusia \pm 3 bulan. Sampel penelitian dikelompokkan menggunakan metode *simple random sampling* dalam 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol non-ovariektomi (K), kelompok kontrol ovariektomi tanpa pemberian kitosan (K-) dan kelompok perlakuan yang dilakukan ovariektomi dengan pemberian kitosan (P). Pada kelompok kontrol ovariektomi (K-) dan kelompok perlakuan (P) dilakukan ovariektomi pada tikus. Setelah 7 hari pasca ovariektomi, kelompok perlakuan (P) diberikan kitosan serbuk yang dilarutkan dalam asam asetat 0,6%:aquades (1:4) secara peroral menggunakan sonde lambung dengan dosis tunggal 0,05 g selama 14 hari. Sedangkan kelompok kontrol non-ovariektomi (K) dan kelompok kontrol ovariektomi (K-) tidak diberi perlakuan apapun.

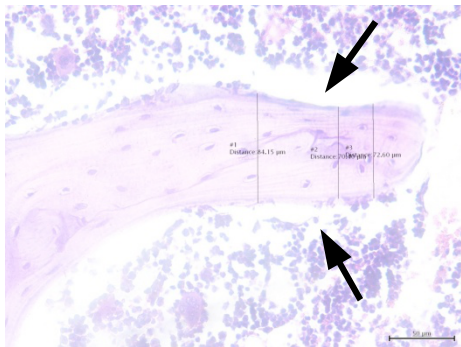
Setelah 14 hari perlakuan, dilakukan *euthanasia* pada semua hewan coba kemudian dilakukan pengambilan jaringan tulang femur dan preparasi jaringan pada tulang femur kanan. Selanjutnya dilakukan pengukuran ketebalan trabekular menggunakan mikroskop kamera Olympus BX53 yang terhubung dengan *Tool Image Software*. Pengukuran dilakukan pada

perbesaran 400x dengan metode *double-blinded*.

Data yang diperoleh dari pengukuran ketebalan trabekular, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro-Wilk*. Pengujian tersebut bertujuan untuk mengetahui data yang diperoleh terdistribusi secara normal atau tidak. Selanjutnya data dianalisis menggunakan *Levene's Test* untuk mengetahui homogenitas varian data, jika data tersebar normal dan varian data homogen maka dilanjutkan dengan Uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui keterkaitan antara variabel bebas dan terikat. Jika terdapat perbedaan bermakna dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference* untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan. Analisis statistik dilakukan dengan program SPSS versi 21.

Hasil Penelitian

Gambaran ciri histologi trabekular dengan perbesaran 400x dapat dilihat pada gambar 1. dan tabel 1 untuk melihat rata-ran ketebalan trabekular.

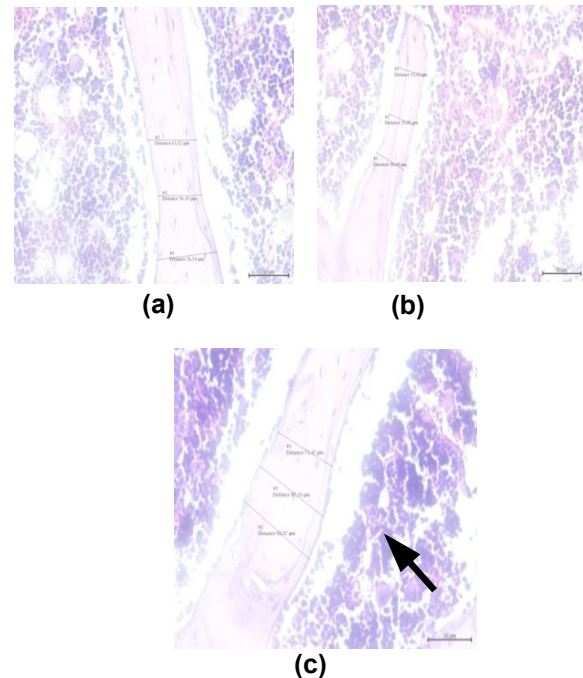


Gambar 1. Tulang trabekular yang diteliti terletak di daerah metafisis, tepat di bawah lempeng epifisis.

Tabel 1. Hasil Rataan dan Standar Deviasi Pengukuran Ketebalan Trabekular (μm)

Kelompok	N	Rata-rata Hasil Pengukuran Trabekular	Standar Deviasi
Kontrol (K)	5	59,53	2,494
Kontrol Negatif (K-)	5	32,44	1,026
Perlakuan (P)	5	78,43	1,491

Gambaran dari hasil pengukuran ketebalan trabekular pada setiap kelompok dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Gambaran histologi trabekular yang dibuat dengan pewarnaan Hematoxillin Eosin (HE) menunjukkan adanya perbedaan ketebalan trabekular pada (a) kelompok kontrol; (b) kelompok kontrol negatif yang dilakukan ovariektomi tanpa pemberian kitosan; (c) kelompok perlakuan yang dilakukan ovariektomi dengan pemberian kitosan 0,05 g/hari

Hasil penelitian yang didapatkan selanjutnya dilakukan analisa data statistik dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Analisa data statistik yang digunakan yaitu uji *Shapiro-Wilk* untuk uji normalitas data dan uji Homogenitas dan *Levene's Test* untuk mengetahui normalitas dan homogenitas antar kelompok. Bila data berdistribusi normal dan varians data homogen maka dilanjutkan dengan uji statistik parametrik *One Way Anova*. Hasil uji *Shapiro-Wilk* dan *Levene's Test* dapat dilihat pada tabel 2 dan 3.

Tabel 2. Hasil uji *Shapiro-Wilk*

	Kontrol	Kontrol negatif	Perlakuan
Sig	0,476*	0,683*	0,591*

Keterangan : * = Data berdistribusi normal (p > 0,05)

Tabel 3. Hasil uji *Levene's Test*

Variabel	p
Ketebalan Trabekular	0,052*

Keterangan : * = Data berdistribusi normal (p > 0,05)

Setelah diketahui bahwa data berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji statistik parametrik *One Way Anova* untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan antara ketiga kelompok penelitian. Hasil uji *One Way Anova* dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji *One Way Anova*

Variabel	p
Ketebalan Trabekular	0,000

Keterangan : * = berbeda signifikan (p < 0,05)

Hasil uji *One Way Anova* didapatkan nilai p=0,000 yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok penelitian karena p<0,05. Setelah itu dilanjutkan uji LSD untuk mengetahui perbedaan antar kelompok penelitian. Data hasil uji LSD dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil uji *Least Significant Difference*

Sampel	Pembandingan Sampel	Sig
Kontrol	Kontrol	0.000*
	Perlakuan	0.000*
Negatif	Kontrol Negatif	0.000*
	Perlakuan	0.000*
Perlakuan	Kontrol Negatif	0.000*
	Kontrol	0.000*

Keterangan : * = berbeda signifikan (p < 0,05)

Hasil uji *Least Significant Difference* menunjukkan hasil yang signifikan (p<0,05), yang berarti terdapat perbedaan ketebalan trabekular secara bermakna pada gambaran histologi jaringan tulang femur antara kelompok kontrol (non-ovarietomi), kelompok kontrol negatif (ovarietomi) tanpa pemberian kitosan dan kelompok perlakuan (ovarietomi) dengan pemberian kitosan.

Pembahasan

Hasil yang ditunjukkan di atas merupakan hasil dari pengukuran ketebalan trabekular dari tiap kelompok penelitian. Kelompok tikus yang tidak diovariectomi/kelompok kontrol (K) memiliki nilai rerata ketebalan trabekular 59,53µm sedangkan kelompok tikus yang diovariectomi/kontrol negatif (K-) memiliki nilai rerata ketebalan trabekular lebih kecil yaitu 32,44µm. Hal ini berarti ketebalan trabekular kelompok kontrol negatif (K-) mengalami penurunan pasca ovariectomi. Penurunan tersebut akibat defisiensi hormon estrogen yang berpengaruh dalam pembentukan tulang. Tindakan ovariectomi memicu defisiensi estrogen yang berpengaruh pada resorpsi tulang setelah dua minggu pasca ovariectomi [15].

Sedangkan pada kelompok perlakuan (P) menunjukkan nilai rerata ketebalan trabekular yaitu 78,43µm. Hal ini menunjukkan bahwa ukuran ketebalan trabekular pada kelompok perlakuan (P) lebih tinggi dibanding dengan kelompok kontrol negatif (K-) yang tidak diberi kitosan. Dari hasil rerata ketebalan trabekular pada gambaran histologi tulang femur kelompok perlakuan yang diberi kitosan 0,05 g/hari selama 14 hari menunjukkan adanya peningkatan. Hal ini diduga diperankan oleh kitosan yang berpengaruh terhadap regulasi remodeling tulang.

Kitosan dapat meningkatkan ekspresi *Bone Morphogenic Protein-2*, (BMP-2), *Bone Morphogenetic Protein-4* (BMP-4), dan *Bone Morphogenetic Protein-6* (BMP-6). BMP-2 merupakan *prototype subgroup* BMPs yang memicu diferensiasi *multipotent mesenchymal progenitor cell lines* menjadi *osteogenic lineage*. BMPs menstimulasi *Antivator Protein-1* (AP-1) untuk meningkatkan ekspresi *Alkaline Phosphatase* (ALP) dan terjadi proses mineralisasi. Kitosan dilaporkan dapat meningkatkan ekspresi *Runt-related transcription factor 2* (Runx2). *Runt-related*

transcription factor-2 (Runx2) merupakan faktor transkripsi dalam regulasi osteogenesis. Baik BMP-2 maupun Runx2 berperan dalam peningkatan biomarker formasi tulang yaitu, *Alkaline Phosphatase* (ALP), *Osteocalcin* (OCN), dan *Osteopontin* (OPN) [16,17].

Kitosan juga dilaporkan memicu peningkatan *Transforming Growth Factor β* (TGF- β) yang dapat menstimulasi aktivitas osteoblas melalui BMP-4 dan BMP-6. Kitosan digunakan sebagai *carried growth factor* untuk meningkatkan pembentukan tulang pada calvaria tikus [12,18]. Kitosan juga dapat digunakan sebagai pembawa faktor pertumbuhan seperti PDGF-BB untuk mendorong formasi tulang. Faktor pertumbuhan PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) diproduksi oleh platelet, osteoblas, dan monosit atau makrofag serta dipercaya memiliki peran dalam migrasi MSCs dan osteoblas ke daerah injuri [12, 13].

Kitosan secara progresif akan menurunkan produksi prostaglandin E₂ dan sitokin inflamatori yaitu IL-1, IL-6 dan TNF- α yang berperan dalam diferensiasi dan aktivasi osteoklas secara langsung melalui RANKL (*Receptor Activator of Nuclear $\kappa\beta$ Ligand*). Prostaglandin E₂ dan sitokin inflamatori juga mampu menghambat pembentukan osteoprotegerin (OPG) yang berfungsi menghambat pembentukan osteoklas. Hal ini menyebabkan pembentukan dan aktivitas osteoklas terganggu sehingga menurunkan tingkat resorpsi tulang sehingga jumlah sel osteoklas mengalami penurunan [8].

Aktivasi sel osteoklas pada resorpsi tulang diawali dengan pengeluaran M-CSF (*Macrophage-Colony Stimulating Factor*) yang akan berikatan dengan reseptornya c-Fms yang terdapat pada prekursor osteoklas sehingga merangsang diferensiasi dan proliferasi progenitor hematopoetik menjadi pre-osteoklas yang kemudian mengekspresikan RANK (*Receptor Activator of Nuclear Factor $\kappa\beta$*). Sel osteoblas dan sel stroma memproduksi OPG yang akan mengikat RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor $\kappa\beta$ Ligand*). Ikatan OPG dan RANK menghambat ikatan RANK dan RANKL, sehingga tidak terjadi pembentukan sel osteoklas pada proses remodeling tulang. Penggunaan kitosan pasca ovariektomi dapat menstimulasi sel makrofag untuk menurunkan produksi mediator prostaglandin E₂ (PGE₂) sehingga aktivitas osteoklastik dapat ditekan dan pembentukan sel osteoblas dapat meningkat. Kitosan dapat menghambat produksi

prostaglandin E₂ (PGE₂) dan sitokin inflamatori yaitu IL-1, IL-6 dan TNF- α [8].

Peningkatan ketebalan trabekular pada kelompok perlakuan diduga akibat peranan kitosan dalam *remodelling* tulang melalui aktivitasnya terhadap osteoblas dan osteoklas. Hambatan resorpsi tulang dan peningkatan formasi tulang mengakibatkan peningkatan ketebalan trabekular yang berpengaruh dalam kepadatan tulang [13,17].

Simpulan dan Saran

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian kitosan cangkang udang putih (*Penaeus merguensis*) selama 14 hari pada tikus wistar betina pasca ovariektomi dapat meningkatkan ketebalan trabekular pada tulang femur tikus.

Perlu adanya penelitian lebih lanjut tentang bagaimana toksisitas dan pemanfaatan yang tepat (sediaan, dosis dan lama terapi efektif) dari kitosan cangkang udang putih untuk meningkatkan ketebalan trabekular pasca menopause atau ovariektomi.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh Fakultas Kedokteran Universitas Jember melalui Program Dana Hibah Penelitian DIKTI.

Daftar Pustaka

- [1] Sondakh, Masengi, Saenger. Perbandingan Kadar Fosfatase Alkali Khas Tulang dan Kalsium Total pada Wanita Pascamenopause dan Masa Reproduksi. Buku Obstetri Ginekologi Indonesia. 2011; 15(3): 187-190.
- [2] Masyita D. Gambaran Struktur Histologis Tulang Ekor Pada Tikus Ovariektomi dan Non-Ovariektomi. Jurnal Medika Veterinaria. 2014; 8 (1): 63-65.
- [3] Sudoyo, Setiyohadi, Alwi, Simadibrata, Setiati. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid II. Jakarta Pusat: Interna Publishing. 2009.
- [4] Setyorini, Sidiarta, Suryawan. Pencegahan Osteoporosis dengan Suplementasi Kalsium dan Vitamin D pada Penggunaan Kortikosteroid Jangka Panjang. Sari Pediatri. 2009; 11 (1): 70-85.
- [5] Departemen Kesehatan RI. Pedoman Pengendalian Osteoporosis. 2008.
- [6] Departemen Kesehatan RI. Waspadai Osteoporosis di Indonesia. 2009.

- [7] Solomon L, Warwick D, Nayagam S. *Apley's System of Orthopaedics and Fracture Ninth Edition*. London: Hodder Arnold. 2010.
- [8] Sularsih, Soeprijanto. Perbandingan Jumlah Sel Osteoblas pada Penyembuhan Luka Antara Penggunaan Kitosan Gel 1% dan 2%. *Jurnal Material Kedokteran Gigi*. 2012; 1 (1) : 83-157
- [9] Kurniyah M, Kartika D. Sintesis dan Karakterisasi Fisika dan Kimia Kitosan. *Jurnal Inovasi*. 2011. Vol. 5 (1) : 42-48
- [10] Holthuis, L.B. *FAO Catalogue Vol.1 – Shrimps and Prawns of the World. An- Annotated Catalogue of Species of Interest to Fisheries*. FAO Fisheries Synopsis No. 125 Vol. 1. 1980.
- [11] Chairani, Utami, Suniarti. Effect of Chitosan on Protein Content in The Medium Culture of Osteoblast Exposed to Oxidative Stress. *Dentika: Dental J*. 2011; 14 (1) : 53-57.
- [12] Pinto A, Reis N, Nuno I. Scaffolds Based Bone Tissue Engineering: The Role of Chitosan. 2011; 17 (5) : 1-17.
- [13] Chandra T. Pemberian Gel NANO CHITOSAN-PRP Topikal Menurunkan Ekspresi MMP-1 dan Meningkatkan Jumlah Kolagen Pada Jaringan Luka Tikus Wistar .Tesis. Denpasar: Program Studi Ilmu Biomedik Program Pasca sarjana Universitas Udayana. 2014.
- [14] Pratiknya A. *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: PT. Radja Grafindo Perkasa. 2003.
- [15] Onal, Xiong, Chen, Thostenson, Ameida, Manolagas, O'Brien. Receptor Activator of Nuclear Faktor kB Ligand (RANKL) Protein Expression by B Lymphocytes Contributes to Ovariectomy Induced Bone Loss. *J Bio Chem*. 2012; 287 (35):29851-29860.
- [16] Young Pil, Su Young, Sun Eun. Improvement of Osteoblast Function by Sustained Release of Bone Morphogenic Protein-2 (BMP-2) from Heparin-coated Chitosan Scaffold. *Tissue Eng Reg Med*. 2013;10 (4) : 183-191.
- [17] Ho M, Yao C, Liao M, Lin P, Liu S, Chen R. Chitosan Nanofiber Scaffold Improves Bone Healing Via Stimulating Trabecular Bone Production Due to Upregulation of the Runx-2/Osteocalcin/Alkaline Phosphatase Signaling Pathway. *Dovepress: Intern J Nanomed* 2015; 2015 (10): 5941-5954.
- [18] Honarkar, Barikani. *Application of Biopolimer: Chitosan*. *Monatsh Chem*. 2009