

Pengaruh Kitosan Cangkang Udang Putih (*Penaeus merguensis*) terhadap Jumlah Sel Osteoblas Tulang Femur Tikus Wistar Betina Pasca Ovariektomi

(*The Effect of White Shrimp (Penaeus merguensis) Shells Chitosan on the Total Osteoblast of Femoral Female Wistar Rats after Ovariectomy*)

Garinda Chaesaria, Muhammad Hasan, Muhammad Ihwan Narwanto
Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail: garindachaesariaputri@gmail.com

Abstract

One of imbalance disorders of bone formation is osteoporosis. This frequently occurs in postmenopause women because of estrogen deficiency that leads to an increase in osteoclast cell differentiation exceeds osteoblast cell differentiation. Shrimp shell is an export waste that can be used to produce chitosan. Chitosan can increase osteoblast cell differentiation and inhibit the differentiation of osteoclast cell in the bone formation process. The study aimed to determine the effect of chitosan white shrimp shell on the total osteoblasts of femur female wistar rats after ovariectomy. This research was the quasi experimental laboratories research by using female wistar rats that divided into three groups; a non-ovariectomy 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 osteoblast was calculated. There were 43 osteoblast cells in the control group, 21 osteoblast cells in the negative control group, and 38 osteoblast cells in the treatment group. The data was analysed using one way ANOVA and showed a significant differences between all groups (0,000). It can be concluded that the chitosan of white shrimp shell can increase the osteoblasts femur female wistar rats after ovariectomy.

Keywords: osteoporosis, chitosan, osteoblast cell

Abstrak

Salah satu gangguan keseimbangan pembentukan tulang yang sering terjadi adalah osteoporosis pada wanita pasca menopause akibat defisiensi estrogen yang mengakibatkan terjadinya peningkatan diferensiasi sel osteoklas melebihi sel osteoblas. Cangkang udang merupakan limbah yang bisa dimanfaatkan menjadi kitosan. Kitosan dapat meningkatkan diferensiasi dari sel osteoblas dan menghambat diferensiasi sel osteoklas pada proses pembentukan tulang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kitosan cangkang udang putih (*Penaeus merguensis*) terhadap jumlah sel osteoblas tulang femur tikus wistar betina pasca ovariektomi. Penelitian ini merupakan *quasi experimental laboratories* dengan menggunakan tikus wistar betina yang dibagi menjadi tiga kelompok penelitian yaitu kelompok kontrol non-ovariektomi, kontrol negatif ovariektomi dan perlakuan yang dilakukan ovariektomi serta diberikan *chitosan* 0.05 g/hari. Setelah 14 hari hewan coba dieuthanasia dan dilakukan preparasi untuk penghitungan sel osteoblas. Rata-rata hasil penghitungan jumlah sel osteoblas kelompok kontrol 43, kelompok kontrol negatif 21, dan kelompok perlakuan 38. 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 jumlah sel osteoblas tulang femur tikus wistar betina pasca ovariektomi.

Kata kunci: osteoporosis, kitosan, sel osteoblas

Pendahuluan

Peningkatan penduduk lanjut usia memberikan dampak yang kompleks bagi bidang kesehatan. Salah satunya adalah gangguan keseimbangan pembentukan tulang pada wanita pasca menopause akibat defisiensi esterogen sehingga terjadi peningkatan defisiensi sel osteoklas melebihi sel osteoblas yang mengakibatkan terjadinya osteoporosis. Osteoporosis merupakan kondisi atau penyakit dimana tulang menjadi rapuh dan mudah retak atau patah. [1]. Menurut World Health Organization (WHO), pada tahun 2020 diperkirakan penduduk lanjut usia di seluruh dunia akan melebihi 1 milyar jiwa, maka diperkirakan kasus osteoporosis dengan berbagai akibatnya juga akan meningkat [2].

Hasil survei data Departemen Kesehatan RI, wanita memiliki resiko osteoporosis lebih tinggi yaitu 21,7% dibandingkan dengan laki-laki yang hanya berisiko terkena osteoporosis sebanyak 14,8%. Hal ini dikarenakan wanita mengalami proses kehamilan dan menyusui serta terjadinya penurunan hormon esterogen pada saat pramenopause, menopause, dan pasca menopause. Defisiensi esterogen pada masa menopause dapat mempengaruhi pembentukan sel osteoblas dan sel osteoklas yaitu akan terjadi peningkatan produksi PGE2 dan sitokin inflamatori yaitu IL-1, IL-6 dan TNF- α dari sel osteoklas, serta penurunan diferensiasi sel osteoblas yang akan berpengaruh pada proses pembentukan tulang [3].

Di Indonesia merupakan negara maritim dengan dua per tiga wilayahnya terdiri dari perairan. Cangkang udang merupakan limbah ekspor yang memiliki komponen aktif yang bisa dimanfaatkan menjadi kitosan yang diperoleh dari deasetilasi kitin [4].

Beberapa laporan penelitian menunjukkan kemampuan kitosan sebagai material untuk regenerasi tulang. Kitosan dapat juga 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 ke daerah injuri [5]. Menurut Chandra 2014, PDGF berfungsi mendorong sel mesenkim dan osteoblas untuk bermitosis [6]. Selain itu, kitosan juga dapat meningkatkan formasi dan diferensiasi osteoblas pada proses pembentukan tulang [7].

Namun belum ada pembuktian mengenai pengaruh kitosan cangkang udang putih (*Penaeus merguensis*) terhadap jumlah sel osteoblas tulang femur tikus wistar betina pasca ovariektomi.

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

Metode Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *quasi experimental laboratories* dengan rancangan penelitian *post test only control group design* [8]. Variabel yang terdapat pada penelitian ini adalah variabel bebas yang merupakan chitosan cangkang udang putih, variabel terikat yaitu jumlah sel osteoblas pada tulang femur pasca ovariektomi dan variabel terkontrol pada penelitian ini adalah kriteria sampel penelitian, cara pemberian kitosan dan 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* sehingga terbagi 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol non-ovariektomi (1), kelompok kontrol ovariektomi tanpa pemberian kitosan (2) dan kelompok perlakuan yang dilakukan ovariektomi dengan pemberian kitosan (3).

Pada kelompok kontrol ovariektomi (2) dan kelompok perlakuan (3) dilakukan ovariektomi pada tikus. Setelah itu kelompok perlakuan (3) diberikan kitosan serbuk secara peroral menggunakan sonde lambung satu kali setiap hari selama dua minggu dengan dosis 0,05 g/hari selama 14 hari. Sedangkan kelompok kontrol non-ovariektomi (1) dan kelompok kontrol ovariektomi (2) tidak diinduksi apapun.

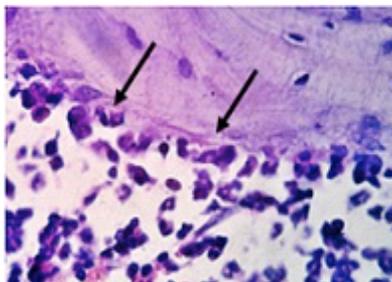
Setelah 14 hari perlakuan selanjutnya dilakukan *euthanasia* kemudian dilakukan pengambilan jaringan tulang femur dan preparasi jaringan pada tulang femur kanan. Terdapat 15 preparat menghitung jumlah sel osteoblas menggunakan 3 lapang pandang dari 3 orang pengamat. Penghitungan jumlah sel osteoblas menggunakan mikroskop kamera Olympus CX31 dengan perbesaran 400x.

Data yang diperoleh dari penghitungan sel osteoblas, 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* untuk mengetahui homogenitas varian data, jika data tersebar normal dan varian data homogen maka dilanjutkan dengan Uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan rata-rata dua kelompok atau lebih. Jika terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference* untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan signifikan. Analisis statistik dilakukan dengan program SPSS versi 21.

Hasil Penelitian

Gambaran histologi ciri sel osteoblas dengan perbesaran 1000x dapat dilihat pada gambar 1. Tampak sel osteoblas berada ditepi trabekula. Sel osteoblas berbentuk koboid hingga silindris atau seringkali berupa lembaran gepeng menyerupai epitel, berinti satu, banyak ribosom, sitoplasma basofilik.



Gambar 1. Gambaran histologi ciri sel osteoblas dengan perbesaran 1000x

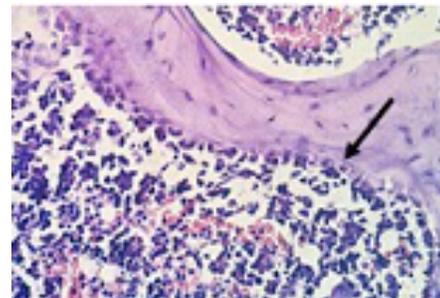
Hasil penghitungan rata-rata sel osteoblas dapat dilihat pada tabel 1. Nilai terbanyak sel osteoblas didapatkan pada kelompok kontrol, pada kelompok kontrol negatif terjadi penurunan sel osteoblas dan pada kelompok perlakuan terjadi peningkatan sel osteoblas.

Tabel 1. Hasil Penghitungan Sel Osteoblas dan Standar Deviasi

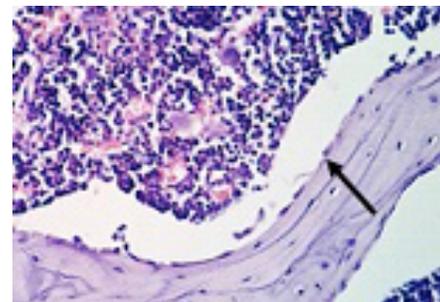
Kelompok	N	Rata-rata Hasil Penghitungan Sel Osteoblas	Standar Deviasi
Kontrol	5	43	0.837

Kontrol Negatif	5	21	0.707
Perlakuan	5	38	0.837

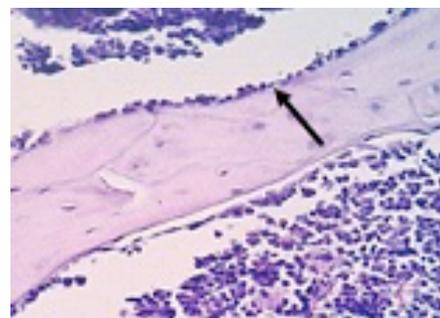
Gambaran dari hasil penghitungan jumlah sel osteoblas pada setiap kelompok dapat dilihat pada gambar 2. Terlihat adanya perbedaan jumlah sel osteoblas antar kelompok kontrol, kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan.



(a)



(b)



(c)

Gambar 2. Gambaran histologi sel osteoblas yang dibuat dengan pewarnaan Hematoxillin Eosin (HE) menunjukkan adanya perbedaan jumlah sel osteoblas 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 dengan *Levene's Test* untuk mengetahui homogenitas antar kelompok. Bila data berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji statistik parametrik *One Way Anova*. Hasil uji *Shapiro-Wilk* dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji *Shapiro-Wilk* dari kelompok kontrol dan perlakuan

	Kontrol	Kontrol Negatif	Perlakuan
Sign	0,314*	0,325*	0,314*

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 3.

Tabel 3. Hasil Uji *One Way Anova*

ANOVA Jumlah_Osteblas				
	Sum of Squares	df	Mean Square	F
Between Groups	1356,133	2	678,067	107,632
Within Groups	7,600	12	,633	
Total	1363,733	14		

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 4.

Tabel 4. Hasil uji *Least Significant Difference*

Sampel	Pembandingan Sampel	Sig
Kontrol	Kontrol	0.000*
Negatif	Perlakuan	0.000*
Kontrol	Kontrol Negatif	0.000*
	Perlakuan	0.000*
Perlakuan	Kontrol Negatif	0.000*
	Kontrol	0,000*

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

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

Pembahasan

Hasil penelitian yang ditunjukkan di atas merupakan hasil dari penghitungan sel osteoblas dari tiap kelompok penelitian. Kelompok tikus yang tidak diovariektomi/kelompok kontrol (1) memiliki nilai rerata sel osteoblas 43 sedangkan kelompok tikus yang diovariektomi/kontrol negatif (2) memiliki nilai rerata sel osteoblas lebih kecil yaitu 21. Hal ini berarti jumlah sel osteoblas kelompok kontrol negatif (2) mengalami penurunan pasca ovariektomi. Penurunan tersebut akibat tidak adanya produksi hormon estrogen yang berpengaruh dalam pembentukan tulang.

Sedangkan pada kelompok perlakuan (3) menunjukkan nilai rerata sel osteoblas yaitu 38. Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan (3) jumlah sel osteoblas lebih tinggi dibanding dengan kelompok kontrol negatif (2) yang tidak diberi kitosan. Dari hasil rerata jumlah sel osteoblas 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.

Hal ini dikarenakan kitosan yang dapat menurunkan aktivitas osteoklas dan mencegah terjadinya resorpsi tulang. Pada proses remodeling tulang femur, sel osteoblas merupakan sel yang berperan penting dalam pembentukan tulang yang merupakan proses kompleks dan melibatkan resorpsi tulang dan pembentukan tulang.

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 proinflamasi 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.

Aktifasi 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 TNF- α dan IL-1b [9].

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 pada jumlah sel osteoblas pada tulang femur tikus.

Perlu adanya penelitian lebih lanjut tentang bagaimana pemanfaatan yang tepat (sediaan, dosis dan lama terapi efektif) dari kitosan cangkang udang putih untuk meningkatkan jumlah sel osteoblas pasca ovariektomi serta penelitian tentang pengaruh kitosan terhadap densitas massa tulang dan aktivitas sel osteoklas pasca ovariektomi.

Ucapan Terima Kasih

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

Daftar Pustaka

- [1] Departemen Kesehatan RI. Kesehatan dan Keselamatan Kerja. Jakarta; 2010.
- [2] John R. Hidup Sehat dan Aktif Tanpa Osteoporosis. Jakarta; 2005.
- [3] Tandra H. Segala Sesuatu yang Harus Anda Ketahui Tentang Osteoporosis : mengenal, mengatasi, dan mencegah Tulang Keropos. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama; 2009.
- [4] Kurniasih A, Mardiyah, Kartika D. Sintesis dan Karakterisasi Fisika dan Kimia Kitosan. Jurnal Inovasi. 2011; 5 (1) : 42-48.
- [5] Pinto A, Reis R, Nuno M. Scaffolds Based Bone Tissue Engineering : The Role of Chitosan. 2011; 17 (5) : 1-17
- [6] Chandra I. 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.
- [7] 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.
- [8] Sugiyono. Metode Penelitian Kualitatif dan Kuantitatif. Bandung: Alfabeta; 2009.
- [9] 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.