



**PENGARUH PEMBERIAN KITOSAN CANGKANG UDANG PUTIH
(*Penaeus merguensis*) TERHADAP KETEBALAN TRABEKULAR
FEMUR TIKUS WISTAR BETINA PASCA OVARIEKTOMI**

SKRIPSI

Oleh

**Suci Rizalah Islamiyah
NIM 122010101055**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**PENGARUH PEMBERIAN KITOSAN CANGKANG UDANG PUTIH
(*Penaeus merguensis*) TERHADAP KETEBALAN TRABEKULAR
FEMUR TIKUS WISTAR BETINA PASCA OVARIEKTOMI**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

Suci Rizalah Islamiyah
NIM 122010101055

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER

2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orang tuaku tercinta, Sugiharto dan Siti Rukayyah;
2. Saudaraku tersayang, Nanda Akhmad USM, Dinda Nur Fitria, dan Sabila Amalia Fajrin;
3. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi;
4. Agamaku, Islam, sebagai Rahmatan Lil'Alamin, bangsa dan negaraku, serta almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang selalu kubanggakan.

MOTTO

Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan, sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan.

(Terjemahan Surat Al-Insyirah :5-6)^{*)}

^{*)} Departemen Agama Republik Indonesia.1997.*Al Qur'an dan Terjemahnya*.Semarang : PT Karya Toha Putra Semarang.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Suci Rizalah Islamiyah

NIM : 122010101055

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Pengaruh Pemberian Kitosan Cangkang Udang Putih (*Penaeus merguensis*) Terhadap Ketebalan Trabekular Femur Tikus Wistar Betina Pasca Ovariektomi” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggungjawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 2 Desember 2015

Yang menyatakan,

Suci Rizalah Islamiyah

NIM 122010101055

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN KITOSAN CANGKANG UDANG PUTIH
(*Penaeus merguensis*) TERHADAP KETEBALAN TRABEKULAR
FEMUR TIKUS WISTAR BETINA PASCA OVARIEKTOMI**

Oleh

Suci Rizalah Islamiyah
NIM 122010101055

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Muhammad Hasan, M.Kes., Sp.OT

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Septa Surya Wahyudi, Sp.U

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Pemberian Kitosan Cangkang Udang Putih (*Penaeus Merquiensis*) Terhadap Ketebalan Trabekular Femur Tikus Wistar Betina Pasca Ovariektomi” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : Rabu, 2 Desember 2015

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji

Dosen Penguji I

Dosen Penguji II

dr. Ulfa Elfiah, M.Kes, Sp. BP-RE
NIP. 19760719 200112 2 001

dr. Yuli Hermansyah, Sp.PD
NIP. 19660711 199601 1 001

Dosen Penguji III

Dosen Penguji IV

dr. Muhammad Hasan, M.Kes., Sp.OT
NIP. 19690411 199903 1 001

dr. Septa Surya Wahyudi, Sp.U
NIP. 19780922 200501 1 002

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Jember

dr. Enny Suswati, M.Kes
NIP. 19700214 199903 2 001

RINGKASAN

Pengaruh Pemberian Kitosan Cangkang Udang Putih (*Penaeus merguensis*) Terhadap Ketebalan Trabekular Femur Tikus Wistar Betina Pasca Ovariectomi; Suci Rizalah Islamiyah, 122010101055; 2015; 98 halaman; Program Studi Pendidikan Dokter Jurusan Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Osteoporosis merupakan salah satu penyakit degeneratif dengan angka kejadian cukup tinggi di Indonesia, ditandai dengan keadaan massa tulang yang rendah dan perubahan mikroarsitektur jaringan tulang yang mengakibatkan peningkatan fragilitas tulang dengan risiko terjadinya peningkatan fraktur tulang (Sondakh *et al.*, 2001). Selain pertambahan umur, salah satu faktor risiko terjadinya osteoporosis adalah jenis kelamin. Wanita yang mengalami osteoporosis berisiko mengalami fraktur dua kali lebih besar dibandingkan pria pada usia yang sama (Sudoyo *et al.*, 2009). Data Perosi (Depkes, 2008) menyatakan bahwa prevalensi osteoporosis wanita Indonesia mengalami peningkatan dari 23% menjadi 53%. Angka ini cukup tinggi dibandingkan negara lain di kawasan Asia. Berdasarkan data Sistem Informasi Rumah Sakit (Depkes, 2009) insiden fraktur tulang femur proksimal akibat osteoporosis tercatat sekitar 200/100.000 kasus pada wanita dan pria di atas usia 40 tahun. Hal ini sesuai dalam jurnal penelitian Masyita (2014) yang menyatakan bahwa faktor penting yang memicu terjadinya osteoporosis adalah defisiensi estrogen yang terjadi pada wanita menopause dan trabekular pada daerah metafisis tulang panjang merupakan daerah kedua setelah korpus vertebra yang dipengaruhi oleh efek pasca-ovariectomi berupa defisiensi estrogen pada tulang.

Udang merupakan salah satu komoditas ekspor yang memiliki nilai ekonomi tinggi Food and Agriculture Organization United Nation (Holthuis, 1980)

menyatakan Indonesia sebagai negara dengan hasil tangkapan udang putih (*Peneaus mergueinsis*) terbanyak di seluruh dunia dengan hasil tangkapan sejumlah 65.230 ton setiap tahunnya. Selain itu, produksi udang putih di Indonesia meningkat sebesar 7,4% per tahun dan sampai saat ini limbah produksi udang yang berupa cangkang masih belum dimanfaatkan secara maksimal sehingga menyebabkan pencemaran lingkungan (Kurniasih dan Kartika, 2011; Sularsih dan Soeprijanto, 2012). Cangkang udang dapat diolah untuk pembuatan kitin yang dapat diproses lebih lanjut menghasilkan kitosan (Kurniasih dan Kartika, 2011). Kitosan merupakan hasil deasetilasi kitin yang berasal dari cangkang kulit udang. Kitosan memiliki efek penyembuhan yang cepat bagi jaringan dan berpengaruh terhadap *remodelling* tulang (Sularsih dan Soeprijanto, 2012).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh kitosan cangkang udang putih (*Peneaus mergueinsis*) terhadap ketebalan trabekular femur tikus wistar betina pasca ovariektomi. Penelitian ini merupakan penelitian *Quasi Experimental Laboratories* yang dilaksanakan di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, laboratorium Kimia Dasar FMIPA Universitas Jember, laboratorium Patologi Anatomi RSUD Soebandi Jember dan laboratorium Biomedik Fakultas Farmasi Universitas Jember. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Post Test Only Control Group Design*. Sampel penelitian yang digunakan sejumlah 15 tikus Wistar betina sehat dengan berat \pm 150-250 gram dan berusia \pm 3 bulan. Hewan coba terbagi menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol (K) yang hanya diberikan makan dan aquades, kelompok kontrol negatif (K-) diovariektomi dan tanpa pemberian kitosan, dan kelompok perlakuan (P) diovariektomi dan diberikan kitosan 0,05g/hari. Setelah 14 hari perlakuan selanjutnya dilakukan *euthanasia*, preparasi jaringan dan pengukuran ketebalan trabekular pada tulang femur tikus. Variabel bebas penelitian ini adalah kitosan cangkang udang putih (*Peneaus mergueinsis*), variabel terikat yaitu peningkatan ketebalan trabekular tulang femur tikus wistar betina dan variabel terkontrol yaitu kriteria sampel, cara pemberian kitosan dan dosis kitosan.

Hasil analisis deskriptif pada kelompok perlakuan didapatkan ketebalan trabekular dengan rata-rata \pm simpang baku sebesar $78,43 \pm 1,491\mu\text{m}$ dibandingkan kelompok kontrol $59,53 \pm 2,494\mu\text{m}$ maupun kontrol negatif $32,44 \pm 1,026\mu\text{m}$. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian kitosan dengan dosis $0,05\text{g/hari}$ dosis tunggal selama 14 hari berpengaruh terhadap kelompok tikus pasca ovariektomi. Hasil uji normalitas dan uji homogenitas menunjukkan nilai yang signifikan. Begitu pula uji *One-way Anova* dan uji LSD menunjukkan nilai signifikan yang berarti terdapat perbedaan bermakna antara kelompok pengamatan.

Penelitian ini menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan memiliki potensi dalam pembentukan tulang yang paling besar. Hasil penelitian Young Pil *et al.* (2013) dan Ho *et al.* (2015) menunjukkan bahwa kitosan mampu meningkatkan ekspresi BMP-2 (*Bone Morphogenic Protein-2*), BMP-4, BMP-6 dan Runx-2 (*Runx-2 (Runt-related transcription factor-2)*). Peningkatan ekspresi protein tersebut dapat meningkatkan proses formasi tulang dibuktikan dengan peningkatan biomarker formasi tulang yaitu ALP (*Alkaline Phosphatase*), OCN (*Osteocalcin*) dan OPN (*Osteopontin*). Selain itu, kitosan berperan sebagai *carried growth factor* seperti PDGF-BB (*Platelet Derived Growth Factor-BB*) dan TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) yang juga berperan dalam proses formasi tulang (Honarkar dan Barikani, 2009; Pinto *et al.*, 2011; Chandra, 2014). Di sisi lain, kitosan mampu menekan produksi PGE₂ dan sitokin inflamasi berupa IL-1, IL-6 serta TNF- α sehingga proses osteoklastogenesis dapat ditekan (Sularsih dan Soeprijanto, 2012).

Kesimpulan penelitian ini adalah pemberian kitosan cangkang udang putih (*Penaeus merguensis*) selama 14 hari dapat meningkatkan ketebalan trabekular pada tulang femur tikus wistar betina pasca ovariektomi.

PRAKATA

Syukur Alhamdulillah saya panjatkan kehadiran Allah SWT, atas limpahan rahmat, hidayah serta karunia-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Kitosan Cangkang Udang Putih (*Panaeus merguensis*) Terhadap Ketebalan Trabekular Femur Tikus Wistar Betina Pasca Ovariectomi”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat penyelesaian pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini saya menyampaikan terima kasih yang mendalam kepada :

1. dr. Enny Suswati, M.Kes, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Muhammad Hasan, M.Kes., Sp.OT, selaku Dosen Pembimbing Utama beserta dr. Septa Surya Wahyudi, Sp.U, selaku Dosen Pembimbing Anggota, atas arahan, bimbingan, dukungan, dan waktunya selama penyusunan skripsi ini;
3. dr. Ulfa Elfiah, M.Kes, Sp.BP-RE dan dr Yuli Hermansyah, Sp. PD selaku Dosen Penguji atas saran dan bimbingan hingga terselesainya skripsi ini;
4. Dr. dr. Ancah Caesarina Novi M, Ph.D, selaku Koordinator Tugas Akhir/Skripsi, atas bimbingan guna terselesainya skripsi ini;
5. dr. Muh. Ihwan Narwanto, M.Sc, selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
6. seluruh staf Laboratorium Farmakologi FK Universitas Jember, staf Laboratorium Anatomi FKG Universitas Jember, staf Laboratorium Kimia Dasar FMIPA, staf Laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr. Soebandi dan staf Laboratorium Biomedik Farmasi Universitas Jember;
7. kedua orangtua, Sugiharto dan Siti Rukayah atas jerih payah, do’a, kasih sayang, dan dukungan yang tiada lelah dan henti;

8. saudaraku, Nanda Akhmad USM, Dinda Nur Fitria, Sabila Amalia Fajrin, terimakasih telah sama-sama belajar menjadi penopang bagi tali persaudaraan;
9. sahabatku, Tri Nanda Febrianto, terimakasih telah meluangkan banyak sekali waktu untuk saling mengerti, membantu dan menguatkan serta sama-sama belajar bahwa selalu ada perjuangan untuk kebahagiaan;
10. teman main, Aditha Fitriana Andiani, Rizki Nur Fitria, Radiana Murti Novia, Risky Karimah, Krishna Dian Ayuningtias, Elisa Ratnasari, Arum Risalah, Varina Zata Nabilah, yang telah memberi dorongan semangat selama ini;
11. sejawat seperjuangan Panacea 2012, atas segala bantuan dan kerjasamanya selama menuntut ilmu;
12. almamater tercinta Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
13. seluruh pihak yang telah banyak membantu memberikan bantuan dan dorongan semangat yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu.

Terimakasih sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Semoga Allah SWT selalu memberikan hidayah dan rahmat kepada semua pihak yang telah membantu dengan ikhlas sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan memberikan pengetahuan bagi yang membacanya.

Jember, 2 Desember 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Kitosan	6
2.1.1 Sifat Kitosan.....	7
2.1.2 Manfaat Kitosan	7
2.1.3 Peran Kitosan terhadap <i>Remodelling</i> Tulang.....	8

2.2 Tikus Putih Galur Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)	9
2.3 Tulang	10
2.3.1 Komposisi Tulang	10
2.3.2 Fungsi Tulang.....	11
2.3.3 Sel dalam Pembentukan Tulang.....	11
2.3.4 Struktur Tulang	13
2.3.5 Kekuatan Tulang	14
2.3.6 <i>Remodelling</i> Tulang	15
2.4 Osteoporosis	19
2.4.1 Definisi Osteoporosis	19
2.4.2 Faktor Risiko Osteoporosis	19
2.4.3 Klasifikasi Osteoporosis.....	20
2.4.4 Patogenesis Osteoporosis Primer Tipe I	21
2.5 Menopause	23
2.5.1 Definisi Menopause.....	23
2.5.2 Fisiologi Menopause	23
2.5.3 Tanda dan Gejala Menopause	24
2.6 Kerangka Konseptual	26
2.7 Hipotesis Penelitian	27
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	28
3.1 Jenis Penelitian	28
3.2 Rancangan Penelitian	28
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian	28
3.3.1 Waktu Penelitian	28
3.3.2 Tempat Penelitian	28
3.4 Populasi Penelitian	29
3.5 Sampel Penelitian	29
3.5.1 Kriteria Sampel	29
3.5.2 Besar Sampel.....	29

3.5.3 Pengelompokan Sampel	30
3.6 Variabel Penelitian	30
3.6.1 Variabel Bebas	30
3.6.2 Variabel Terikat.....	30
3.6.3 Variabel Terkendali.....	30
3.7 Definisi Operasional	31
3.7.1 Ovariektomi	31
3.7.2 Kitosan	31
3.7.3 Ketebalan Trabekular	32
3.8 Alat dan Bahan Penelitian	32
3.8.1 Alat Penelitian	32
3.8.2 Bahan Penelitian.....	33
3.9 Prosedur Penelitian	33
3.9.1 Tahap Awal	33
3.9.2 Tahap Perlakuan.....	35
3.9.3 Tahap Pembuatan Preparat Jaringan	41
3.9.4 Tahap Pengukuran Ketebalan Trabekular	42
3.9.5 Analisis Data	42
3.10 Alur Penelitian	44
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	45
4.1 Hasil Penelitian	45
4.2 Analisis Hasil Penelitian	47
4.3 Pembahasan	50
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	55
5.1 Kesimpulan	55
5.2 Saran	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN	61

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Spesifikasi Mutu Kitosan	6
3.1 Dosis Konversi Hewan Coba	35
3.2 Proses Ovariektomi	36
4.1 Rataan dan Standar Deviasi Ketebalan Trabekular Femur pada Kelompok Kontrol, Kontrol Negatif, dan Perlakuan	46
4.2 Hasil Uji <i>Shapiro-Wilk</i>	48
4.3 Hasil Uji Homogenitas Data	48
4.4 Hasil Uji <i>One Way Anova</i>	49
4.4 Hasil Uji <i>Least Significant Difference</i>	49

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Proses <i>Remodelling</i> Tulang	18
2.2 Gambaran Histologi Tulang Trabekular dengan Pewarnaan HE	18
2.3 Patogenesis Osteoporosis	22
2.4 Kerangka Konseptual	26
3.1 Alur Penelitian	44
4.1 Gambaran Trabekular perbesaran 400x	45
4.2 Gambaran Histologi Trabekular Femur setiap Kelompok dengan Pewarnaan HE (<i>Hematoxillin Eousin</i>)	46
4.3 Histogram Rata-rata Ketebalan Trabekular.....	47

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Konversi Dosis	61
B. Data Hasil Pengukuran Ketebalan Trabekular	62
C. Hasil Uji Analisis Data	67
D. Foto Penelitian	70
E. Gambar Mikroskopis Trabekular	74
F. Surat Ijin Etik	97

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Osteoporosis merupakan salah satu penyakit degeneratif dengan angka kejadian cukup tinggi di Indonesia, ditandai dengan keadaan massa tulang yang rendah dan perubahan mikroarsitektur jaringan tulang yang mengakibatkan peningkatan fragilitas tulang dengan risiko terjadinya peningkatan fraktur tulang (Sondakh *et al.*, 2001). Selain pertambahan umur, salah satu faktor risiko terjadinya osteoporosis adalah jenis kelamin. Wanita yang mengalami osteoporosis berisiko mengalami fraktur dua kali lebih besar dibandingkan pria pada usia yang sama (Sudoyo *et al.*, 2009). Data Perosi (Depkes, 2008) menyatakan bahwa prevalensi osteoporosis wanita Indonesia mengalami peningkatan dari 23% menjadi 53%. Angka ini cukup tinggi dibandingkan negara lain di kawasan Asia. Berdasarkan data Sistem Informasi Rumah Sakit (Depkes, 2009) insiden fraktur tulang femur proksimal akibat osteoporosis tercatat sekitar 200/100.000 kasus pada wanita dan pria di atas usia 40 tahun..

Beberapa penyebab terjadinya osteoporosis meliputi keadaan malnutrisi yang berlebihan, defisiensi vitamin C, defisiensi estrogen, defisiensi *Growth Hormone*, dan *Chusing Syndrom*. Namun, defisiensi estrogen pascamenopause memegang peranan besar terhadap kejadian osteoporosis pada wanita (Masyita, 2014). Defisiensi estrogen mengakibatkan apoptosis osteoklas terhambat sehingga terjadi resorpsi berlebihan yang mengakibatkan berkurangnya keadaan massa tulang (Sudoyo *et al.*, 2009). Trabekular pada daerah metafisis tulang panjang merupakan daerah kedua setelah korpus vertebra yang dipengaruhi oleh efek pasca-ovariectomi berupa defisiensi estrogen pada tulang (Masyita, 2014).

Penatalaksanaan osteoporosis di Indonesia belum sempurna. Hal ini ditunjang oleh beberapa keadaan seperti, tidak meratanya alat pemeriksaan densitas tulang

berupa *dual-energy x-ray absorptiometry* (DEXA) di beberapa kota atau wilayah di Indonesia, mahal nya pemeriksaan biokimia tulang berupa *osteocalcin* yang merupakan penanda spesifik formasi tulang dan belum adanya pengobatan standard untuk osteoporosis di Indonesia (Solomon *et al.*, 2010). Ichramsyah *et al.* (2005) menyatakan pada tahun 2000 ditemukan kasus fraktur akibat osteoporosis sebanyak 227.850 di Indonesia yang membutuhkan biaya sekitar Rp24 triliun. Sedangkan pada tahun 2020 diperkirakan kasus fraktur akibat osteoporosis di Indonesia mencapai 426.300 dan dibutuhkan biaya pengobatan sekitar Rp34 triliun.

Berbagai upaya untuk mengatasi kejadian osteoporosis pada wanita dapat dilakukan dengan menggunakan obat kimiawi yang mengandung senyawa atau agensia kalsium sebagai salah satu material penyangga tulang. Teori *remodelling* tulang diharapkan dapat membantu meminimalisir permasalahan pada kejadian osteoporosis. Salah satu polimer alam yang berpotensi dalam *remodelling* tulang adalah kitosan (Sularsih dan Soeprijanto, 2012).

Kitosan merupakan polisakarida turunan kitin yang didapatkan dengan menghilangkan gugus asetil menggunakan basa pekat. Kitosan didapatkan dari ekstraksi limbah cangkang kulit udang atau berbagai krustasea lainnya. Data statistik menunjukkan kitosan sebagai sumber daya alam terbanyak kedua setelah polisakarida. Pemanfaatan kitosan meningkat sehubungan dengan sifat biologisnya yang unggul seperti biokompatibilitas, mudah terdegradasi tanpa meninggalkan racun, non-karsinogenik, bioaktif, antibakterial, agen efek penyembuhan yang cepat bagi jaringan serta berpengaruh pada *remodelling* tulang (Sularsih dan Soeprijanto, 2012). Kitosan dilaporkan dapat menstimulasi formasi osteoblas dan menghambat resorpsi tulang oleh osteoklas sehingga berpotensi pada *remodelling* tulang (Chairani *et al.*, 2011). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Sularsih dan Soeprijanto (2012) menggunakan kitosan sebagai terapi *remodelling* pada tulang alveolar gigi tikus.

Salah satu sumber daya alam dengan persentase kandungan kitosan cukup potensial adalah cangkang udang putih (*Penaeus merguensis*). Food and Agriculture

Organization United Nation (Holthuis, 1980) menyatakan Indonesia sebagai negara dengan hasil tangkapan udang putih (*Peneaus mergueinsis*) terbanyak di seluruh dunia dengan hasil tangkapan sejumlah 65.230 ton setiap tahunnya. Selain itu, produksi udang putih di Indonesia meningkat sebesar 7,4% per tahun dan sampai saat ini limbah produksi udang yang berupa cangkang masih belum dimanfaatkan secara maksimal sehingga menyebabkan pencemaran lingkungan (Kurniasih dan Kartika, 2011; Sularsih dan Soeprijanto, 2012). Padahal limbah cangkang udang bisa mencapai 30% dari bobot udang utuh. Hal ini dibuktikan dengan data industri udang Indonesia setiap tahun menghasilkan 76.657-114.986 ton cangkang udang (Sularsih dan Soeprijanto, 2012). Limbah udang sebenarnya bukan merupakan sumber yang kaya akan kitosan, namun limbah ini mudah didapat dan tersedia dalam jumlah besar sebagai limbah hasil dari pengolahan udang serta memiliki derajat deasetilasi kitosan yang cukup tinggi (Suhardi, 1992).

Berdasarkan fakta tersebut, peneliti ingin mengetahui pengaruh pemberian kitosan cangkang udang putih (*Penaeus merguensis*) berbasis *remodelling* tulang terhadap ketebalan tulang trabekular melalui sebuah penelitian. Penelitian dilakukan secara *in vivo* pada tikus wistar betina yang diberi perlakuan ovariektomi dan diinduksi ekstrak kitosan untuk mengetahui efek kitosan terhadap gambaran tebal tulang trabekular femur tikus wistar betina ovariektomi.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh pemberian kitosan cangkang udang putih (*Penaeus merguensis*) terhadap ketebalan trabekular tulang femur tikus wistar betina pasca ovariektomi?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini untuk mengetahui pengaruh kitosan cangkang udang putih (*Penaeus merguensis*) terhadap kepadatan tulang.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini untuk mengetahui pengaruh kitosan terhadap ketebalan trabekular tulang femur tikus wistar betina pasca ovariektomi.

1.4 Manfaat

Manfaat pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

a. Bagi Peneliti

Penelitian ini dapat menambah wawasan peneliti mengenai pengaruh kitosan dari limbah cangkang kulit udang putih (*Peneaus mergueinsi*) terhadap peningkatan ketebalan trabekular femur tikus wistar betina paska ovariektomi sehingga nantinya diharapkan dapat mengedukasi masyarakat mengenai manfaat limbah cangkang kulit udang putih terkait dengan fungsinya dalam proses *remodeling* tulang.

b. Bagi Institusi

Penelitian ini diharapkan dapat mendukung pencapaian visi, misi dan tujuan dari Fakultas Kedokteran Universitas Jember terkait dengan Tri-Dharma Perguruan Tinggi.

c. Bagi Ilmu Pengetahuan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang berguna mengenai pengaruh kitosan dari limbah cangkang kulit udang putih (*Peneaus mergueinsi*) terhadap peningkatan ketebalan trabekular femur tikus wistar betina paska ovariektomi sehingga nantinya dapat digunakan sebagai bahan pengembangan untuk penelitian selanjutnya sampai dengan taraf uji klinis sebagai salah satu alternatif terapi osteoporosis berbasis bahan alam.

d. Bagi Masyarakat

Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan edukasi mengenai manfaat limbah cangkang udang putih (*Peneaus mergueinsis*) terkait dengan *remodelling* tulang sehingga dapat meningkatkan nilai ekonomis limbah

cangkang kulit udang putih sekaligus dapat meningkatkan taraf kesejahteraan nelayan.

Melalui hasil penelitian ini, kitosan diharapkan dapat dijadikan sebagai salah satu terapi alternatif osteoporosis di masa mendatang berbasis bahan alam yang dikelompokkan dalam kategori fitofarmako.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kitosan

Kitosan adalah produk deasetilasi kitin yang merupakan polimer rantai panjang glukosamin (2-amino-2-deoksi-D-Glukosa), memiliki rumus molekul $[C_6H_{11}NO_4]_n$ dengan bobot molekul $2,5 \times 10^5$ Dalton. Kitin tersedia berlebihan di alam dan banyak ditemukan pada hewan tingkat rendah, jamur, insekta dan golongan *Crustaceae* seperti udang, kepiting dan kerang. Kadar kitin dalam berat udang, berkisar antara 60-70% dan bila diproses menjadi kitosan menghasilkan 15-20%. Kitosan berbentuk serpihan putih kekuningan, tidak berbau dan tidak berasa (Wiyarsi dan Priyambodo, 2009).

Mutu kitosan dapat ditentukan berdasarkan parameter fisika dan kimia, parameter fisika diantaranya penampakan, ukuran dan viskositas. Sedangkan parameter kimia yaitu nilai proksimat dan derajat deasetilasi. Semakin baik mutu kitosan semakin tinggi nilai derajat deasetilasinya dan semakin banyak fungsinya dalam aplikasinya (Kurniasih dan Kartika, 2011). Adapun standar spesifikasi mutu kitosan dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 2.1 Spesifikasi Mutu Kitosan

Spesifikasi	Kitosan (Farmasi)
Penampakan	Serpihan/Bubuk putih/kekuningan
Kadar air (% berat kering)	10 %
Kadar abu (% berat kering)	2 %
Kadar N (% berat kering)	> 5 %

Derajat Deasetilasi

70 %

Sumber : Protan *Laboratories* dalam Suptijah (dalam Nurilmala *et al.*, 2007)

2.1.1 Sifat Kitosan

Sifat alami kitosan diklasifikasikan menjadi sifat kimia dan biologi. Berdasarkan sifat kimianya, gugus amino yang dimiliki kitosan lebih banyak dibandingkan kitin sehingga kitosan lebih bersifat basa dan nukleofilik. Kitosan tidak larut dalam air dan beberapa pelarut organik seperti dimetilsulfoksida, dimetilformanida, pelarut alkohol dan piridin. Kitosan larut dalam asam organik atau mineral encer melalui protonasi gugus amino bebas pada pH kurang dari 6,5. Kitosan larut dengan baik dalam asam format, asam asetat dan asam glutamat. Kelarutan kitosan akan menurun dengan bertambahnya berat molekul kitosan. Ikatan hidrogen intermolekuler maupun intramolekuler pada kitosan lebih rendah dibandingkan kitin sehingga kitosan lebih mudah diaplikasikan dalam beberapa reagen dan mudah dibentuk menjadi spons, larutan, gel, pasta, membran dan serat (Nabilah *et al.*, 2012).

Sifat biologi kitosan antara lain, kitosan bersifat *biocompatible* yang tidak beracun, *biodegradable*, dan nontoksik. Kitosan dapat berikatan dengan sel mamalia dan sel mikroba secara agresif dan mampu meningkatkan pembentukan tulang (Nabilah *et al.*, 2012).

2.1.2 Manfaat Kitosan

Berdasarkan karakteristik kitosan yang *biodegradable* dan *biocompatible*, manifestasi penggunaan kitosan telah banyak dilakukan. Dalam bidang pertanian, tanaman yang diberikan kitosan akan memiliki ketahanan yang kuat terhadap jamur. Dalam bidang bioteknologi, kitosan berperan dalam imobilisasi enzim, pemisahan protein dan regenerasi sel. Dalam industri makanan, kitosan digunakan sebagai antioksidan, pengawet alami dan penyerap warna. Kitosan juga dimanfaatkan dalam program diet karena dapat menurunkan kolesterol. Berkaitan dengan sifat biologis

kitosan yang unggul, seperti biokompatibilitas, mudah terdegradasi tanpa meninggalkan racun, tidak karsinogenik, serta memiliki efek anti bakterial dan efek penyembuhan yang cepat bagi jaringan. Kitosan dapat meningkatkan sintesis kolagen tipe I pada tahap awal, dan memfasilitasi diferensiasi sel-sel osteogenik pada percobaan in vitro fibroblas ligament periodontal manusia. Kitosan diketahui dapat mempercepat migrasi sel serta membantu pematangan jaringan (Ardakani *et al.*, 2011).

2.1.3 Peran Kitosan terhadap *Remodelling* Tulang

Kitosan secara progresif dapat menurunkan produksi prostaglandin E₂ dan sitokin inflamatori yaitu IL-1, IL-6 dan TNF- α . Penurunan prostaglandin dan sitokin inflamatori menyebabkan pembentukan dan aktivitas osteoklas terganggu sehingga menurunkan tingkat resorpsi tulang. Selain itu, kitosan juga dapat meningkatkan formasi dan diferensiasi osteoblas pada proses pembentukan tulang (Sularsih dan Soeprijanto, 2012).

Kitosan dapat menstimulasi *Macrophage-Colony Stimulating Factor* (M-CSF) dan *Receptor Activator of Nuclear factor K Ligand* (RANK-L). Aktivitas sel osteoklas pada resorpsi tulang diawali dengan pengeluaran M-CSF oleh sel osteoblas yang akan berikatan dengan c-Fms yang terdapat pada prekursor sel osteoklas sehingga merangsang diferensiasi dan proliferasi progenitor hematopoetik menjadi pre-osteoklas yang kemudian mengekspresikan RANK. Sel osteoblas dan sel stroma memproduksi *Osteoprotegerin* (OPG) yang akan mengikat RANK-L. Ikatan OPG dan RANK-L akan menghambat ikatan RANK-L dan RANK, sehingga tidak terjadi pembentukan sel osteoklas (Sularsih dan Soeprijanto, 2012).

Adanya penurunan prostaglandin E₂ (PGE₂) maupun sitokin inflamatori menyebabkan pembentukan dan aktivitas osteoklas terganggu. Hal ini sesuai dengan penelitian Sularsih dan Soeprijanto (2012), bahwa pemberian kitosan pada tikus *Rattus norvegicus* dapat menurunkan jumlah maupun aktivitas osteoklas sehingga dapat menurunkan tingkat resorpsi tulang.

Cangkang udang putih yang kaya kitosan, selain menghambat aktivitas osteoklas ternyata juga mampu meningkatkan formasi dan diferensiasi osteoblas pada pembentukan tulang. Secara *in vitro*, oleh Young-Pil *et al.* (2013) menyatakan bahwa kitosan dapat meningkatkan ekspresi *Bone Morphogenetic Protein-2* (BMP-2) mRNA. BMP-2 merupakan *prototype subgroup* BMPs yang memicu diferensiasi *multipotent mesenchymal progenitor cell lines* menjadi *osteogenic lineage*. BMPs menstimulasi *Activator Protein-1* (AP-1) untuk meningkatkan ekspresi *Alkaline Phosphatase* (ALP) dan terjadi proses mineralisasi. BMP-2 secara signifikan dapat meningkatkan ekspresi *osteocalcin* (OCN) dan *osteopontin* (OPN). OCN dan OPN diekspresikan oleh osteoblas yang dikenal sebagai penanda spesifik setelah diferensiasi osteoblas. BMP-4 dan BMP-6 sangat berperan dalam proses osteogenesis dan menginduksi *GF family*. Aplikasi kitosan dapat meningkatkan ekspresi BMP-2, BMP-7 dan aktivitas ALP (Sularsih dan Soeprijanto, 2012).

Ho *et al.* (2015) melaporkan bahwa kitosan dapat meningkatkan ekspresi *Runt-related transcription factor-2* (Runx2), *Alkaline phosphatase* (ALP), dan *osteocalcin* (OCN) sehingga dapat memicu formasi tulang pada trabekular femur hewan coba. Kitosan juga dapat digunakan sebagai pembawa *growth factor* seperti TGF- dan *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) yang juga memiliki peranan dalam proses formasi tulang (Pinto *et al.*, 2011).

2.2 Tikus Putih Galur Wistar (*Rattus norvegicus*)

Di Indonesia, tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*) sering digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian. Dibandingkan dengan tikus liar, tikus ini lebih cepat dewasa dan jarang dapat hidup lebih dari 3 tahun. Dua karakteristik yang membedakan tikus putih dengan binatang percobaan lain adalah tikus tidak dapat memuntahkan makanan karena susunan anatomi esofagus yang menyatu di perut serta tidak mempunyai kantung empedu. Volume lambung tikus wistar adalah sekitar 5 ml. Secara fisiologis tikus putih dapat hidup dalam jangka waktu 2-3 tahun. Umur ketika tikus dewasa adalah 40-60 hari dan masa kehamilan tikus adalah 21 hari. Tikus

putih galur wistar (*Rattus norvegicus*) sejak dulu sudah sering digunakan sebagai hewan uji laboratorium karena anatomi dan fisiologi organ-organ hewan tersebut, sistematis kerjanya hampir sama dengan fungsi anatomi organ manusia (Chandra, 2014).

Kelebihan menggunakan tikus putih sebagai hewan coba adalah bersifat omnivora, mempunyai jaringan yang hampir sama dengan manusia dan kebutuhan gizinya hampir sama dengan manusia. Dari segi ekonomi harganya lebih murah, ukuran kecil dan perkembangannya cepat. Selain itu tikus putih galur wistar dapat dengan mudah dikembangkan dan mudah menyesuaikan diri dengan lingkungan (Chandra, 2014).

2.3 Tulang

Tulang merupakan jaringan ikat yang memiliki tiga fungsi utama yaitu, *support*, *protection*, dan *leverage*. Tulang menyediakan integritas bagi sistem lokomotor, melindungi organ vital, menyimpan cadangan mineral dalam proses homeostasis serta sebagai tempat hematopoiesis dan sistem imun. Sebagai jaringan, tulang memegang peranan penting sebagai *mineral reservoir* yang membantu regulasi cairan ekstraseluler, khususnya konsentrasi ion kalsium. Segala modulasi dalam struktur tulang dan komposisi tulang ditunjang oleh interaksi yang kompleks antara bahan bioaktif dan aktivitas seluler, yang diatur oleh hormon dan faktor lokal. Gangguan pada interaksi kompleks ini akan berdampak pada perubahan sistemik dalam metabolisme mineral dan gangguan skeletal secara general (Solomon *et al.*, 2010).

2.3.1 Komposisi Tulang

Komposisi tulang terdiri dari 2 bahan, yaitu:

- a. Matrik yang kaya mineral (70%).
- b. Bahan organik (30%) yang terdiri dari:
 - 1) Sel (2%):

- Sel osteoblas yaitu yang membuat matrik (bahan) tulang atau sel pembentuk tulang, merupakan sel tulang muda yang kerjanya berlawanan dengan osteoklas.
 - Sel osteosit yaitu mempertahankan matrik tulang.
 - Sel osteoklas yaitu sel yang menyerap tulang atau menyerap osteoid.
- 2) Osteoid (98%) sama dengan tulang muda yaitu matrik (bahan) tulang yang mengandung sedikit mineral (Juniaidi, 2007).

2.3.2 Fungsi tulang

Tulang merupakan penunjang kokohnya tubuh, sebagai rangka, tulang mempunyai banyak sendi yang memungkinkan pergerakan dan juga merupakan struktur padat yang hidup, karena terdiri atas sel-sel dan jaringan tulang yang mempunyai sistem aliran darah sebagai pembawa nutrisi untuk metabolisme tulang. Kalsium di depositkan sehingga tulang menjadi lebih keras dan kokoh. Dari keterangan di atas, ada 4 fungsi utama jaringan tulang :

- a. Fungsi mekanik, sebagai penyokong tubuh dan tempat melekat jaringan otot untuk pergerakan.
- b. Fungsi protektif, melindungi alat vital dalam tubuh dan juga sumsum tulang.
- c. Fungsi metabolik, yaitu mengatur keseimbangan berbagai mineral tubuh, juga sebagai cadangan dan tempat metabolisme berbagai mineral yang penting seperti kalsium dan fosfat.
- d. Fungsi hemopoetik, berlangsungnya proses pembentukan dan perkembangan sel darah (Juniaidi, 2007).

2.3.3 Sel dalam Pembentukan Tulang

Sel osteoblas, osteosit dan osteoklas merupakan komponen biologi yang berperan penting pada metabolisme tulang.

a. Osteoblas

Merupakan komponen yang terlibat dalam proses pembentukan tulang. Secara histologi bentuk sel osteoblas dari kuboid hingga silindris atau seringkali berupa lembaran utuh menyerupai epitel, berinti satu dan besar, memiliki banyak ribosom, sitoplasma bersifat basofilik karena mengandung nukleoprotein yang berperan untuk sintesis material organik matriks tulang, seperti kolagen dan glikoprotein. Sel-sel ini mempunyai tonjolan-tonjolan sitoplasma, mirip jari yang menjulur ke dalam matriks tulang dan berhubungan dengan tonjolan osteoblas yang berdekatan. Sebagian dari osteoblas terperangkap dalam matriks tulang dan akan membentuk osteosit, dan sering dianggap inaktif secara metabolik. Osteosit dapat mendeteksi mikrofraktur atau gangguan dalam struktur tulang dan kemudian memberikan sinyal kepada osteoblas mengenai adanya defek pada tulang tersebut. Osteoblas terbentuk dari sel prekursor berupa stem sel mesenkim (*Mesenchymal Stem Cell I* [MSC]) (Subowo, 2006).

b. Osteosit

Merupakan osteoblas yang terpendam dalam matriks tulang. Sel ini memiliki sitoplasma yang sedikit basofilik. Osteosit mempunyai peranan penting dalam pembentukan matriks tulang dengan cara membantu pemberian nutrisi pada tulang. Osteosit mempunyai dua fungsi utama, yaitu memelihara dan memantau isi mineral dan protein dari matriks dan berperan pada perbaikan tulang yang rusak (Subowo, 2006).

c. Osteoklas

Osteoklas adalah sel raksasa berinti banyak yang besar dan jumlah anak intinya sangat bervariasi. Terletak dekat pada permukaan tulang dalam lekukan dangkal yang dikenal sebagai lakuna *Howship*. Osteoklas berfungsi sebagai substansi yang meresorpsi tulang (Subowo, 2006).

Osteoklas menghasilkan asam, kolagenase, dan enzim proteolitik yang menyebabkan matriks tulang melepaskan bagian substansi dasar yang mengapur.

Sesudah proses resorpsi tulang selesai, osteoklas akan menghilang. Kemungkinan sel ini akan berdegenerasi atau berubah menjadi sel asalnya (Subowo, 2006).

2.3.4 Struktur Tulang

Secara histologi, bentukan tulang dibedakan menjadi tulang imatur dan tulang matur. Tulang imatur (*woven bone*) adalah tulang dengan serat-serat kolagen yang tidak teratur dan sel-selnya tidak mempunyai orientasi khusus. Jenis ini ditemukan pada osifikasi endokondral dan tahap awal *fracture healing* sebelum menjadi tulang matur. Tulang matur (*lamellar bone*) adalah tulang dengan struktur kolagen yang teratur, tersusun secara paralel membentuk lapisan yang multipel disebut *lamellar* dengan sel osteosit berada di antara lakuna tersebut. Tulang matur terdiri dari dua struktur yang berbeda bentuknya yaitu tulang kortikal yang bersifat kompakta dan tulang trabekular yang bersifat spongiosa. Lapisan superfisialis tulang disebut periosteum dan lapisan profunda disebut endosteum (Solomon *et al.*, 2010; Rasjad, 2012).

a. Tulang Kortikal (*Compacta Bone*)

Pada tulang kortikal 80-90% volumenya termineralisasi sedangkan pada tulang trabekular hanya 20% volume yang termineralisasi karena sebagian besar terdiri atas sumsum tulang yang mengandung lemak dan atau jaringan hematopoetik. Berdasarkan besarnya massa yang termineralisasi tersebut, bagian kortikal berfungsi sebagai mekanik dan bagian trabekular berfungsi sebagai metabolik (Vigorita dan Ghelman, 1999). Tulang kortikal merupakan tulang padat yang menyusun 80% rangka tubuh. Tulang jenis ini membentuk lapisan terluar tulang dan dilapisi oleh periosteum. Tulang jenis ini berfungsi sebagai penahan beban pada tulang panjang. Secara histologis, tulang kortikal tersusun atas unit-unit silinder, yang masing-masing memiliki *Haversian canal* di tengah yang mengandung pembuluh darah, pembuluh limfe, dan saraf. Lapisan kolagen tersusun konsentris disekeliling *Haversian canal* membentuk *Haversian system*. Diantara lapisan ini terdapat osteosit yang terletak di dalam lakuna (Laurney *et al.*, 2010).

b. Tulang Trabekular (*Spongy / Cancellous Bone*)

Tulang trabekular adalah tulang tipe porus, terletak pada interior tulang kuboid dan tulang pipih atau plat yang saling terhubung membentuk material solid. Sumsum tulang terletak dalam jaringan tulang trabekular. Tulang trabekular berperan dalam pengaturan sistem metabolisme tulang karena tulang jenis ini memiliki perbedaan permukaan dan volume yang tinggi. Tulang ini juga berperan dalam meningkatkan kekuatan tulang secara umum. Karena perbandingan permukaan dan volume yang tinggi, tulang trabekular lebih rentan terhadap penyakit yang dihasilkan dari peningkatan *remodelling* tulang daripada tulang kortikal, contohnya osteoporosis. Perbandingan antara tulang trabekular dan tulang kortikal sangat signifikan pada lokasi berbeda pada tulang yang sama dan tergantung dari lokasi dan fungsi tulang (Laurney *et al.*, 2010). Tulang yang tersusun atas tulang trabekular yang banyak berarti mempunyai permukaan tulang dan keaktifan metabolik yang lebih besar dibandingkan dengan tulang kortikal. Sehingga tulang trabekular lebih sering mengalami perubahan mineral dan mempunyai predisposisi terjadinya kekurangan massa tulang (Sari, 2001).

2.3.5 Kekuatan Tulang

Konstruksi tulang dirancang otomatis untuk beradaptasi dalam mengatasi lingkungan mekanis. Tulang memiliki tiga sifat yaitu, sifat material tulang di tingkat jaringan, sifat struktural di tingkat organ dan sifat geometris tulang yang berhubungan dengan sifat material dan sifat struktural. Sifat material tulang ditentukan oleh kalsifikasi matriks tulang dan faktor mikrostruktur seperti serabut kolagen dan kristal. Sifat geometris tulang berhubungan dengan massa dan distribusi dari ukuran serta desain arsitektur dari material terkalsifikasi. Sifat struktural tulang seperti kepadatan dan kekuatan struktural merupakan kombinasi dari sifat material dan sifat geometris tulang (Vainionpa, 2007).

Perubahan kekuatan tulang dipengaruhi oleh perubahan tebal kortikal dan trabekular (mikroarsitektur), jumlah trabekular serta ketebalan trabekular.

Perbandingan antara tulang trabekular dan tulang kortikal sangat signifikan pada lokasi yang berbeda pada tulang yang sama dan bergantung pada lokasi dan fungsi tulang. Tulang trabekular berperan dalam peningkatan kekuatan tulang secara umum (Laurney *et al.*, 2010). Dalam menentukan kekuatan tulang, susunan trabekular memegang peranan, begitu juga dengan kepadatan trabekular, ukuran tulang, dan ketebalan kortikal. Kepadatan tulang trabekular memiliki hubungan linear dengan kekuatan tulang. Sedikit peningkatan kepadatan tulang trabekular menyebabkan peningkatan kekuatan tulang yang lebih besar. Secara dinamis, hubungan antara kepadatan tulang trabekular dengan kekuatan tulang dipengaruhi oleh proses remodeling yang dapat merubah susunan trabekular, adanya *microdamage*, dan proses penyembuhan. Hubungan antara trabekular memungkinkan tulang untuk mendistribusikan beban yang diterimanya. Keadaan *microfracture* merupakan tanda buruk adaptasi arsitektural trabekular dalam menahan beban yang diterima tulang (Mosekilde *et al.*, 2000).

2.3.6 Remodelling Tulang

Tulang adalah struktur dinamis yang terus-menerus diperbarui atau mengalami *remodelling*. Pada usia muda menjelang 20 tahun proses pembentukan tulang sangat aktif, jauh melampaui proses penyerapan tulang. Pada usia 20-40 tahun kedua proses hampir sama aktif, sedangkan di atas 40 tahun proses resorpsi lebih aktif dibandingkan proses pembentukan tulang. Akibatnya massa tulang menjadi lebih kecil. Hal ini dikarenakan osteoblas membutuhkan waktu beberapa bulan untuk menjalankan fungsinya sebagai pembentuk tulang, sedangkan osteoklas membutuhkan waktu yang relatif lebih cepat untuk meresorpsi tulang (Jacobs, 2013).

Tulang kortikal yang padat dan tulang trabekular berbeda dalam arsitektur tetapi serupa dalam komposisi molekul. Kedua jenis tulang memiliki matriks ekstraseluler dengan komponen mineral dan non-mineral. Komposisi dan arsitektur dari matriks ekstraseluler yang memberikan sifat mekanik untuk tulang. Kekuatan tulang ditentukan oleh protein kolagen dan mineralisasi osteoid. Semakin besar

konsentrasi kalsium, semakin besar kekuatan tekan. Pada orang dewasa, sekitar 25% dari tulang trabekular diserap kembali dan diganti setiap tahun, dibandingkan dengan hanya 3% dari tulang kortikal (Jacobs, 2013).

Remodelling tulang diatur oleh dua sel utama yaitu osteoblas dan osteoklas, sedangkan sel osteosit adalah sel osteoblas tak aktif yang dapat menjadi aktif apabila terjadi benturan keras pada tulang. Benturan tersebut meningkatkan IGF-1 (*Insulin Growth Factor*) sehingga sel osteosit menjadi sel osteoblas dan membentuk tulang baru. Sel osteoblas dan sel osteoklas berasal dari dua jalur sel yang berbeda, yaitu mesenkim pluripoten atau *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) dan sel sistem mononuklear hemopoetik. Sel osteoblas berusia sekitar tiga bulan, sedangkan sel osteoklas hanya dua minggu. Kedua sel ini bergabung dalam *Basic Multinuclear Unit* (BMU) merupakan satu unit yang kompak. Unit BMU terdiri dari osteoklas di depan, osteoblas dibelakang, sedangkan ditengah-tengah terdapat sel-sel kapiler, sel saraf dan jaringan ikat (Rachman, 2004).

Secara bioseluler hubungan kerja secara berpasangan antara osteoblas dan osteoklas diatur oleh jalur isyarat TNF (*Tumor Necrosis Factor*) melalui tiga protein, yaitu:

- a. RANK (*Receptor Activator Nuclear Factor*) disebut juga OPGL (*Osteoprotogins Ligand*) yang tampil pada progenitor hemopoetik osteoklas.
- b. RANK-L (*Receptor Activator Nuclear Factor Ligand*) akan tampil pada sel prosteoblastik dan limfosit T.
- c. OPG (*Osteoprotogerin*) yang menghambat osteoklastogenesis dan resorpsi tulang dengan meningkatkan RANK-L dan menghambat interaksi RANK-L dengan RANK.

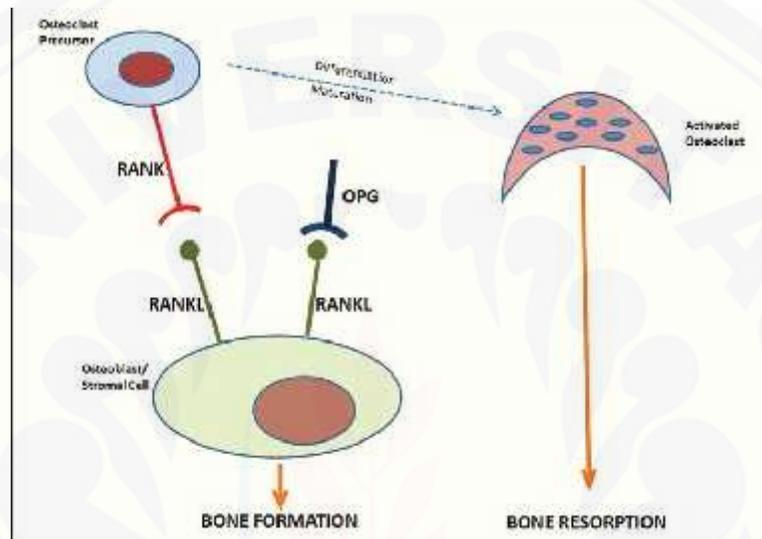
Saat ini dianggap bahwa kendali kecepatan degenerasi tulang, produksi osteoblas dan osteoklas di jalur osteoblastik stroma sumsum tulang berlangsung melalui jalur BMP (*Bone Morphogenic Protein*), *cbfa-1* (*osteoblast specific transcription factor*), RANK-L. Hubungan kerja sel osteoblas dan sel osteoklas terjadi secara berpasangan, yaitu tulang yang harus diganti terlebih dahulu ditentukan

oleh sel osteoblas dengan meninggalkan osteopontin dan trombospondin, kemudian osteoklas dengan reseptor vitamin D mengikat osteopontin/trombospondin untuk membentuk lakuna *howship* sehingga tulang tua terserap dan datang osteoblas membentuk tulang baru (Rachman, 2004).

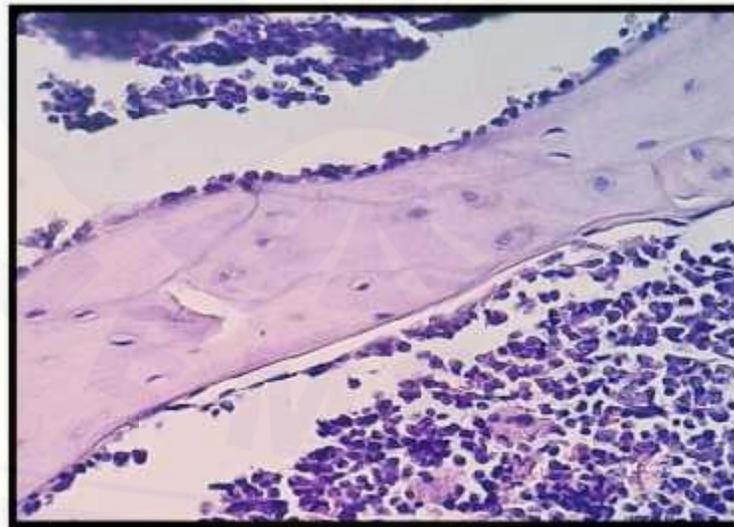
Aktivitas sel osteoblas akan dipicu oleh BMP (*Bone Morphogenic Protein*), TGF- β (*Transforming Growth Factor beta*), IGF (*Insulin Growth Factor*), estrogen, T3 (*Triiodotironin*), T4 (*Tetra-iodotironin*), kalsitriol (pada kadar tertentu), PTH (*Parathyroid Hormone*), sedangkan aktivitas sel osteoblas dihambat oleh kortikosteroid. Aktivitas sel osteoklas dipicu oleh LT (*Lymphotoxin*), TGF- α (*Transforming Growth Factor alfa*), TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alfa*), Interleukin (IL-6, IL-1, IL-11), PTHrP (*PTH related protein*) tetapi dihambat oleh kalsitonin, estrogen, IFN- γ (*interferon gamma*), dan PGE₂. Dalam proses peningkatan dan penghambatan aktivitas sel osteoklas, beberapa sitokin dibentuk oleh sel osteoblas. Saat ini telah diketahui bahwa sel stroma dan osteoblas mensintesis dan mengekspresikan ligan RANK. Ligan RANK berikatan dengan suatu molekul reseptor yang dikenal dengan singkatan RANK (*Receptor Activator for Nuclear Factor K β*) yang diekspresikan oleh makrofag. Diferensiasi makrofag menjadi sel osteoklas mengisyaratkan bahwa ligan RANK yang diekspresikan di permukaan sel stroma atau sel osteoblas berikatan dengan reseptor RANK di makrofag. Selain itu, sel stroma juga menghasilkan suatu sitokin yang disebut *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF) yang melekat ke suatu reseptor khusus di makrofag. Ligan RANK dan M-CSF bekerja bersama-sama untuk mengubah makrofag menjadi osteoklas yang akan meresorpsi tulang. Oleh karena itu, pengaktifan reseptor RANK merupakan stimulus utama terjadinya resorpsi tulang (Robbins, 2007).

Aktivitas osteoklastogenik dijalar ligan RANK-RANK diatur oleh sebuah molekul yang disebut osteoprotegerin (OPG) yang juga diekspresikan oleh sel stroma dan sel osteoblas. OPG adalah suatu reseptor pengikat yang dapat mengikat ligan RANK sehingga ligan ini tidak dapat berikatan dengan RANK dan aktivitas osteoklastogenik menjadi terganggu (Robbins, 2007).

Proses *remodelling* tulang akan berdampak pada pertumbuhan tulang kortikal ataupun tulang trabekular. Peningkatan sel osteoblas dalam *remodelling* tulang akan memicu terbentuknya tulang trabekular sebagai tulang muda. Tulang trabekular kemudian akan terus tumbuh membentuk *haversian system* yang kemudian menyusun tulang kortikal (Solomon *et al.*, 2010).



Gambar 2.1 Proses *Remodelling* Tulang



Gambar 2.2 Gambaran Histologi Tulang Trabekular dengan Pewarnaan HE (*Hematoxyllin Eousin*)

2.4 Osteoporosis

2.4.1 Definisi Osteoporosis

Osteoporosis berasal dari kata *osteos* (tulang) dan *porous* (keropos), sehingga osteoporosis disebut juga pengeroposan tulang yaitu keadaan tulang menjadi tipis, rapuh, dan keropos serta mudah patah. WHO menyatakan definisi osteoporosis sebagai suatu gangguan pada tulang yang ditandai oleh penurunan massa tulang dan kerusakan mikroarsitektur jaringan tulang, yang meningkatkan risiko terjadinya patah tulang. National Institute of Health Consensus (2000) menyatakan definisi osteoporosis sebagai suatu gangguan pada tulang dimana terjadi penurunan kekuatan tulang dan meningkatkan resiko terjadinya patah tulang. Kekuatan tulang ditentukan oleh densitas mineral tulang dan kualitas tulang (Jacobs, 2013).

Osteoporosis adalah pengurangan massa tulang yang disebabkan oleh ketidakseimbangan antara resorpsi tulang dan pembentukan tulang. Dalam kondisi fisiologis, pembentukan tulang dan resorpsi berada dalam keseimbangan yang seimbang. Peningkatan resorpsi tulang atau penurunan pembentukan tulang dapat mengakibatkan osteoporosis. Osteoporosis dapat dipengaruhi oleh status hormonal, seperti yang terjadi pada wanita pasca menopause akibat defisiensi estrogen (Tandra, 2009).

2.4.2 Faktor Resiko Osteoporosis

Terdapat beberapa indikator lain yang menjadi faktor risiko kasus osteoporosis (Tandra, 2009). Berikut adalah faktor risiko terjadinya osteoporosis.

- a. Usia (>50 tahun), setiap peningkatan umur satu dekade berbanding lurus dengan peningkatan risiko
- b. Gender (Perempuan > Laki-laki), perempuan beresiko mengalami fraktur 2 kali dibandingkan laki-laki. Angka harapan hidup perempuan lebih tinggi sehingga prevalensi fraktur menjadi jauh lebih tinggi
- c. Kulit putih atau etnik Asia, insiden fraktur lebih tinggi pada orang kulit putih
- d. Faktor genetik, riwayat keluarga osteoporosis

- e. Amenorhea
- f. Penggunaan obat-obatan seperti steroid sistemik, suplemen tiroid, obat kemoterapi dan insulin
- g. Alkohol dan rokok
- h. Kekurangan hormon estrogen
- i. Kekurangan kalsium

2.4.3 Klasifikasi Osteoporosis

Osteoporosis dibagi menjadi dua golongan besar menurut penyebabnya, yaitu osteoporosis primer yang tidak disebabkan oleh suatu penyakit melainkan secara alamiah, dan osteoporosis sekunder yang disebabkan oleh berbagai kondisi klinis atau penyakit, seperti infeksi tulang, tumor tulang, pemakaian obat-obatan tertentu dan imobilitas yang lama (Morgan dan Hamilton, 2009).

a. Osteoporosis Primer

Osteoporosis primer berhubungan dengan berkurangnya massa tulang dan atau terhentinya produksi hormon (khusus perempuan) disamping bertambahnya usia.

Osteoporosis primer terdiri dari:

1) Osteoporosis Primer Tipe I

Sering disebut dengan istilah osteoporosis pasca menopause, yang terjadi pada wanita pasca menopause. Biasanya wanita berusia 50-65 tahun.

2) Osteoporosis Primer Tipe II

Sering disebut dengan istilah osteoporosis senile, yang terjadi pada usia lanjut. Pasien biasanya berusia 70 tahun, pria dan wanita mempunyai kemungkinan yang sama untuk terserang.

b. Osteoporosis Sekunder

Osteoporosis sekunder adalah osteoporosis yang disebabkan oleh berbagai penyakit tulang seperti reumatik kronis, arthritis, TBC spondilitis, osteomalasia, dan pengobatan steroid untuk jangka waktu yang lama, paralise otot, tidak bergerak untuk periode lama, hipertiroid.

2.4.4 Patogenesis Osteoporosis Primer Tipe 1

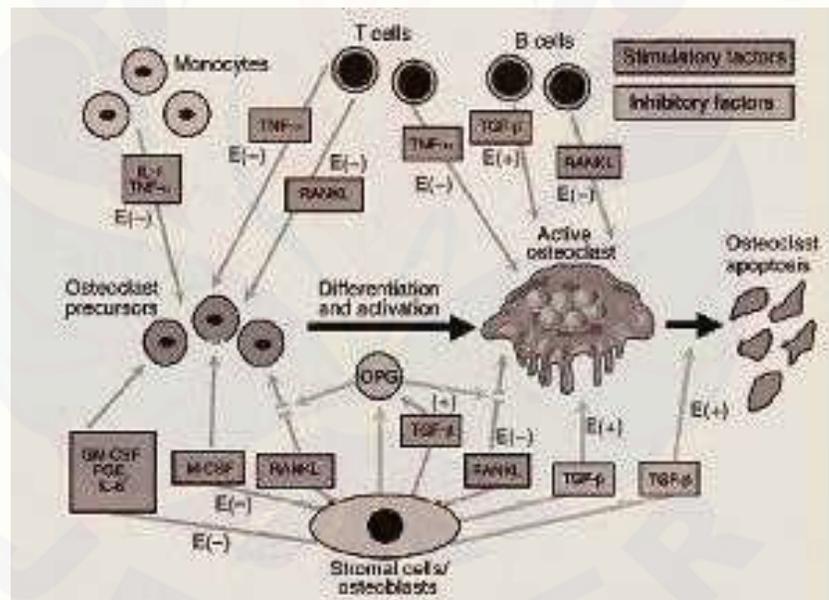
Osteoporosis pada dasarnya disebabkan oleh penyimpangan dalam *remodelling* tulang yang menyebabkan kerapuhan tulang. Dalam proses *remodelling* tulang sel stroma dan sel osteoblas mensintesis dan mengekspresikan pada membran selnya yaitu *Receptor Activator for Nuclear Factor κ Ligand* (RANK-L). RANK-L berikatan dengan suatu molekul reseptor yang dikenal dengan *Receptor Activator for Nuclear Factor κ* (RANK) yang diekspresikan oleh makrofag. Diferensiasi makrofag menjadi sel osteoklas mengisyaratkan bahwa RANK-L berikatan dengan reseptor RANK pada makrofag. Selain itu, sel stroma juga menghasilkan sitokin yang disebut *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF) yang melekat ke reseptor khusus pada makrofag (Robbins, 2007).

Aktivitas osteoklastogenik dijalur RANK-L -RANK di atur oleh molekul yang disebut *Osteoprotegerin* (OPG) yang juga diekspresikan sel stroma atau sel osteoblas. OPG adalah reseptor pengikat yang mengikat RANK-L sehingga tidak dapat berikatan dengan reseptor RANK. Jika RANK-L berikatan dengan OPG maka pembentukan sel osteoklas akan terganggu sehingga resorpsi tulang menurun (Robbins, 2007).

Faktor hormon berperan penting dalam timbulnya osteoporosis, terutama osteoporosis primer tipe I atau osteoporosis pasca menopause. Hormon estrogen dapat merangsang pembentukan OPG yang akan menghambat pembentukan sel osteoklas. Penurunan kadar estrogen menyebabkan peningkatan produksi sitokin inflamatori yaitu IL-1, IL-6, dan *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α). Sitokin ini akan meningkatkan jumlah prekursor osteoklas sehingga resorpsi tulang akan meningkat. Selain itu, beberapa penelitian melaporkan bahwa defisiensi estrogen juga menyebabkan penurunan aktivitas osteoblastik sehingga pembentukan tulang baru juga menurun. Hal ini akan menjadi faktor penurunan massa tulang sehingga terjadi osteoporosis (Setyorini *et al.*, 2009).

Estrogen merupakan hormon yang memegang peran penting dalam metabolisme tulang melalui pengaruhnya terhadap aktivitas sel osteoblas maupun

osteoklas, termasuk menjaga keseimbangan kerja dari kedua sel. Sel osteoblas memiliki reseptor estrogen *alpha* dan *betha* (ER dan ER) di dalam sitosol. Pada keadaan normal estrogen dalam sirkulasi mencapai sel osteoblas, dan beraktivitas melalui reseptor yang terdapat di dalam sitosol sel tersebut, mengakibatkan penurunan sekresi sitokin seperti Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) dan *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF-) yang merupakan sitokin yang berfungsi dalam resorpsi tulang. Estrogen juga meningkatkan sekresi *Transforming Growth Factor-beta* (TGF-), yang merupakan faktor pertumbuhan (*growth factor*) yang merupakan mediator untuk menarik sel osteoblas dalam tulang. Sel osteoblas merupakan sel target utama dari estrogen untuk melepaskan beberapa faktor pertumbuhan dan sitokin (Setyorini *et al.*, 2009).



Gambar 2.3 Patogenesis Osteoporosis (Sumber: Jacobs, 2013)

Estrogen berefek terhadap osteoklas secara langsung maupun tidak langsung. Secara tidak langsung estrogen mempengaruhi proses diferensiasi, aktivasi, maupun apoptosis dari osteoklas. Dalam diferensiasi dan aktivasinya, estrogen menekan ekspresi RANK-L, M- CSF dari sel stroma osteoblas, dan mencegah ikatan kompleks

antara RANK-L dan RANK, dengan memproduksi reseptor OPG. Secara tidak langsung estrogen menghambat produksi sitokin yang merangsang diferensiasi sel osteoklas seperti IL-6, IL-1, TNF- dan merangsang sel osteoblas memproduksi TGF- , yang selanjutnya TGF- ini menginduksi sel osteoklas untuk lebih cepat mengalami apoptosis. Sedangkan efek langsung dari estrogen terhadap osteoklas adalah melalui reseptor estrogen, akan mencegah terjadinya diferensiasi sel prekursor osteoklas dan menekan aktivasi sel osteoklas matur (Setyorini *et al.*, 2009).

2.5 Menopause

2.5.1 Definisi Menopause

Menopause adalah keadaan penurunan fungsi indung telur yang berakibat menurunnya produksi hormon estrogen pada wanita. Keadaan ini mengakibatkan terhentinya haid untuk selamanya. Usia wanita yang memasuki masa menopause berkisar antara 45 – 55 tahun (Kusdhany *et al.*, 2005). Menopause menandai akhir masa reproduksi wanita dan biasanya terjadi rentang usia 45-55 tahun dengan usia rata-rata 51 tahun (Camelia, 2008).

2.5.2 Fisiologi Menopause

Rachmawati (2006) menyatakan bahwa menopause terbagi dalam beberapa fase, perubahan wanita menuju masa *menopause* antara usia 50-65 tahun yaitu:

- a. Fase pramenopause (*klimakterium*), pada fase ini seorang wanita akan mengalami kekacauan pola menstruasi, terjadi perubahan psikologis atau kejiwaan dan perubahan fisik. Berlangsung sekitar 4-5 tahun, ini terjadi pada usia antar 48-55 tahun.
- b. Fase menopause, berhentinya menstruasi. Perubahan dan keluhan psikologis fisik makin menonjol, berlangsung sekitar 3-4 tahun, pada usia antara 56-60 tahun.
- c. Fase pasca-menopause (*senium*), terjadi pada usia di atas 60-65 tahun. Wanita beradaptasi terhadap perubahan psikologis dan fisik, keluhan makin berkurang.
- d. Ooforopause, saat ovarium kehilangan fungsi hormonalnya sama sekali.

Pada masa pramenopause, hormon estrogen dan progesteron masih tinggi, tetapi semakin rendah ketika memasuki masa perimenopause dan postmenopause. Keadaan ini berhubungan dengan fungsi ovarium yang terus menurun. Semakin meningkat usia seorang wanita, semakin menurun jumlah sel-sel telur pada kedua indung telur. Hal ini disebabkan adanya ovulasi pada setiap siklus haid, dimana pada setiap siklus, antara 20 hingga 1.000 sel telur tumbuh dan berkembang, tetapi hanya satu atau kadang-kadang lebih yang berkembang sampai matang akan juga mati, juga karena proses atresia, yaitu proses awal pertumbuhan sel telur yang segera berhenti dalam beberapa hari atau tidak berkembang. Proses ini terus menurun selama kehidupan wanita hingga sekitar 50 tahun karena produksi ovarium menjadi sangat berkurang dan berakhir berhenti bekerja (Sondakh *et al.*, 2001).

Penurunan fungsi ovarium menyebabkan berkurang kemampuan ovarium untuk menjawab rangsangan gonadotropin, keadaan ini mengakibatkan interaksi antara hipotalamus-hipofisis terganggu. Pertama, terjadi kegagalan fungsi korpus luteum. Kemudian, turunnya produksi steroid ovarium menyebabkan berkurangnya reaksi umpan balik negatif terhadap hipotalamus. Keadaan ini meningkatkan produksi *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH). FSH memiliki peningkatan kadar lebih tinggi dibanding LH.. Kadar FSH pada masa menopause adalah 30-40 mIU/ml (Sondakh *et al.*, 2001).

2.5.3 Tanda dan Gejala Menopause

Tanda dan gejala menopause menurut Rachmawati (2006) meliputi :

a. Fisik

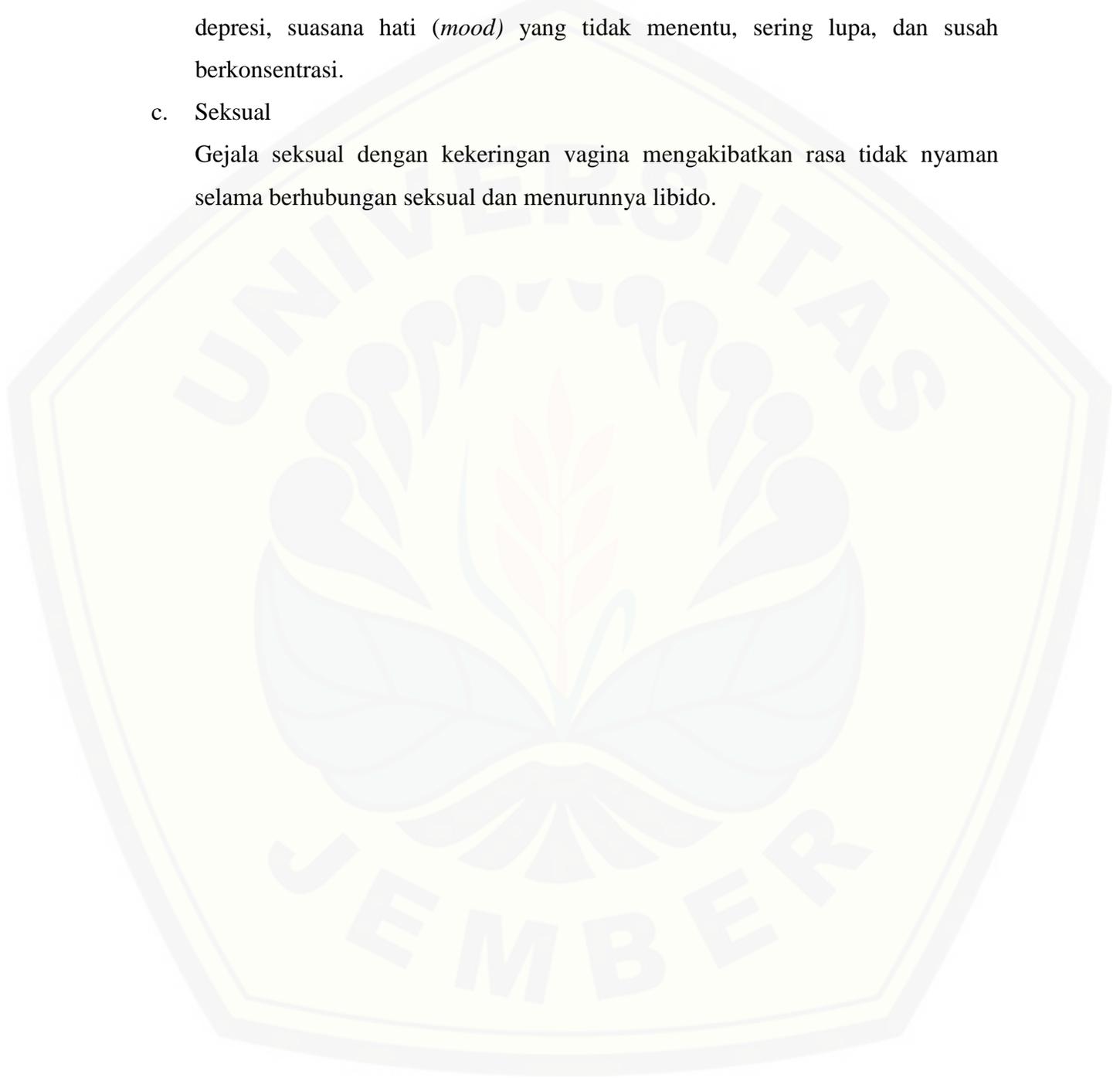
Gejala fisik yang umum terjadi berupa, *hot flushes* (rasa panas) pada wajah, leher dan dada yang berlangsung selama beberapa menit, berkeringat di malam hari, berdebar-debar, susah tidur, sakit kepala, keinginan buang air kecil lebih sering, penurunan kekuatan tulang dan kalsifikasi tulang diseluruh tubuh.

b. Psikologis

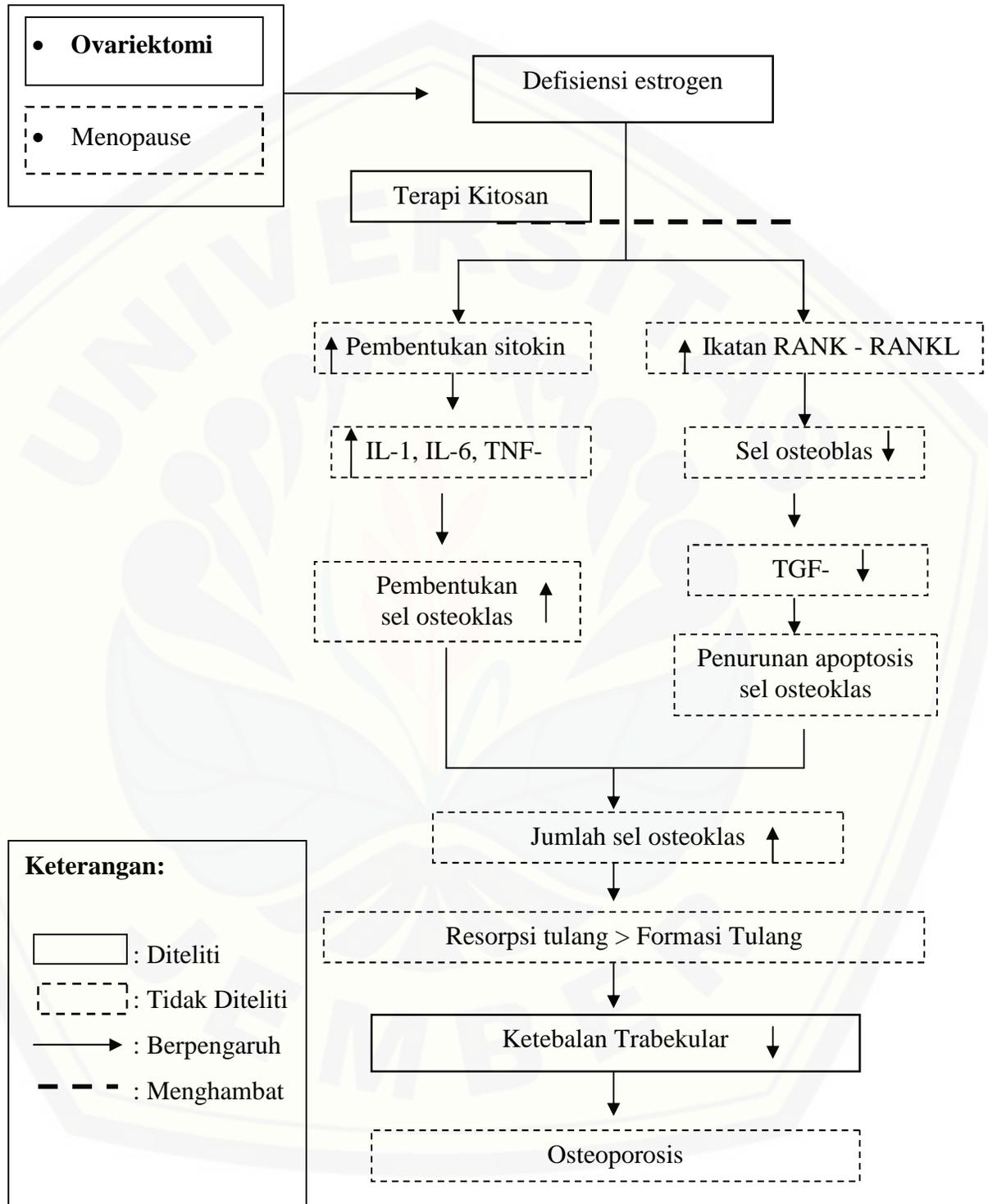
Gejala psikologis ditandai dengan sikap yang mudah tersinggung, cemas, depresi, suasana hati (*mood*) yang tidak menentu, sering lupa, dan susah berkonsentrasi.

c. Seksual

Gejala seksual dengan kekeringan vagina mengakibatkan rasa tidak nyaman selama berhubungan seksual dan menurunnya libido.



2.6 Kerangka Konseptual



Gambar 2.4 Kerangka Konseptual

2.7 Hipotesis Penelitian

Pemberian kitosan cangkang udang (*Penaeus merguensis*) dapat meningkatkan ketebalan trabekular tulang femur pada tikus wistar betina pasca ovariektomi.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian *eksperimental laboratories* dengan desain penelitian *Quasy-experimental* (Pratiknya, 2003).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *the post only control group design* yaitu dengan melakukan pengukuran setelah perlakuan diberikan, tanpa melakukan pengukuran sebelum perlakuan diberikan (Pratiknya, 2003).

3.3 Waktu dan Tempat penelitian

3.3.1 Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober – November 2013.

3.3.2 Tempat penelitian

Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember (pembinaan hewan coba), Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember (perlakuan ovariektomi), Laboratorium Kimia Dasar FMIPA Universitas Jember (ekstraksi cangkang udang putih), Laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr. Soebandi (preparasi jaringan), Laboratorium Biomed Fakultas Farmasi Universitas Jember (pengukuran tebal trabekular).

3.4 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah tikus putih (*Ratus norvegicus L.*) galur Wistar berjenis kelamin betina untuk dilakukan ovariektomi sehingga terjadi depresi estrogen yang memicu terjadinya keadaan osteoporosis.

3.5 Sampel Penelitian

3.5.1 Kriteria Sampel

- a) Tikus putih (galur/*strain* Wistar)
- b) Jenis kelamin betina
- c) berat badan \pm 150-250 gram
- d) Usia tikus \pm 3 bulan

3.5.2 Besar Sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Budiarto, 2003):

$$n = \frac{z^2 \sigma^2}{d^2}$$

n = besar sampel tiap kelompok

z = nilai pada tingkat kesalahan tertentu, jika z = 1,96 dan $\sigma = 0,05$

σ = standar deviasi sampel (0,05)

d = kesalahan yang masih dapat ditoleransi (5%)

Perhitungannya adalah sebagai berikut:

$$n = \frac{z^2 \sigma^2}{d^2}$$

$$n = \frac{(1,9)^2 \sigma^2}{d^2}$$

$$= (1,96)^2$$

$$= 3,84$$

$$= 4$$

Berdasarkan perhitungan rumus tersebut dalam penelitian ini ditambahkan 25% dari besar sampel minimal setiap kelompok maka besar sampel yang digunakan dalam penelitian adalah 5 dalam setiap kelompok sampel.

3.5.3 Pengelompokan Sampel

Pengelompokan sampel pada penelitian ini menggunakan *simple random sampling* agar setiap sampel dalam kelompok penelitian memiliki peluang yang sama. Jumlah kelompok sampel sebesar 3 kelompok dengan jumlah sampel masing-masing kelompok adalah 5 ekor tikus wistar betina. Jumlah sampel seluruhnya adalah 15 ekor tikus.

- a. Kelompok K adalah kontrol tanpa ovariektomi dan pemberian kitosan
- b. Kelompok K- adalah kelompok kontrol negatif yang dilakukan ovariektomi tanpa pemberian kitosan
- c. Kelompok P adalah kelompok perlakuan yang dilakukan ovariektomi dan diberikan kitosan

3.6 Variabel Penelitian

3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah kitosan cangkang udang putih (*Penaeus merguensis*).

3.6.2 Variabel Terikat

Variable terikat pada penelitian ini adalah tebal trabekular pada tulang femur.

3.6.3 Variabel Terkendali

- a. Kriteria sampel penelitian
- b. Cara pemberian kitosan cangkang udang putih (*Penaeus merguensis*)

- c. Dosis kitosan cangkang udang putih (*Penaeus merguensis*)

3.7 Definisi Operasional

3.7.1 Ovariektomi

Ovariektomi adalah pengeluaran ovarium melalui pembedahan berdasarkan standar prosedur tetap ovariektomi oleh *Cancer Chemoprevention Research Center* Fakultas Farmasi UGM. Pada penelitian ini dilakukan ovariektomi pada hewan coba untuk mengkondisikan hewan coba dalam kondisi menopause akibat penurunan hormon estrogen. Proses pengambilan ovarium tikus dilakukan dengan menginsisi arah longitudinal sepanjang 1 cm pada kulit di daerah punggung 1,5-2 cm dari tulang vertebra dan 1,5-2 cm dari tulang femur bagian proksimal. Insisi dilakukan sampai lapisan lemak di bawah kulit melalui dinding peritonium. Proses ovariektomi pada hewan coba didapatkan dua ovarium berbentuk granul seperti anggur, berwarna putih dan berada di bawah kolon. Proses resorpsi tulang terjadi dua minggu pasca-ovariektomi pada hewan coba akibat pembentukan sitokin inflamatori dan peningkatan RANKL (Onal *et al.*, 2012).

3.7.2 Kitosan

Kitosan adalah mikromolekul biologi yang dapat diperoleh melalui proses deasetilasi dari kitin pada cangkang udang putih (*Penaeus merguensis*) dalam sediaan bubuk.. Japan Health Food and Nutrition Food Association (dalam Alfiani *et al.*, 2008) menyatakan dosis kitosan yang dianjurkan pada manusia adalah 3000-6000 mg per hari. Penelitian terdahulu mengenai pengaruh kitosan terhadap penurunan kadar trigliserida dengan dosis 3000mg/hari menyatakan hasil yang tidak signifikan sehingga dalam penelitian ini dosis yang diberikan adalah 3500mg/hari. Dengan menggunakan tabel konversi, maka didapatkan kitosan yang diberikan: $3500 \text{ mg} \times 0,018 = 63 \text{ mg}$. Jika rata-rata berat badan tikus adalah 150 gram, maka kitosan yang diberikan adalah 47,25 mg atau dibulatkan 0,05 g/hari. Kitosan dalam bentuk serbuk dilarutkan dalam asam asetat 0,6% dan aquades (1:4) dan diberikan pada hewan coba

peroral menggunakan sonde lambung dosis tunggal selama dua minggu (14 hari). Volume lambung tikus maksimal adalah 5 ml, sehingga apabila diberikan dosis lebih besar dikhawatirkan lambung tikus tidak mampu menampung volume pemberian.

3.7.3 Ketebalan Trabekular

Ketebalan trabekular adalah hasil rata-rata dari pengukuran jarak antar tepi trabekular dalam satu trabekular di daerah metafisis tulang femur dextra, yang secara histologis ditandai dengan adanya sel osteoblas yang berderet secara epitelial di sepanjang tulang trabekular, pada perbesaran 400x menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX53 yang kemudian ditransfer ke komputer yang dilengkapi dengan *Tool Image Software*. Pemotongan tulang femur dilakukan 1 cm di atas trokanter mayor dan 1 cm di bawah trokanter minor. Pengamatan ketebalan trabekular dilakukan dengan metode zig-zag dari kiri ke kanan dengan memilih gambaran trabekular yang homogen tanpa proses *healing*. Hasil dari pengukuran tiga lapang pandang ketebalan trabekular oleh tiga pengamat dalam satu preparat jaringan akan dijumlah dan dibagi sembilan untuk mencari rata-rata ketebalan trabekular per-preparat jaringan.

3.8 Alat dan bahan penelitian

3.8.1 Alat penelitian

Alat penelitian terdiri dari kandang tikus, tempat makan dan minum tikus, lab handuk, senter, timbangan analitik, alat pengepres, alat pendingin, alat pengering (oven), gelas piala, thermometer, sonde lambung, sarung tangan (Latex), masker, dissecting set, jarum syringe, pisau scapel, pinset, kapas dan kain kassa, benang dan jarum jahit, papan paraffin, jarum pentul, pisau bedah, tabung anastesi, blender, ayakan 100 mesh, kertas saring Whatman no.42, pompa vakum, penggaris, tempat jaringan, dan mikroskop kamera BX53.

3.8.2 Bahan penelitian

Bahan terdiri dari cangkang udang putih, 15 tikus Wistar betina, air, pakan tikus, betadin, eter chloride, ketamin, larutan formalin buffer 10%, larutan EDTA 10%, alkohol 70%; 80%; 95% dan 96%, NAOH 8% dan 50%, HCL 1,25 N, aquades, asam asetat dan larutan PBS.

3.9 Prosedur Penelitian

3.9.1 Tahap Awal

a. Persiapan hewan coba

Hewan coba (tikus Wistar betina) diadaptasikan terhadap lingkungan kandang di Laboratorim Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember selama 1 minggu. Hewan coba diberi makanan standar dan minuman setiap hari *ad libitum* (sesukanya) dan ditimbang kemudian dikelompokkan secara acak sesuai dengan pengelompokan pada sampel penelitian meliputi kelompok kontrol (non-ovariektomi), kelompok kontrol negatif (ovariektomi) tanpa pemberian kitosan dan kelompok perlakuan (ovariektomi) dengan pemberian kitosan.

b. Ekstraksi cangkang udang

Tahap ini dilakukan dengan mengekstrak cangkang udang menjadi kitin terlebih dahulu, kemudian kitin diekstrak lagi menjadi kitosan sesuai prosedur dalam penelitian Suharjo dan Harini (2005).

1) Pengolahan kitin

1. Pencucian dan pembersihan kulit udang, pengeringan di bawah sinar matahari selama 2 hari atau oven pada suhu 80°C selama 24 jam.
2. Deproteinasi (penghilangan protein) menggunakan NaOH konsentrasi 8% dengan rasio 1/6 (b/v) pada suhu 80-85°C selama 1 jam.
3. Pendinginan, penyaringan, pencucian, demineralisasi (penghilangan mineral) menggunakan HCl konsentrasi 1,25 N dengan rasio 1/10 (b/v) pada suhu 100°C selama 2 jam sehingga ber-pH netral.
4. Pengeringan dengan oven pada suhu 80°C selama 24 jam.

2) Pengolahan kitosan

1. Setelah terbentuk lembaran dari pengolahan kitin sebelumnya, lakukan penghancuran (pengecilan ukuran) dengan penumpukan secara kasar atau pemblenderan, pengayakan menggunakan ayakan dengan ukuran 100 mesh.
2. Deasetilasi (penghilangan gugus asetil) menggunakan penambahan NaOH dengan konsentrasi 50% dengan rasio 1:20 pada suhu 120°C selama 1 jam.
3. Pendinginan untuk mengembalikan pada suhu kamar sehingga bahan mudah disaring menggunakan kertas saring Whatman No.42 dan dibantu dengan pompa vakum untuk mempercepat proses.
4. Pencucian untuk menghilangkan sisa-sisa pelarut (NaOH) yang digunakan pada tahap deasetilasi sampai pH netral.
5. Pengeringan menggunakan suhu 100°C selama 24 jam selanjutnya terbentuk bubuk kasar kitosan.
6. Penggerusan dan pengayakan sampai didapatkan bubuk halus kitosan.

c. Konversi perhitungan dosis kitosan

Dosis kitosan yang dianjurkan pada manusia adalah 3000-6000 mg per hari (Alfiani *et al.*, 2008). Penelitian terdahulu mengenai pengaruh kitosan terhadap penurunan kadar trigliserida dengan dosis 3000 mg/hari menyatakan hasil yang tidak signifikan. Dalam penelitian ini dosis yang diberikan adalah 3500 mg/hari. Dengan menggunakan tabel konversi, maka didapatkan kitosan yang diberikan $3500 \text{ mg} \times 0,018 = 63 \text{ mg}$. Jika rata-rata berat badan tikus adalah 150 gram, maka kitosan yang diberikan adalah 47,25 mg atau dibulatkan 0,05 g/hari.

Tabel 3.1 Dosis konversi hewan coba

	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmut 400 g	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	12,29	27,8	28,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	60,5
Marmut 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,06	2,4	4,5	14,2
Kucing 2 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,76	0,16	0,32	1,0

Sumber: Alfiani *et al.*, 2008

3.9.2 Tahap Perlakuan

- a. Sebanyak 15 ekor tikus dibagi menjadi tiga kelompok.
- b. Setiap ekor tikus pada kelompok perlakuan dihitung berat badannya sebagai panduan pemberian dosis kitosan.
- c. Dilakukan ovariektomi pada kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan untuk mendapatkan hewan coba dengan kondisi osteoporosis eksperimental yang disebabkan defisiensi estrogen n. Ovariektomi atau teknik pengambilan kedua ovarium dilakukan menurut prosedur tetap *Cancer Chemoprevention Research Center* Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada sebagai berikut.

Tabel 3.2 Proses Ovariectomi

No.	Prosedur Kerja	Perhatian/Gambar
1.	<p>Siapkan perlengkapan pendukung pembedahan</p> <p>terdiri dari:</p> <ul style="list-style-type: none">• Blanko untuk mencatat data• Kamera digital• Jas lab, masker, dan <i>gloves</i>	
2.	<p>Siapkan semua peralatan dan bahan operasi dimeja operasi. Lakukan desinfeksi meja operasi dengan spraying etanol 70% di seluruh meja operasi. Lapsi meja dengan <i>wrapping</i> plastik kemudian desinfeksi lagi dengan spraying etanol 70%. Tempatkan peralatan bedah pada satu box yang disemprot etanol 70%.</p>	
3.	<p>Peralatan bedah yang disiapkan terdiri dari:</p>	

- Gunting bedah (2 macam)
kecil bengkok besar.
 - Pinset tumpul, digunakan
untuk memudahkan
membedah dan memegang
ovarium dan objek.
 - Papan bedah, tempat
operasi dilakukan.
 - Beker glass, tempat etanol
70% untuk merendam
jarum bedah, benang
bedah dan peralatan bedah
setelah digunakan.
 - Kapas dan betadine untuk
menghentikan pendarahan
dan mengobati luka
setelah operasi dilakukan
 - *Cat gut* ukuran 4.0/6.0
 - Jarum bedah yang
berdiameter paling kecil
(13 mm).
4. Timbang tikus, catat berat
badannya, kemudian siapkan di
atas meja untuk dianestesi.

5. Tikus dianastesi menggunakan ketamin sebanyak 0,075 ml. Anestesi dilakukapan pada daerah tulang femur bagian dalam/luar secara *intra muscular*. Sekitar 5 menit, tikus akan tertidur (\pm 45 menit)



6. Letakkan tikus di atas papan parafin yang sebelumnya telah terlapisi plastik lalu keempat kaki ditancapkan dengan jarum (posisi tikus pronasi).



7. Cukur rambut tikus di area bedah \pm seluas 4 cm².

8. Insisi longitudinal sepanjang 1 cm pada kulit di daerah punggung 1,5-2 cm dari tulang vertebra dan 1,5-2 cm dari tulang femur bagian proksimal. Insisi dilakukan sampai lapisan lemak di bawah kulit. Insisi melalui dinding peritoneal.



9. Bagian lemak ditarik keluar, ovarium diangkat kemudian digunting dan diusahakan untuk menghindari perdarahan.

Ovarium berbentuk granul-granul seperti anggur dan berada di bawah kolon kemudian potong dan sisihkan.



10. Masukkan kembali lemak dan oviduk ke dalam rongga peritoneal.



11. Jahit kulit dalam (peritoneum) sebanyak 1 simpul dan kulit luar sebanyak 2 simpul kemudian diberi betadin.

12. Ulangi prosedur di atas untuk mengambil ovarium dari sisi yang berlawanan.

13. Tikus yang telah dilakukan ovariektomi kemudian diletakkan pada kandang tunggal beralaskan kertas dan tisu lalu diberi makanan dan botol minum selama 1 minggu dan kondisi kesehatan diamati pasca ovariektomi.



14. Perhatikan kebersihan kandang tikus. Setelah tikus dirasa telah pulih, ganti alas tisu dengan sekam.



15. Kemudian tikus diletakkan pada masing-masing kandang sesuai perlakuan selanjutnya (pemberian kitosan).

Sumber: *Cancer Chemoprevention Research Center Farmasi, UGM (2009).*

- d. Masing-masing kelompok diberi makanan dan minuman standar tikus.
- e. Kelompok perlakuan diberikan diet khusus kitosan serbuk peroral menggunakan sonde lambung satu kali setiap hari selama 14 hari dengan dosis

yang telah di konversikan sebanyak 0,05 g/hari. Kitosan serbuk terlebih dahulu ditambahkan dengan asam asetat dan aquades (1:4). Penelitian Sularsih dan Soeprijanto (2012) menyatakan bahwa pemberian kitosan gel 1% setara 1 gram selama 7 hari dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas pada proses penyembuhan luka pencabutan gigi yaitu pada proses *remodelling* tulang alveolaris.

3.9.3 Tahap Pembuatan Preparat Jaringan

- a. Setelah perlakuan diberikan selama 14 hari, tikus kelompok kontrol, kontrol negatif dan perlakuan dimasukkan ke dalam stoples berisi kapas yang telah dibasahi éter, kemudian tikus didekaputasi.
- b. Tulang femur dextra diambil dan dipisahkan dari jaringan lunak dan lemak menggunakan skalpel.
- c. Jaringan difiksasi menggunakan larutan *formaldehyde* 10% kurang lebih 24 jam untuk melunakkan tulang femur.
- d. Setelah sampel jaringan lunak, dilakukan preparasi jaringan pada tulang femur dengan cara :
 - 1) Persiapan wadah yang besarnya sesuai dengan jaringan yang akan dikirim
 - 2) Wadah dengan TBD 1 *Decalcifier* yang berisi HCL dengan formalin buffer 10% dengan perbandingan 1:9 menggunakan volume minimal 5 kali volume jaringan.
 - 3) Masukkan segera jaringan segar ke dalam wadah formalin kurang dari 30 menit.
 - 4) Beri label identitas dan jenis jaringan.
 - 5) *Processing* jaringan dimulai dari penyempurnaan fiksasi, dehidrasi, clearing, impregnasi, pengelompokan dengan paraffin cair, pemotongan blok paraffin dengan *microtome* dan pewarnaan.
 - 6) Jenis bahan yang digunakan dalam pewarnaan umum adalah *Hematoxillin-Eousin* (HE). Pewarnaan bertujuan agar dapat mempertajam atau

memperjelas elemen jaringan, terutama sel-selnya, sehingga dapat dibedakan dan ditelaah dengan mikroskop.

- 7) Setelah dilakukan pewarnaan kemudian dikeringkan, setelah kering rendam didalam larutan xillon dan angkat satu persatu kemudian ditetesi entelan secukupnya dan tutup dengan cover glass (Muntiha, 2001).

3.9.4 Tahap pengukuran ketebalan trabekular

- a. Preparat difoto di bawah mikroskop kamera Olympus BX53 dengan perbesaran 100x untuk melihat dan membedakan zona lempeng epifisis dan metafisis trabekular dan perbesaran 400x untuk mengukur ketebalan trabekular. Perbesaran 400 dipilih karena melalui perbesaran ini dapat diukur parameter histomorfometri berupa ketebalan trabekular, ketebalan osteoid, jarak antar-trabekular (Dal Mas *et al.*, 2007).
- b. Tulang trabekular diukur ketebalannya menggunakan pilihan *Start Measurement* pada *Tool Image Software* di layar computer dari tepi trabekular ke tepi lainnya dalam satu trabekular. Pengukuran dilakukan dalam tiga lapang pandang oleh tiga orang pengamat secara zig-zag dari kiri ke kanan dengan memilih gambaran trabekular homogen tanpa proses healing. Selanjutnya, pengukuran dalam satu preparat dibagi sembilan untuk mendapat rata-rata ketebalan trabekular per-preparat jaringan.

3.9.5 Analisis Data

Analisis data menggunakan tes *Shapiro-Wilk* untuk menguji normalitas data dan *Levene's Test* untuk menguji homogenitas. Selanjutnya digunakan uji *One Way Anova* dengan tingkat kemaknaan 95% ($p < 0,05$) untuk mengetahui perbedaan antara variabel bebas dan variabel terikat. Jika terdapat perbedaan yang bermakna, selanjutnya dilakukan uji *Least Significant Difference* (Dahlan, 2009).

Hipotesis dari penelitian ini diterima jika $p < 0,05$ yaitu, terdapat peningkatan ukuran tebal trabekular, dan ditolak jika $p > 0,05$ yaitu, tidak terdapat peningkatan

ukuran tebal trabekular pada kelompok tikus wistar betina yang dilakukan ovariektomi dan diberikan kitosan cangkang udang putih.

