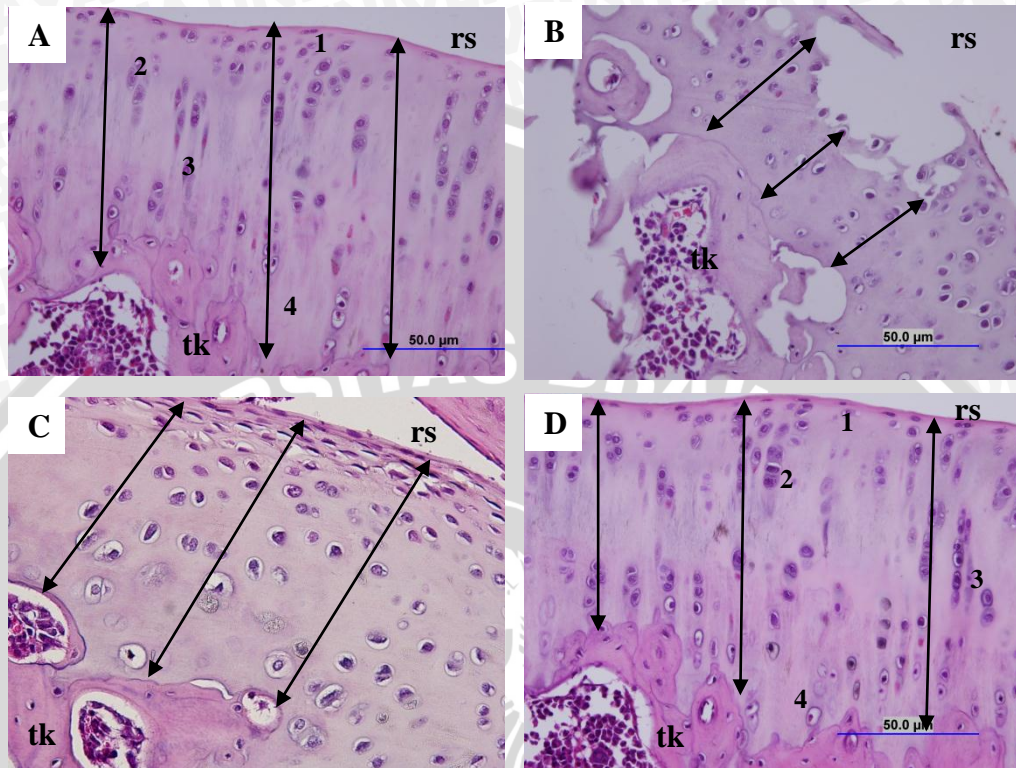


BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Cangkang Siput Air (*Pila ampullacea*) pada tikus putih (*Rattus novergicus*) Model Osteoarthritis terhadap tebal lapisan kartilago artikular

Pengukuran ketebalan lapisan kartilago artikular dilakukan dengan cara mengamati kartilago pada bagian sendi lutut kanan belakang bagian proximal os tibia-fibula dikarenakan osteoarthritis sering terjadi pada kaki belakang. Sesuai gambaran histopatologis dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) dapat dilihat perubahan struktur ketebalan kartilago artikular yang ditunjukkan pada **Gambar 5.1**. Pengukuran ketebalan kartilago diamati menggunakan *software* Outilab® perbesaran 400x dan *ImageRaster* 3 dengan 5 lapang pandang dengan 1 lapang pandang masing-masing diukur 3x pengukuran pada area samping kiri, tengah dan samping kanan.

Ketebalan kartilago pada masing-masing kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan yang ditandai dengan perbedaan tebal lapisan. Pada kelompok kontrol negatif, ketebalan lapisan kartilago artikular dalam kondisi tidak terjadi kerusakan (**Gambar 5.1.A**). Sedangkan pada kelompok kontrol positif terjadi penurunan ketebalan kartilago (**Gambar 5.1.B**). Ketebalan kartilago pada setiap kelompok terapi ekstrak cangkang siput air menunjukkan adanya peningkatan ketebalan kartilago. Kelompok yang menunjukkan peningkatan paling signifikan adalah kelompok terapi ekstrak cangkang siput air dosis 3 g/kg BB.



Gambar 5.1 Pengukuran ketebalan kartilago artikular sendi lutut tikus model OA dengan pewarnaan *hematoksin eosin* (Perbesaran 400x)

Keterangan: (A) Tikus kontrol negatif. (B) Tikus kontrol positif. (C) Tikus OA + terapi dosis 1 g/kg BB (D) Tikus OA + terapi dosis 3 g/kg BB.

- ↑↓ = Ketebalan kartilago artikular
- rs = Ruang sendi
- tk = Tulang keras
- 1 = Lapisan superfisial kartilago
- 2 = Lapisan intermediet kartilago
- 3 = Lapisan radial kartilago
- 4 = Lapisan kalsifikasi + tulang subkondral

Setelah rata-rata ketebalan kartilago artikular setiap kelompok didapatkan, selanjutnya dilakukan uji statistika diantaranya adalah uji normalitas, uji homogenitas, uji *One Way ANOVA* serta uji Beda Nyata Jujur (BNJ).

Hasil uji normalitas dan homogenitas nilai ketebalan kartilago artikular pada semua kelompok perlakuan menunjukkan bahwa semua data tersebut berdistribusi normal dan data berasal dari kelompok-kelompok yang homogen (Lampiran 15), sehingga dapat dilanjutkan dengan uji *One Way* ANOVA. Uji *One Way* ANOVA menunjukkan bahwa perlakuan terapi ekstrak cangkang siput air (*Pila ampullacea*) pada tikus model OA hasil induksi enzim papain secara intraartikular memberikan pengaruh yang berbeda signifikan ($p < 0.05$) terhadap ketebalan kartilago artikular.

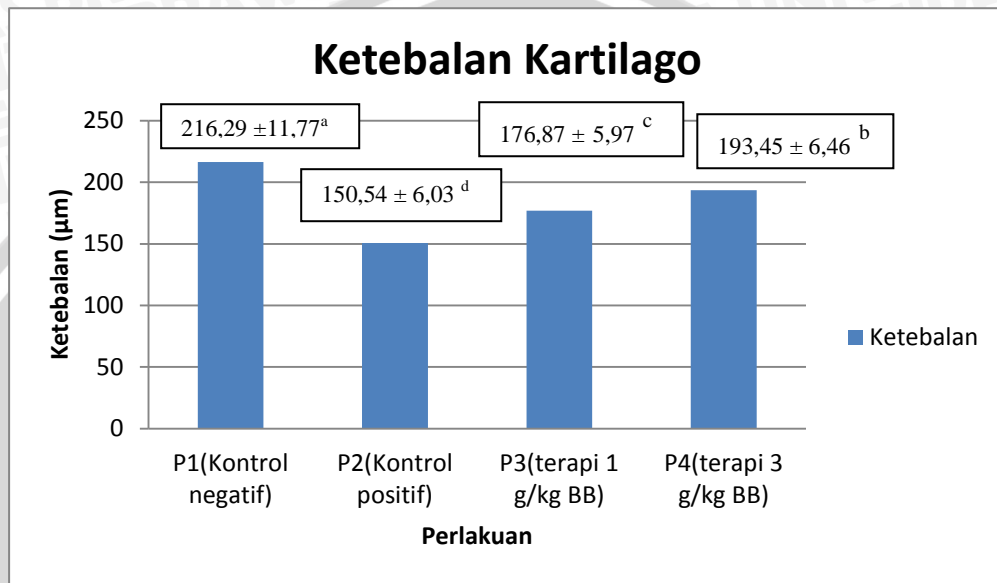
Uji Beda Nyata Jujur (BNJ)/*Tukey's procedure* dengan tingkat kesalahan $\alpha=5\%$ menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan yang diberikan. Hasil ketebalan kartilago artikular pada tikus kontrol negatif, kontrol positif, terapi dosis 1 g/kg BB dan terapi dosis 3 g/kg BB disajikan dalam (Tabel 5.1).

Tabel 5.1 Rata-rata ketebalan kartilago artikular sendi lutut tikus (*Rattus norvegicus*) model OA dan terapi ekstrak cangkang siput air (*Pila ampullacea*)

Kelompok	Ketebalan Kartilago (μm) Rata-rata \pm SD	Ketebalan Kartilago (%)	
		Peningkatan terhadap Kontrol Positif	Penurunan terhadap Kontrol Negatif
P1 (Kontrol negatif)	216,29 \pm 11,77 ^a	-	-
P2 (Kontrol positif)	150,54 \pm 6,03 ^d	-	30,39 %
P3 (Terapi 1 g/kgBB)	176,87 \pm 5,97 ^c	17,48 %	-
P4 (Terapi 3 g/kgBB)	193,45 \pm 6,46 ^b	28,50 %	-

Keterangan: Angka dengan notasi (a, b, c, d) berbeda menunjukkan adanya perbedaan $p < 0.05$ antar kelompok perlakuan.

Perbandingan rata-rata ketebalan kartilago artikular sendi lutut tikus (*Rattus norvegicus*) model OA dan terapi ekstrak cangkang siput air (*Pila ampullacea*) yang telah dianalisis disajikan pada (**Gambar 5.2**) berikut ini :



Gambar 5.2 : Perbandingan nilai rata-rata dan hasil Tukey ketebalan kartilago artikular.

Keterangan : notasi a, b, c, d menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$)

Nilai rata - rata persentase ketebalan kartilago pada kelompok P1 memiliki nilai tertinggi yaitu sebesar $216,29 \pm 11,77$ dibandingkan dengan nilai rata-rata persentase ketebalan kartilago pada kelompok perlakuan lainnya, sehingga kelompok P1 dijadikan sebagai acuan untuk mengetahui adanya penurunan yang terjadi pada kelompok P2. Pada kelompok P1 menunjukkan ketebalan kartilago yang tidak mengalami kerusakan, sedangkan kelompok P2 menunjukkan penurunan nilai rata-rata ketebalan kartilago yang sangat menurun yaitu sebesar 30,39% terhadap kelompok P1.

Kelompok P3 dan P4 masing-masing dibandingkan dengan kelompok P2 untuk mengetahui kelompok perlakuan yang terbaik untuk meningkatkan nilai rata-rata ketebalan kartilago articular sendi lutut tikus model OA. Kelompok P3 dan P4 masing-masing memiliki nilai rata-rata persentase ketebalan kartilago sebesar $176,87 \pm 5,97$ dan $193,45 \pm 6,46$ atau mengalami peningkatan sebesar 17,48% dan 28,50% dibandingkan dengan kelompok P2. Kelompok yang memiliki peningkatan paling signifikan apabila dibandingkan dengan kelompok P2 adalah kelompok P4. Peningkatan yang signifikan ($p < 0,05$) ditandai dengan perbedaan notasi huruf antara kelompok P2 dengan kelompok perlakuan terapi ekstrak cangkang siput air berdasarkan analisis statistika.

Adanya peningkatan nilai rata-rata ketebalan kartilago articular secara berturut-turut pada kelompok P3 dan P4 menunjukkan bahwa semakin besar dosis terapi ekstrak cangkang siput air yang diberikan, maka semakin tinggi nilai ketebalan kartilago articular tikus. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dengan dosis terapi 3 g/kg BB merupakan dosis yang dapat meningkatkan nilai rata-rata ketebalan kartilago articular paling signifikan dibandingkan dengan kelompok P2 ($p < 0,05$).

Kartilago articular terdiri dari empat bagian, yaitu zona superfisial, zona intermediet (*middle*), zona radial (*deep*), serta zona kartilago kalsifikasi, bagian kartilago yang berbatasan langsung dengan tulang. Zona superfisial terdiri dari kondrosit pipih yang tersusun parallel mengikuti bentuk

permukaan artikular. Zona ini mensekresi *lubricin* sebagai pelumas sehingga mengurangi gesekan antar tulang saat bergerak. Zona superfisial mengandung sedikit proteoglikan dengan banyak serat kolagen. Hal tersebut menyebabkan zona superfisial mampu menahan tekanan ketika sendi bergerak (Poole A.R. *et al.*, 2001). Zona intermediet mengandung banyak proteoglikan dengan serat kolagen yang lebih tebal yang tersusun secara radial. Pada zona intermediet kondrosit berbentuk bulat. Zona radial dibawah zona intermediet terdiri dari serat kolagen terbesar yang tersusun secara radial. Zona radial juga mengandung aggrekan dengan jumlah paling banyak dan kondrosit tersusun sejajar dengan serat kolagen yaitu ke arah vertikal. Kartilago non kalsifikasi tersusun dari zona superfisial hingga zona radial (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

Kartilago kalsifikasi merupakan kartilago yang membatasi kartilago non kalsifikasi (kartilago hialin) dengan tulang subkondral. Kartilago kalsifikasi tidak terlalu banyak mengandung kondrosit dan kondrosit yang terkandung pun mengalami hipertropi (Martel-Pelletier *et al.*, 2008). Kartilago kalsifikasi utamanya terdiri dari kolagen tipe X yang memiliki peran penting dalam melindungi kartilago dan sebagai peredam kejut bersama dengan tulang subkondral (Madry *et al.*, 2010).

Ketebalan kartilago artikular sendi lutut tikus kontrol negatif (P1) menunjukkan bentuk normal kartilago terdiri dari serat kolagen dan proteoglikan yang merupakan komponen utama matrik ekstrasellular dan

merupakan komponen yang sangat penting dalam tulang rawan sendi. Serat kolagen dan matriks ekstraseluler disintesis oleh kondrosit. Kondrosit terlihat adanya keteraturan susunan lapisan pada kartilago artikular yaitu kartilago non kalsifikasi tersusun dari zona superfisial, intermediet, radial (*deep*) serta kartilago kalsifikasi yang berbatasan langsung dengan tulang.

Ketebalan kartilago artikular pada kelompok P2 mengalami penurunan sebesar 30,39% dan menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok P1. Hal tersebut menandakan bahwa pada kondisi hewan coba OA hasil induksi enzim papain mampu menurunkan ketebalan kartilago artikular. Adanya penurunan ketebalan kartilago artikular pada kelompok kontrol positif disebabkan karena adanya pemberian enzim papain yang mampu merusak matriks ekstraseluler kartilago artikular sehingga tampak pada permukaan kartilago artikular terjadi fibrilasi, terbelah-belah atau robekan dan tidak rata. Serabut kolagen matrik ekstraseluler longgar, tidak terdapat kondrosit dalam lakuna sampai daerah tengah, kondrosit didaerah dalam berbentuk bulat dan mengalami hipertropi dalam jumlah sedikit.

Osteoarthritis merupakan penyakit muskuloskeletal yang sering terjadi dimana gejala klinis yang muncul adalah nyeri pada sendi yang disertai dengan penurunan fungsi sendi seperti kekakuan. Keberhasilan induksi dari enzim papain untuk menginduksi osteoarthritis ditandai adanya perubahan seperti penambahan ukuran diameter dari lutut akibat pembengkakan (Pathak,

2014) (Lampiran 13). Enzim papain sebagai enzim proteolitik mempunyai mekanisme kerja analog dengan enzim metalloproteinase menyebabkan terjadinya osteoarthritis karena dapat mendegradasi kolagen dan proteoglikan mengakibatkan terjadinya OA (Khan *et al.*, 2013). Peningkatan aktivitas enzim metalloproteinase akan meningkatkan aktifitas enzim proteinase dalam mendegradasi makro molekul matrik ekstraseluler sehingga akan menurunkan komponen proteoglikan dan kolagen dalam tulang rawan sendi (Sutjiati, 2000).

Hasil degradasi matriks ekstraseluler kartilago adalah kerusakan kartilago artikular serta menghasilkan beberapa serpihan kartilago yang masuk ke dalam ruang sendi lutut hewan coba (Khan *et al.*, 2013). Masuknya serpihan kartilago ke dalam ruang sendi akan mengakibatkan terjadinya aktivasi dari makrofag yang ada pada cairan sinovial dan membran sinovial sendi lutut. Aktivasi makrofag menyebabkan terbentuknya sitokin pro-inflamasi pada sendi seperti IL-1 dan TNF- α (Aigner dan Schmitz, 2010).

Sitokin yang dihasilkan oleh makrofag selanjutnya dapat melakukan penetrasi ke dalam kartilago, sitokin pro-inflamasi akan menempel pada kondrosit untuk selanjutnya melakukan aktivasi NF- κ B. *Nuclear Factor- κ B* merupakan faktor transkripsi dari iNOS yang dapat ditemukan secara normal di sitoplasma kondrosit dalam keadaan tidak aktif karena berikatan dengan *Inhibitor- κ B* (IkB). Sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 dan TNF- α mampu mengaktivasi enzim yang disebut IkB kinase, dengan cara memfosforilasi

IkB sehingga ikatan antara NF-kB dengan IκB dapat terlepas dan menyebabkan teraktivasi NF-kB. *Nuclear Factor* - κB yang telah aktif selanjutnya masuk ke dalam nukleus kondrosit dan memulai transkripsi dari iNOS (Bingham, 2002).

Inducible Nitric Oxide Synthase yang dibantu oleh ko-faktor tetrahidrobiopterin akan bereaksi dengan asam amino L-arginin menjadi NO dan L-citrulline. Adanya peningkatan nilai iNOS bertanggung jawab terhadap pembentukan dari NO, sebuah senyawa radikal bebas anorganik, yang akan banyak terekspresi pada kartilago yang mengalami OA. *Nitric Oxide* dapat meningkatkan respon inflamasi kondrosit dan destruksi kartilago articular dengan cara meningkatkan produksi sitokin, menekan sintesis matriks ekstraseluler, meningkatkan produksi MMPs dan menekan produksi *Tissue Inhibitor Metalloproteinase* (TIMPs) sehingga menyebabkan kerusakan kartilago articular lebih lanjut. Produksi MMPs yang berlebihan dapat memediasi degradasi kolagen tipe II (Sondergaard et al., 2007). Pada OA, IL-1 diproduksi berlebihan sehingga menyebabkan penurunan sintesis kolagen tipe II dan IX dan meningkatkan sintesis kolagen tipe I dan III, sehingga menghasilkan matriks rawan sendi yang berkualitas buruk dan terjadi penipisan kartilago tulang rawan (Creamer, 1997; Setiyohadi, 2003).

Ketebalan kartilago articular kelompok P3 dan P4 pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model OA hasil induksi enzim papain secara intraartikular menunjukkan adanya persentase peningkatan secara signifikan

dibandingkan dengan kelompok P2. Adanya perbandingan antara kelompok P3 dan P4 dengan kelompok P2 digunakan untuk mengetahui kelompok perlakuan yang memberikan hasil terbaik sebagai efek antiinflamasi dan efek menstimulasi kondrogenesis dari ekstrak cangkang siput air yang mampu meningkatkan persentase jumlah kondrosit yang akan memproduksi kolagen tipe II dan proteoglikan sehingga dapat meningkatkan nilai ketebalan kartilago articular pada sendi lutut tikus.

Peningkatan nilai rata-rata persentase ketebalan kartilago articular secara berturut-turut pada kelompok P3 dan P4 menunjukkan bahwa semakin besar dosis terapi ekstrak cangkang siput air yang diberikan, maka semakin tinggi persentase ketebalan kartilago articular. Hasil perbandingan kedua kelompok perlakuan tersebut terhadap P2 menunjukkan bahwa kelompok P4 memiliki persentase kenaikan ketebalan kartilago yang paling tinggi.

Adanya kenaikan nilai ketebalan kartilago articular pada kelompok terapi disebabkan karena adanya pengaruh kandungan dari ekstrak cangkang siput air. Ekstrak cangkang siput air mengandung beberapa senyawa yang memiliki efek antiinflamasi, efek menstimulasi kondrogenesis salah satunya adalah senyawa glukosamin. Glukosamin merupakan prekursor utama untuk biosintesis berbagai makromolekul seperti asam hialuronat, proteoglikan, glikosaminoglikan (GAGs), glikolipid, dan glikoprotein. Glukosamin dapat ditemukan dalam kitin yang merupakan bahan organik utama yang terdapat

pada cangkang, diantaranya adalah cangkang kepiting, cangkang bekicot dan kulit udang (Kusumaningsih dkk., 2004; Thakral dkk., 2007).

Glukosamin diperoleh dari cangkang siput air melalui proses demineralisasi, deproteinase dan deasetilase (Sibi dkk., 2013). Glukosamin dapat berfungsi sebagai anti inflamasi melalui penghambatan sitokin IL-1 serta melalui jalur penghambatan NFkB. Mekanisme glukosamin dalam penghambatan sitokin IL-1 yaitu dengan cara meningkatkan produksi antagonis reseptor IL-1 yaitu IL-1RII sehingga akan dapat mencegah terbentuknya ikatan dari IL-1 dengan reseptor yang terdapat pada sel target. Efek anti inflamasi yang lain dari glukosamin yaitu pada percobaan secara in vitro menunjukkan adanya aktivitas penghambatan aktivasi jalur NFkB, dengan adanya penghambatan NFkB maka sintesis iNOs akan berkurang sehingga NO juga akan berkurang produksinya (Largo, 2003; Meininger, 2000).

Glukosamin memiliki aktivitas kondroprotektif untuk meningkatkan kondrogenesis dari sel mesenkimal, glukosamin menghasilkan kondrosit yang mengekspresikan proteoglikan agregkan dan kolagen tipe II, memblok IL-1 dan MMP (Derfour *et al*, 2007). Faktor pertumbuhan memiliki peran penting dalam proses perbaikan tulang rawan, hal ini karena mempengaruhi kemosistesis, diferensiasi sel, proliferasi sel dan aktifitas sintesis tulang rawan. Dalam perbaikan tulang rawan, dibutuhkan faktor pertumbuhan termasuk

TGF- β 1, BMP-2 dan BMP-7 yang berfungsi merangsang aktifitas kondrosit untuk menghasilkan ekstraselular matriks (Lisa *et al* , 2007).

Berdasarkan hasil analisis statistika, perlakuan terapi ekstrak cangkang siput air pada kartilago artikular sendi lutut tikus model OA hasil induksi enzim papain secara intraartikular dosis 3 g/kg BB sudah dapat memberikan efek yang signifikan terhadap peningkatan ketebalan kartilago artikular meskipun masih berbeda signifikan dengan persentase ketebalan kartilago artikular pada kelompok kontrol negatif (**Tabel 5.1**). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dengan terapi ekstrak cangkang siput air dosis 3 g/kg BB sudah mampu meningkatkan nilai rata-rata ketebalan kartilago artikular tikus model OA.

5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Cangkang Siput Air (*Pila ampullacea*) Pada Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Model Osteoarthritis Terhadap Jumlah Kondrosit Kartilago Artikular

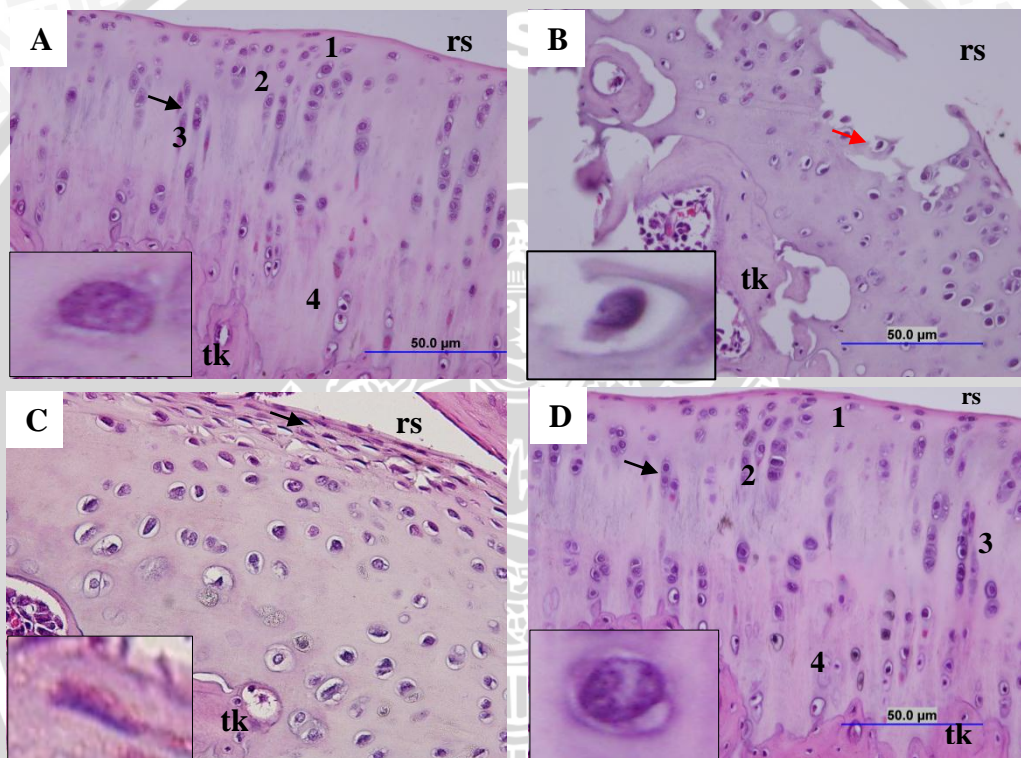
Hasil penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak cangkang siput air terhadap jumlah kondrosit kartilago artikular sendi lutut pada empat kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok terapi dosis 1 g/kg BB dan kelompok terapi dosis 3 g/kg BB memperlihatkan adanya perbedaan pada kondrosit kartilago (**Gambar 5.3**). Penghitungan jumlah kondrosit kartilago artikular yang sehat diamati menggunakan *software* Optilab® perbesaran 400x dan *ImageRaster* 3 dengan 5 lapang pandang.

Kondrosit kartilago pada masing-masing kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan yang ditandai dengan perbedaan jumlah kondrosit yang sehat. Pada kelompok kontrol negatif (P1) menunjukkan bentuk normal kartilago yang berisi kondrosit serta terlihat adanya keteraturan susunan lapisan pada kartilago artikular. Kondrosit berbentuk bulat atau polygonal, kecuali pada bagian yang permukaan artikular sendi, kondrosit berbentuk agak rata (diskoid). Bagian intraselulernya banyak terdapat retikulum endoplasma kasar, apparatus golgi juxt nuklear dan deposisi glikogen, yang menunjukkan karakteristik dari sel aktif (**Gambar 5.3.A**). Sedangkan pada kelompok kontrol positif terjadi penurunan jumlah kondrosit kartilago (**Gambar 5.3.B**). Kondrosit kartilago pada setiap kelompok terapi ekstrak cangkang siput air menunjukkan adanya peningkatan kondrosit yang sehat. Kelompok yang menunjukkan peningkatan paling signifikan adalah kelompok terapi ekstrak cangkang siput air dosis 3 g/kg BB.

Setelah rata-rata jumlah kondrosit kartilago artikular setiap kelompok didapatkan selanjutnya dilakukan uji statistika diantaranya adalah uji normalitas, uji homogenitas, uji *One Way* ANOVA serta uji Beda Nyata Jujur (BNJ).

Hasil uji normalitas dan homogenitas nilai jumlah kondrosit kartilago artikular pada semua kelompok perlakuan menunjukkan bahwa semua data tersebut berdistribusi normal dan data berasal dari kelompok-kelompok yang

homogen (Lampiran 16), sehingga dapat dilanjutkan dengan uji *One Way* ANOVA. Uji *One Way* ANOVA menunjukkan bahwa perlakuan terapi ekstrak cangkang siput air pada tikus model OA hasil induksi enzim papain secara intraartikular memberikan pengaruh yang berbeda signifikan ($p < 0.05$) terhadap jumlah kondrosit kartilago artikular.



Gambar 5.3 Penghitungan jumlah kondrosit kartilago artikular sendi lutut tikus dengan pewarnaan *hematoksilin eosin* (Perbesaran 400x)

Keterangan: (A) Tikus kontrol negatif. (B) Tikus kontrol positif. (C) Tikus OA + terapi dosis 1 g/kg BB (D) Tikus OA + terapi dosis 3 g/kg BB.

➤ = Kondrosit sehat

➤ = Kondrosit hipertropi

tk = Tulang keras

1 = Lapisan superfisial kartilago

2 = Lapisan intermediet kartilago

3 = Lapisan radial kartilago

4 = Lapisan kalsifikasi kartilago + tulang subkondral

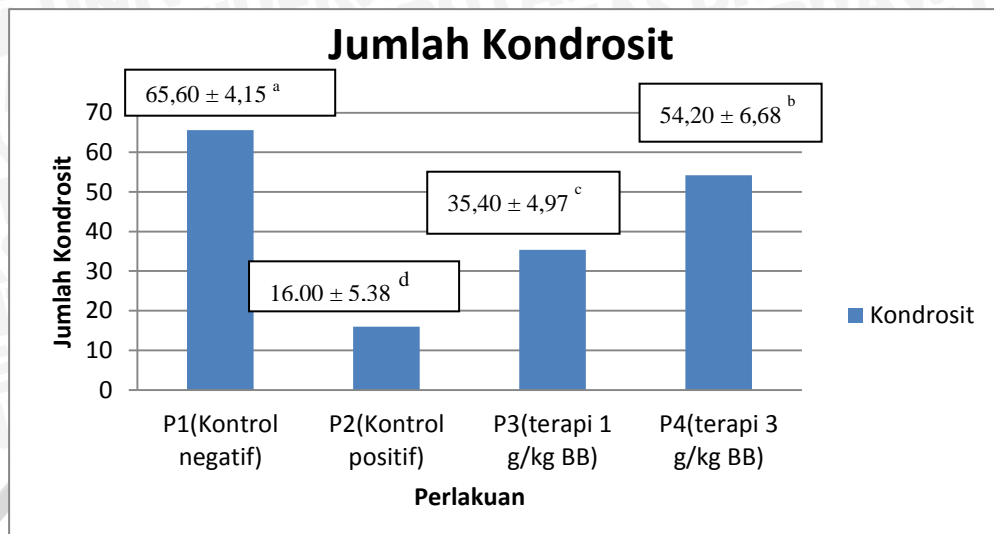
Uji Beda Nyata Jujur (BNJ)/*Tukey's procedure* dengan tingkat kesalahan $\alpha=5\%$ menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan yang diberikan. Hasil jumlah kondrosit kartilago artikular pada tikus kontrol negatif, kontrol positif, terapi dosis 1 g/kg BB dan terapi dosis 3 g/kg BB disajikan dalam (**Tabel 5.2**).

Tabel 5.2 Rata-rata jumlah kondrosit kartilago artikular sendi lutut tikus (*Rattus norvegicus*) model OA dan terapi ekstrak cangkang siput air (*Pilla ampullacea*)

Kelompok	Jumlah Kondrosit Rata-rata \pm SD	Jumlah Kondrosit (%)	
		Peningkatan terhadap Kontrol Positif	Penurunan terhadap Kontrol Negatif
P1 (Kontrol negatif)	65,60 \pm 4,15 ^a	-	-
P2 (Kontrol positif)	16,00 \pm 5,38 ^d	-	75,60%
P3 (Terapi 1 g/kgBB)	35,40 \pm 4,97 ^c	121,25%	-
P4 (Terapi 3 g/kgBB)	54,20 \pm 6,68 ^b	238,75%	-

Keterangan: Perbedaan notasi (a, b, c, d) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan.

Perbandingan rata-rata ketebalan kartilago artikular sendi lutut tikus (*Rattus norvegicus*) model OA dan terapi ekstrak cangkang siput air (*Pilla ampullacea*) yang telah dianalisis disajikan pada (**Gambar 5.4**) berikut ini :



Gambar 5.4 : Perbandingan nilai rata-rata dan hasil Tukey jumlah kondrosit. Keterangan : notasi a, b, c, d menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$)

Nilai rata-rata persentase jumlah kondrosit kartilago pada kelompok P1 memiliki nilai tertinggi yaitu sebesar $65,60 \pm 4,15$ dibandingkan dengan nilai rata-rata persentase jumlah kondrosit kartilago pada kelompok perlakuan lainnya, sehingga kelompok P1 dijadikan sebagai acuan untuk mengetahui adanya penurunan yang terjadi pada kelompok P2. Pada kelompok P1 menunjukkan bentuk normal kartilago yang berisi kondrosit serta terlihat adanya keteraturan susunan lapisan pada kartilago artikular, sedangkan kelompok P2 menunjukkan penurunan nilai rata-rata jumlah kondrosit kartilago yang sangat menurun yaitu sebesar 75,60% terhadap kelompok P1.

Kelompok P3 dan P4 masing-masing dibandingkan dengan kelompok P2 untuk mengetahui kelompok perlakuan yang terbaik untuk meningkatkan nilai rata-rata jumlah kondrosit kartilago artikular sendi lutut tikus model

OA. Kelompok P3 dan P4 masing-masing memiliki nilai rata-rata persentase jumlah kondrosit sebesar $35,40 \pm 4,97$ dan $54,20 \pm 6,68$ atau mengalami peningkatan sebesar 121,25% dan 238,75% dibandingkan dengan kelompok P2. Kelompok yang memiliki peningkatan paling signifikan apabila dibandingkan dengan kelompok P2 adalah kelompok P4. Peningkatan yang signifikan ($p < 0,05$) ditandai dengan perbedaan notasi huruf antara kelompok P2 dengan kelompok perlakuan terapi ekstrak cangkang siput air berdasarkan analisis statistika.

Kondrosit menyusun 1 - 2 % dari total volume kartilago artikular. Kondrosit adalah sel yang terdapat di jaringan avaskular, mensintesis seluruh elemen yang terdapat pada matriks kartilago. Kondrosit menghasilkan enzim pemecah matriks, sitokin {Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumor Necrosis Factor (TNF)} dan faktor pertumbuhan. Umpan balik yang diberikan enzim tersebut akan merangsang kondrosit untuk melakukan sintesis dan membentuk molekul-molekul matriks yang baru. Pembentukan dan pemecahan ini dijaga keseimbangannya oleh sitokin faktor pertumbuhan dan faktor lingkungan (Felson, 2008).

Kondrosit kartilago artikular sendi lutut tikus kontrol negatif (P1) menunjukkan bentuk normal kartilago yang berisi kondrosit serta terlihat adanya keteraturan susunan lapisan pada kartilago artikular yaitu superfisial, intermediet serta radial secara urut. Kondrosit bagian superfisial berbentuk pipih (diskoid), kondrosit pada zona intermediet-radial berbentuk bulat atau

polygonal. Kondrosit yang sehat pada bagian intraselulernya banyak terdapat retikulum endoplasma kasar, apparatus golgi juxt nuklear dan deposisi glikogen, yang menunjukkan karakteristik dari sel aktif (Goldbring, 2000). Adanya batasan keteraturan dari susunan lapisan tersebut menunjukkan tingkat kenormalan dari suatu kartilago. Selain itu, ciri-ciri dari kartilago artikular yang tidak mengalami OA adalah memiliki lapisan superfisial yang rata, serta tidak ada perubahan bentuk dan ukuran pada kondrosit (Pritzker *et al.*, 2006).

Kondrosit kartilago artikular pada kelompok P2 mengalami penurunan sebesar 75,60% dan menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok P1. Hal tersebut menandakan bahwa pada kondisi hewan coba OA hasil induksi enzim papain mampu menurunkan jumlah kondrosit kartilago artikular karena kondrosit banyak yang mengalami kerusakan. Adanya penurunan jumlah kondrosit pada kelompok kontrol positif disebabkan karena adanya pemberian enzim papain yang mampu mendegradasi proteoglikan dan kolagen oleh enzim (katabolisme) lebih besar daripada proses sintesa (anabolisme) maka akan kehilangan proteoglikan dan kolagen yang lebih besar. Kondrosit ini mengakibatkan perubahan sifat mekanik tulang rawan sendi dan kemampuan penahan beban, sehingga tulang rawan sendi tidak mampu untuk melindungi kondrosit. Kondrosit banyak yang mengalami kerusakan (Sudjiati, 2000).

Proses ketidakseimbangan antara proses sintesis dan katabolisme

matriks rawan sendi merupakan faktor utama yang berperan dalam proses patologis OA. Kondisi tersebut mengarah ke stres (beban) mekanik dan osmotik pada kondrosit yang merubah ekspresi gen, meningkatkan pelepasan sitokin-sitokin peradangan dan enzim-enzim pemecah matriks, khususnya MMPs (Felson, 2011; Henrotin, 2014; Krasnokutsky, 2008).

Kerusakan kondrosit yang terjadi pada tikus kelompok P2, selain dikarenakan pengaruh enzim yang dapat mendegradasi matriks ekstraseluler kartilago, juga dikarenakan pengaruh dari sitokin pro-inflamasi yang dihasilkan oleh makrofag pada cairan sinovial di ruang sendi lutut hewan coba. Sitokin pro inflamasi seperti IL-1 dan TNF- α yang dihasilkan oleh makrofag dapat menginisiasi peningkatan *Inducible Nitric Oxide* (iNOS) (Handono *et al*, 2014). Kondrosit pada kondisi OA mengekspresikan iNOS di zona superfisial kartilago, kadar iNOS yang tinggi mampu mengubah L-arginin menjadi NO dan L-sitrulin. *Nitric oxide* (NO) yang berlebihan dapat menghambat sintesis proteoglikan dan kolagen dimana penghambatan tersebut berkontribusi dalam kerusakan matriks ekstraseluler, serta NO juga dapat meningkatkan regulasi MMP (Abramson, 2008). Selain itu juga NO dapat bereaksi dengan spesies oksigen reaktif (ROS) membentuk *peroxynitrit*, yang dapat memicu terjadinya kerusakan kondrosit (Bingham, 2002).

Kondrosit OA mengalami perubahan fenotip menjadi kondrosit hipertropi. Beberapa faktor yang berperan dalam perkembangan penyakit

OA, termasuk diantaranya adalah faktor biokimia, genetik dan stress mekanik. Faktor katabolik seperti IL-1 β dan TNF- α akan meningkatkan MMPs, mensupresi sintesis kolagen tipe II, proteoglikan dan menghambat TGF- β yang berfungsi untuk menstimulasi proliferasi kondrosit (Handono, *et al.*, 2014; Alejandro, 2011). Beberapa marker yang menandai terjadinya kondrosit hipertropi dihasilkan, seperti kolagen tipe X, MMP-13, Runx2, (Goldbring, 2000). Secara morfologi, kondrosit yang mengalami hipertropi memiliki karakteristik yaitu volume sel meningkat drastis, kromatin inti tersebar, sejumlah partikel glikogen terlihat ada pada sitoplasma. Pada sitoplasma retikulum endoplasma kasar menjadi sangat banyak, apparatus golgi dan lisosom bentuknya menjadi sangat besar (Peter, *et al.*, 2005).

Jumlah kondrosit kartilago artikular kelompok P3 dan P4 pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model OA hasil induksi enzim papain secara intraartikular menunjukkan adanya persentase peningkatan secara signifikan dibandingkan dengan kelompok P2. Adanya perbandingan antara kelompok P3 dan P4 dengan kelompok P2 digunakan untuk mengetahui kelompok perlakuan yang memberikan hasil terbaik sebagai efek menstimulasi kondrogenesis dari ekstrak cangkang siput air sehingga mampu meningkatkan persentase jumlah kondrosit kartilago artikular pada sendi lutut tikus.

Peningkatan jumlah kondrosit yang berbeda antara P3 dan P4 dikarenakan adanya perbedaan pemberian ekstrak cangkang siput air yaitu 1

g/kg BB pada P3 dan 3 g/kg BB pada P4. Jumlah kondrosit P3 mengalami peningkatan dibandingkan dengan P2, namun terlihat masih banyak terdapat kondrosit hipertopi dan susunan kondrosit belum sesuai dengan zona yang sempurna, dikarenakan matriks ekstraseluler belum sepenuhnya disintesis oleh kondrosit, hal ini sesuai menurut Sutjiati (2000) matriks ekstraseluler akan mempengaruhi bentuk dan fungsi kondrosit, serabut kolagen yang merupakan komponen matriks ekstraseluler berfungsi membentuk suatu kerangka kartilago artikular dan menghasilkan kekuatan terhadap tekanan sehingga tulang rawan tidak mudah robek atau rusak. Jumlah kondrosit P4 mengalami peningkatan dibandingkan dengan P2, dan P4 merupakan kelompok terapi yang lebih meningkatkan jumlah kondrosit dibandingkan dengan P3. Susunan kondrosit P4 pun telah sesuai dengan zona yang sempurna. Zona superfisial kartilago artikular terdiri dari kondrosit pipih yang tersusun parallel mengikuti bentuk permukaan artikular. Pada zona intermediet kondrosit berbentuk bulat. Zona radial terdiri dari kondrosit yang tersusun sejajar dengan serat kolagen yaitu ke arah vertikal (Poole A.R. *et al.*, 2001).

Peningkatan nilai rata-rata persentase jumlah kondrosit kartilago artikular secara berturut-turut pada kelompok P3 dan P4 menunjukkan bahwa semakin besar dosis terapi ekstrak cangkang siput air yang diberikan, maka semakin tinggi persentase jumlah kondrosit kartilago. Hasil perbandingan kedua kelompok perlakuan tersebut terhadap P2 menunjukkan bahwa

kelompok P4 memiliki persentase kenaikan jumlah kondrosit kartilago yang paling tinggi.

Adanya kenaikan jumlah kondrosit kartilago artikular pada kelompok terapi disebabkan karena adanya pengaruh kandungan dari ekstrak cangkang siput air. Pemberian terapi ekstrak cangkang siput air yang mengandung glukosamin, memberikan efek yaitu menstimulasi kondrogenesis melalui peningkatan diferensiasi dari sel multipoten stem sel mesenkimal yang terdapat pada kartilago artikular (Derfoul dkk., 2007). Kondrogenesis merupakan proses yang paling penting untuk pembentukan kondrosit, baik itu selama embriogenesis maupun pada saat perbaikan jaringan yang mengalami kerusakan (Michael dkk., 2008).

Mesenchymal stem cell (MSCs) merupakan turunan dari *bone marrow stem cell* (BMSC) yang mampu berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel meliputi: sel mesenkim seperti kondrosit, osteosit, dan adiposit (da Silva *et al.*, 2006). Secara morfologis, MSCs memiliki karakteristik sebagai badan sel yang kecil berbentuk seperti benang, panjang dan tipis. Sementara nukleus berbentuk bulat dan nukelolus prominen. Struktur tersebut dikelilingi dengan partikel kromatin (Chen, 2008). Sehingga sel dapat dikatakan sebagai MSCs apabila memiliki karakteristik menyerupai plastik, elastis dan berbentuk seperti fibroblas (Hematti, 2012).

Sel progenitor yang ada pada lapisan superfisial kartilago artikular akan bermitosis dan kemudian bermigrasi ke tempat terjadinya kerusakan.

Kondrosit dengan sel progenitor berproliferasi sangat cepat kemudian menyebar pada permukaan kartilago yang mengalami kerusakan (Moti dan Hatem, 2015; Mary, 2012).

Mekanisme kondrogenesis dari sel progenitor yaitu dengan cara mitosis. Hasil dari mitosis ini kemudian akan menyebar pada seluruh kartilago untuk selanjutnya membentuk susunan atau formasi kondrosit di dalam kartilago. Mekanisme kondrogenesis dipengaruhi oleh faktor anabolik seperti faktor pertumbuhan, faktor transkripsi dan faktor hormonal. Diferensiasi MSCs menjadi sel kondrogenik juga dipengaruhi sinyal transkripsi yang kompleks. Faktor transkripsi yang diketahui berperan penting pada kondrogenik pada MSCs adalah Sox9 (de Crombrughe *et al.*, 2000). Sox9 dapat bekerja secara kooperatif dengan faktor lain (Sox5 dan Sox6) dalam menginduksi ekspresi protein kartilago matriks ekstraseluler, yaitu kolagen tipe II, IX dan XI (Frith J, 2008).

Faktor pertumbuhan TGF- β akan membantu dalam proliferasi kondrosit, sintesis matriks, memodulasi efek dari IL-1 dan meningkatkan inhibitor proteinase. Kondisi OA yang diberikan glukosamin dapat membantu aktivasi TGF- β sehingga menghasilkan *Tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMP) yang umumnya berfungsi menghambat IL-1 dan MMP, sehingga faktor katabolik dan anabolik kembali seimbang. Faktor hormonal seperti PTHrP (*parathyroid hormone related peptide*) berfungsi memelihara fenotip kondrosit pada zona prehipertrofik dan mencegah transisi

menjadi kondrosit hipertrofi (Widiastana, 2011; Shen, 2014). Proses ini terjadi pada selang waktu beberapa hari setelah terjadinya kerusakan jaringan. Respon anabolik dari kondrosit yang telah diproduksi ini berlangsung kurang lebih selama dua minggu setelah terjadinya kerusakan jaringan, yang selanjutnya laju metabolisme pada kondrosit akan kembali normal (Moti dan Hatem, 2015; Sally dan Paul, 1999).

Berdasarkan hasil analisis statistika, perlakuan terapi ekstrak cangkang siput air (*Pila ampullacea*) pada kartilago artikular sendi lutut tikus model OA hasil induksi enzim papain secara intraartikular dosis 3 g/kg BB sudah dapat memberikan efek yang signifikan terhadap peningkatan jumlah kondrosit kartilago artikular meskipun masih berbeda signifikan dengan persentase jumlah kondrosit kartilago artikular pada kelompok kontrol negatif (**Tabel 5.2**). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dengan terapi ekstrak cangkang siput air dosis 3 g/kg BB sudah mampu meningkatkan nilai rata-rata jumlah kondrosit kartilago artikular tikus model OA.