

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Pengaruh Pemberian Tepung Cangkang Udang *Vannamei* (*Litopenaeus vannamei*) terhadap Ketebalan Trabekula Caput Tulang Femur Tikus Model Ovariectomi

Pengamatan gambaran histopatologi caput tulang femur tikus (*Rattus norvegicus*) pada setiap kelompok dilakukan dengan pengamatan langsung dibawah mikroskop binokuler *Olympus BX51* dan dijelaskan secara deskriptif. Adapun yang diamati pada gambaran histopatologi caput tulang femur tikus (*Rattus norvegicus*) menggunakan perbesaran 100x yaitu ketebalan trabekula caput tulang femur yang dihitung menggunakan aplikasi *doT slide* dan melihat ada tidaknya bagian trabekula yang terputus. Selain itu, pengamatan juga dilakukan terhadap ada tidaknya perluasan *bone marrow* caput tulang femur. Menurut Sabri (2011), trabekula merupakan bagian dalam tulang kompakta yang tersusun dari lempeng – lempeng yang saling berhubungan. Trabekula terdiri atas lamel – lamel yang didalamnya terdapat lakuna yang mengandung osteosit dan sistem kanalikuli (penonjolan sitoplasma osteosit) yang saling berhubungan. Gambaran histopatologi caput tulang femur tikus (*Rattus norvegicus*) dapat dilihat pada kelompok kontrol negatif (K-), kelompok kontrol positif (K+), kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), dan kelompok perlakuan 3 (P3).



Tabel 5.1 Hasil perhitungan rata – rata ketebalan trabekula menggunakan 5 lapang pandang

Perlakuan	Rata – rata ketebalan trabekula	Kenaikan ketebalan trabekula terhadap K+ (%)
Kontrol -	105,14 ± 23,112 ^a	
Kontrol +	62,66 ± 9,127 ^b	
Perlakuan 1	72,19 ± 6,780 ^{ab}	15
Perlakuan 2	101,20 ± 9,854 ^a	62
Perlakuan 3	65,74 ± 10,672 ^b	5

Keterangan : Penggunaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok.



Gambar 5.1. Histologi caput tulang femur tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok K (-) Perbesaran 100X. Spikulum trabekula terlihat tebal, kompak, dan tidak terputus, rongga sumsum tulang berukuran normal didominasi sel hematopoietik , zona osteogenik berbentuk normal yang terdiri dari kondrosit dan fibrosit.

Pada caput tulang femur tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok K (-) menunjukkan keadaan normal histologi caput tulang femur yang ditandai

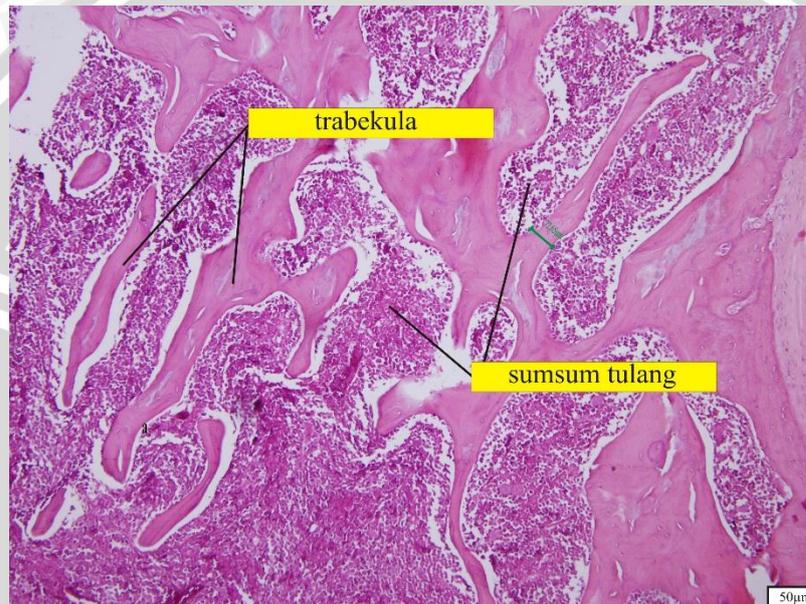
dengan adanya zona osteogenik yang berbentuk normal terdiri dari kondrosit yang berbentuk tunggal atau berpasangan yang dibungkus oleh lakuna dan fibrosit yang berbentuk pipih. Trabekula memiliki ketebalan 105,14 μm , kompak dan tidak terputus. Pada trabekula terdapat osteosit yang dibungkus lakuna. Rongga sumsum tulang normal didominasi sel hematopoietik. Pada tepi trabekula terdapat osteoblas berbentuk kuboid yang tersusun berderet di tepi trabekula (**Gambar 5.1**).



Gambar 5.2. Histopatologi caput tulang femur tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok K (+) Perbesaran 100X. Trabekula terlihat tipis, kecil dan terputus – putus , rongga sumsum tulang lebar.

Pada gambar histopatologi caput tulang femur tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok kontrol positif (K+) yang merupakan kelompok tikus model ovariectomi tanpa pemberian tepung cangkang udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) terlihat trabekula mengalami penipisan dengan ketebalan 62,66 μm dan terputus. Didalam trabekula terlihat osteosit yang

dibungkus oleh lakuna. Trabekula yang tipis pada kelompok (K+) menyebabkan sumsum tulang terlihat lebih luas dibandingkan dengan kelompok (K-). Osteoblas berbentuk kuboid dan tersusun berderet ditepi trabekula (**Gambar 5.2**).



Gambar 5.3. Histopatologi caput tulang femur tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok Perlakuan 1 (P1) perbesaran 100X. Beberapa bagian trabekula terlihat tipis, kecil dan sedikit terputus serta rongga sumsum tulang luas.

Pada gambar histopatologi caput tulang femur tikus (*Rattus norvegicus*) model ovariektomi (P1) dengan pemberian tepung cangkang udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) dosis 500 mg/kgBB, terlihat bagian trabekula berukuran 72,19 µm lebih tipis dibandingkan kelompok (K-) tetapi lebih tebal dibandingkan kelompok (K+). Sebagian trabekula ada yang kecil dan terputus, sehingga rongga sumsum tulang nampak lebih luas dibandingkan K (-), namun lebih sempit dibandingkan K(+). Pada trabekula

terdapat osteosit yang dibungkus oleh lakuna, selain itu juga terdapat osteoblas berbentuk kuboid pada tepi trabekula (**Gambar 5.3**).



Gambar 5.4. Histopatologi caput tulang femur tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok Perlakuan 2 (P2) perbesaran 100X. Trabekula terlihat tebal, kompak dan ada sedikit bagian yang terputus serta rongga sumsum tulang yang normal berisi sel hematopoietik.

Pada gambar histopatologi caput tulang femur tikus (*Rattus norvegicus*) model ovariectomi (P2) dengan pemberian tepung cangkang udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) dosis 1000 mg/kgBB, terlihat bagian trabekula tebal sebesar 101,20 µm, kompak dan sedikit bagian terputus. Trabekula pada kelompok P4 lebih tebal dibandingkan kelompok kontrol positif (K+), dan hampir sama dengan ketebalan pada kelompok kontrol negatif (K-). Hal ini membuat rongga sumsum tulang normal berisi sel hematopoietik. Pada trabekula terdapat osteosit yang dibungkus oleh

lakuna, selain itu juga terdapat osteoblas berbentuk kuboid pada tepi trabekula (**Gambar 5.4**).



Gambar 5.5. Histopatologi caput tulang femur tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok Perlakuan 3 (P3) perbesaran 100X. Trabekula terlihat tipis dan ada sedikit bagian yang terputus, rongga sumsum tulang luas berisi sel hematopoietik, zona osteogenik lebih tipis dibandingkan K(-).

Gambaran histopatologi caput tulang femur tikus (*Rattus norvegicus*) model ovariektomi (P3) dengan pemberian tepung cangkang udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) dosis 1500 mg/kgBB, terlihat trabekula tipis berukuran 65,74 μm dan ada sedikit bagian yang terputus. Trabekula pada kelompok P3 lebih tipis dari kelompok kontrol negatif. Hal ini menyebabkan rongga sumsum tulang lebih luas dari kelompok (K-) dan berisi sel hematopoietik. Zona osteogenik lebih tipis dibandingkan K(-) berisi kondrosit dan fibrosit. Pada trabekula terdapat osteosit yang dibungkus oleh lakuna,

selain itu juga terdapat osteoblas berbentuk kuboid pada tepi trabekula **(Gambar 5.5)**.

Kalsium merupakan mineral yang paling banyak terdapat di dalam tubuh, yaitu 1,5-2% dari berat badan orang dewasa. Di dalam tubuh manusia terdapat kurang lebih 1 kg kalsium (Granner, 2003). Dari jumlah ini, 99% berada di dalam jaringan keras, yaitu tulang dan gigi terutama dalam bentuk hidroksiapatit. Kalsium tulang berada dalam keadaan seimbang dengan kalsium plasma pada konsentrasi kurang lebih 2,25-2,60 mmol/l (9-10,4 mg/100ml). Dalam keadaan normal sebanyak 30-50% kalsium yang dikonsumsi diabsorpsi di tubuh. Kemampuan absorpsi lebih tinggi pada masa pertumbuhan, dan menurun pada proses menua. Proses absorpsi Ca di usus dibantu oleh 1,25 hidroksikalsiferol yang merupakan bentuk aktif dari vitamin D yang diaktifasi di tubulus proksimal ginjal dengan bantuan PTH. Ekskresi Ca melalui dua jalur yaitu feses dan urin. Ca intestinal akan diekresikan melalui feses, sedangkan Ca darah akan diekresikan melalui urin yang sebelumnya Ca sudah diresorpsi oleh tubulus ginjal (Van Abel *et al.*, 2002).

Kandungan kalsium cangkang udang vannamei berkisar 45 – 50 % (Andre, 2015), sehingga dapat dimanfaatkan untuk suplemen kalsium pada tikus model ovariektomi. Tikus ovariektomi mengalami penurunan kadar estrogen yang berfungsi membentuk protein pengikat kalsium di usus, sehingga absorpsi Ca oleh usus akan menurun yang menyebabkan konsentrasi Ca darah menurun. Konsentrasi kalsium darah yang menurun akan

menstimulasi tersekresinya hormon paratiroid oleh kelenjar paratiroid yang bekerja pada tulang dan ginjal. Pada ginjal hormon paratiroid akan menstimulasi tersekresinya 1,25- hidroksikalsiferol yang berfungsi menekan sekresi kalsium oleh urin dan meningkatkan absorpsi kalsium oleh usus (Hoenderop *et al.*, 2001).

Kelompok (K-) merupakan kelompok kontrol negatif yang menunjukkan gambaran normal histologi caput tulang femur yang terdiri dari zona osteogenik, trabekula, dan sumsum tulang. Menurut Jee (1983), zona osteogenik dibagi menjadi zona kondrosit istirahat, proliferasi dan hipertrofi yang meliputi maturasi, degenerasi, dan kalsifikasi. Dalam kondisi normal, zona kondrosit istirahat ditandai oleh kondrosit berbentuk sferis, tunggal atau berpasangan. Zona kondrosit proliferasi terlihat dengan sel berbentuk pipih dan setelah beberap kali mitosis berubah menjadi oval. Setelah masuk zona maturasi sel - sel tersebut akan membuat susunan sel yang berderet memanjang, tinggi sel menjadi 4-5 kali, volume sel membesar sampai 10 kali, inti sel piknotik, sitoplasma bervakuola, dan terjadi kalsifikasi matriks. Pada zona degenasi, sel - sel kondrosit mengalami degenerasi, lakuna matriks yang sudah mengalami kalsifikasi diinvasi oleh sel osteogenik yang selanjutnya berdiferensiasi menjadi osteoblas. Banks (1981) dan Jee (1983) melaporkan bahwa matriks diantara lakuna kondrosit yang sudah mengalami kalsifikasi, selanjutnya berperan dalam pembentukan tulang trabekula spongiosa primer dan bergerak masuk ke zona osteogenik dan sel osteoblastik bergabung

didalamnya. Trabekula – trabekula saling berhubungan dan membentuk rongga sumsum tulang yang berisi sel hematopoietik.

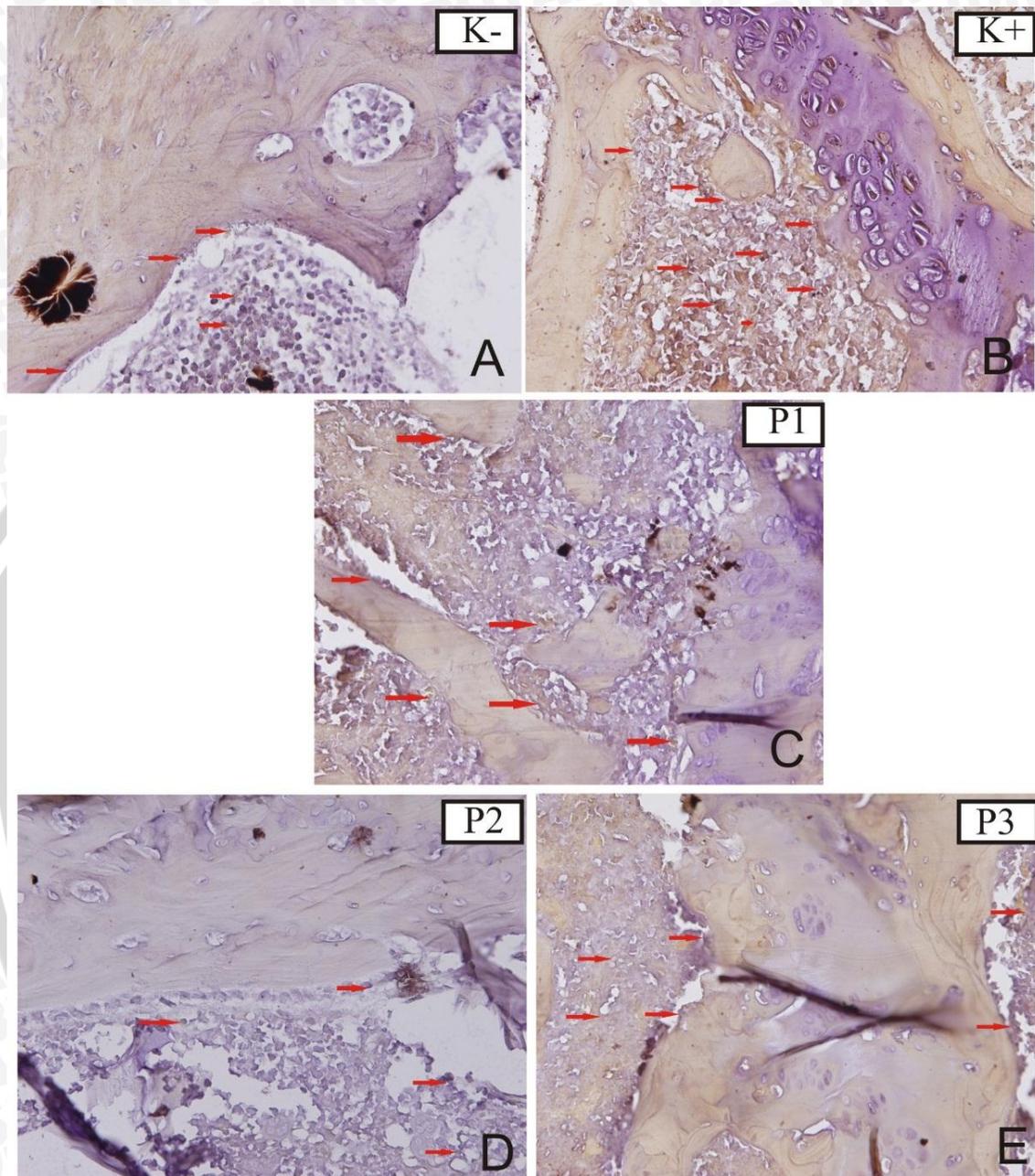
Kelompok (K+) merupakan yang menunjukkan gambaran histopatologi caput tulang femur tikus yang mengalami pengeroposan tulang ditandai dengan trabekula yang menipis dan sumsum tulang yang lebih luas dibandingkan kontrol negatif (**Gambar 5.2**). Kadar esterogen yang rendah pada tikus ovariektomi menyebabkan penurunan absorpsi Ca usus dan peningkatan ekskresi Ca melalui ginjal (Hoenderop *et al.*, 1999). Keadaan tersebut meningkatkan resorpsi Ca tulang dan menyebabkan hilangnya massa tulang pada tikus ovariektomi. Trabekula yang tipis, irreguler, terputus - putus sebagai dampak adanya resorpsi Ca tulang yang melebihi pembentukan tulang sehingga menyebabkan peningkatan luas area resorpsi dibagian trabekula dan konektivitas antar trabekula hilang (Parfitt *et al.*, 1983).

Kelompok P1, P2, dan P3 merupakan kelompok tikus model ovariektomi dengan dosis 500 mg/kg, 1000 mg/kg, dan 1500 mg/kg. Dosis P3 yang lebih tinggi daripada P2 tidak membuat struktur trabekula P3 lebih bagus dari P2. Kelompok P2 memiliki rata – rata ketebalan trabekula mendekati kelompok K- yaitu ditunjukkan dengan notasi yang sama, sedangkan kelompok P3 memiliki notasi yang sama dengan K+. Yacobus (1992) menerangkan bahwa terlalu banyak asupan suplemen kalsium dapat menyebabkan hiperkalsiuria, hiperkalsemia, dan meningkatkan resorpsi tulang. Kadar kalsium yang terlalu tinggi dapat memicu kerusakan pada ginjal karena akumulasi kalsium dapat menyebabkan timbulnya batu pada

ginjal. Terjadinya keruakan ginjal tersebut membuat vitamin D tidak dapat teraktifasi menjadi 1,25 hidroksikalsiferol di tubulus proksimal ginjal, sehingga penyerapan Ca di usus terganggu. Asupan Ca intestinal akan terekskresi melalui feses, sehingga kadar kalsium dalam darah kembali menurun menyebabkan resorpsi Ca tulang kembali terjadi untuk memenuhi kadar normal Ca darah. Berdasarkan gambaran histopatologi caput tulang femur, asupan kalsium memberikan efek optimal pada dosis 1000 mg/kgBB, sedangkan dengan dosis diatas 1500mg/kgBB dapat memicu terjadinya resorpsi Ca tulang. Hal ini mengindikasikan kemungkinan kelebihan asupan kalsium akan menjadi toksik.

5.2. Pengaruh Pemberian Tepung Cangkang Udang *Vannamei* (*Litopenaeus vannamei*) terhadap Ekspresi Sitokin IL - 1 β Tikus Model Ovariektomi

Perhitungan sitokin interleukin 1 β pada caput tulang femur tikus putih (*Rattus norvegicus*) pada setiap kelompok dilakukan dengan pengambilan gambar histopatologi pengecatan imunohistokimia dibawah mikroskop binokuler *Olympus* BX51. IL - 1 β akan terlihat berwarna coklat di sekitar osteoblas dan sumsum caput tulang femur (**Gambar 5.6**). Hasil pengambilan gambar dianalisa menggunakan aplikasi *immunoratio* untuk mengetahui ekspresi IL - 1 β dan kemudian dilakukan analisa kuantitatif menggunakan *OneWay* ANOVA (**Tabel 5.2**).



Gambar 5.6 Preparat caput tulang femur dengan pengecatan imunohistokimia untuk melihat ekspresi IL - 1 β yang diamati dengan mikroskop menggunakan perbesaran 400X.

Keterangan : Kontrol negatif (A), kontrol positif (B), perlakuan 1 (C), perlakuan 2 (D), perlakuan 3 (E). (➡) Ekspresi sitokin interleukin 1 β

Tabel 5.2 Hasil perhitungan rata – rata ekspresi IL-1 β dengan menggunakan 5 lapang pandang

Perlakuan	Rata – rata ekspresi IL-1 β \pm SD	Penurunan Ekspresi IL-1 β (%) terhadap K+
Kontrol -	10,050 \pm 2,837 ^a	
Kontrol +	29,920 \pm 0,524 ^c	
Perlakuan 1	26,200 \pm 1,094 ^b	12
Perlakuan 2	11,465 \pm 1,555 ^a	62
Perlakuan 3	27,720 \pm 1,099 ^{bc}	7

Keterangan : Penggunaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok.

Hasil analisa sitokin IL - 1 β diperoleh rata – rata ekspresi sitokin interleukin 1 β antar kelompok perlakuan yang nyata ($p < 0,05$). Pada kelompok K (-) rata – rata ekspresi interleukin 1 β yaitu sebesar 10,050 \pm 2,837, sedangkan pada kelompok K (+) yang merupakan tikus model ovariektomi tanpa pemberian tepung cangkang udang vannamei terjadi peningkatan rata – rata ekspresi interleukin 1 β menjadi 29,920 \pm 0,524. Pada P1 yaitu tikus model ovariektomi dengan pemberian tepung cangkang udang vannamei dosis 500 mg/kgBB terjadi penurunan rata – rata ekspresi sitokin interleukin 1 β sebanyak 12% dibandingkan kelompok K (+) menjadi 26,200 \pm 1,094. Pada P2 yaitu tikus model ovariektomi dengan pemberian tepung cangkang udang vannamei dosis 1000 mg/kgBB terjadi penurunan rata – rata ekspresi sitokin interleukin 1 β sebesar 62% dibandingkan dengan K (+) menjadi 11,465 \pm 1,555. Pada kelompok P3 yaitu tikus model ovariektomi

dengan pemberian tepung cangkang udang vannamei dosis 1500 mg/kgBB terjadi penurunan ekspresi sitokin interleukin 1β sebanyak 7% dibandingkan kelompok K (+) menjadi $27,720 \pm 1,099$.

Rata – rata ekspresi sitokin interleukin 1β pada kelompok K (+) atau kelompok tikus model ovariektomi tanpa pemberian tepung cangkang udang vannamei mengalami peningkatan dan perbedaan yang nyata dengan kelompok K(-). Pada pemeriksaan menggunakan *X – Ray* (**Lampiran 7**) menunjukkan bahwa densitas tulang pada kelompok K (+) lebih rendah dibandingkan dengan densitas tulang pada K (-) yang disebabkan karena pengeroposan tulang. Menurut Pfeilschifter (2002), pengeroposan tulang dapat dipengaruhi karena faktor sitokin. Sitokin berperan pada stadium awal proses hematopoiesis dan osteoklastogenesis melalui jalur yang memerlukan suatu mediator berupa sitokin dan faktor koloni stimulator. Interleukin 1 dikenal paling berpotensi menginduksi proses demineralisasi tulang dan sinergis dengan $TNF\alpha$ dalam meresorpsi tulang terutama pada bagian matriks tulang.

Menurut Stavors (2000) menyatakan bahwa peran sitokin interleukin 1β dalam resorpsi tulang adalah dengan menginduksi osteoblas untuk mengeluarkan RANK –L. RANK –L akan berikatan dengan reseptor RANK yang berada di permukaan makrofag (osteoklas inaktif) menjadi RANKL – RANK yang menyebabkan osteoklas inaktif berdiferensiasi menjadi osteoklas aktif. Sitokin interleukin 1β diekspresikan oleh neutrofil, PMN, MN, dan makrofag. Selain itu, osteoklas juga mengekspresikan interleukin 1β sehingga

memperbanyak induksi osteoblas untuk mengeluarkan RANK – L. Ekspresi interleukin 1β yang paling rendah terdapat pada kelompok K (-) dan kelompok P2. Kelompok K (-) merupakan kelompok kontrol negatif sehingga proses osteoklastogenesis dan osteoblastogenesis seimbang yang menyebabkan ekspresi IL 1β normal. Sedangkan pada kelompok P2 proses resorpsi Ca tulang dapat ditekan karena asupan kalsium darah sudah tercukupi dari intake kalsium intestinal, sehingga jumlah osteoklas dan osteoblas stabil yang menyebabkan ekspresi IL 1β normal. Pada kelompok P1 ekspresi interleukin 1β mengalami penurunan 12% dibandingkan kelompok K (+) yang disebabkan karena ada intake kalsium usus sehingga proses resorpsi Ca tulang untuk memenuhi Ca darah sedikit ditekan (**Tabel 5.2**).

Ekspresi IL 1β yang paling tinggi terdapat pada kelompok (K+) dan kelompok P3. Kelompok K(+) merupakan kelompok kontrol positif dimana tikus yang sudah diovariectomi tidak diberikan tepung cangkang udang vannamei. Sehingga terjadi resorpsi Ca tulang untuk memenuhi kadar normal Ca darah. Kadar Ca darah yang menurun menstimulasi kelenjar paratiroid mensekresikan hormon paratiroid. Menurut Stavros (2000) hormon paratiroid bekerja pada osteoblas untuk menginduksi RANK – L sehingga terjadi osteoklastogenesis yang meningkatkan jumlah osteoklas yang mengekspresikan IL 1β . Pada P3 tikus model ovariektomi diberikan tepung cangkang udang vannamei dengan dosis 1500 mg/kgBB memiliki ekspresi IL 1β lebih tinggi dibandingkan kelompok P2 dengan dosis tepung cangkang udang vannamei 1000 mg/kgBB. Yacobus (1992) menerangkan bahwa terlalu

banyak asupan suplemen kalsium dapat menyebabkan hiperkalsiuria, hiperkalsemia, dan meningkatkan resorpsi tulang. Kadar kalsium yang terlalu tinggi dapat memicu keruakan pada ginjal karena akumulasi kalsium dapat menyebabkan timbulnya batu pada ginjal. Terjadinya keruakan ginjal tersebut membuat vitamin D tidak dapat teraktifasi menjadi 1,25 hidroksikalsiferol di tubulus proksimal ginjal, sehingga penyerapan Ca di usus terganggu. Asupan Ca intestinal akan terekskresi melalui feses, sehingga kadar kalsium dalam darah kembali menurun menyebabkan resorpsi Ca tulang kembali terjadi untuk memenuhi kadar normal Ca darah. Resorpsi Ca tulang dilakukan oleh osteoklas yang mengekspresikan IL - 1β , sehingga ekspresi IL 1β pada kelompok P3 tinggi.

