

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Struktur Tulang

Tulang adalah substansi paling keras pada tubuh manusia yang terdiri dari banyak sel serta materi ekstraseluler yang keras. Tulang terdiri dari 20-40% komponen organik yaitu kolagen, 50-70% komponen anorganik yaitu mineral, 5-10% air dan <3% lipid. Mineral utama dari komposisi intraseluler adalah kalsium dan fosfat yang berfungsi untuk menyediakan rigiditas mekanik dan kekuatan *load-bearing* tulang, sementara matriks organik menyediakan elastisitas dan fleksibilitas tulang. Matriks ekstraseluler tulang terdiri atas 85-90% protein kolagen, terutama kolagen tipe I (Guyton dan Hall, 2006). Kolagen tipe I pada tulang adalah hubungan silang (*cross-link*) oleh senyawa spesifik kolagen. Pada manusia cross-link ini adalah turunan dari hydroxypyridinium: pyridinoline (PYD) dan deoxypyridinoline (DPD) (Fassbender, et al., 2009). Keseimbangan yang baik antara kedua komponen ini dibutuhkan agar tulang dapat menahan stres dan mencegah fraktur. Ketidakseimbangan kedua komponen tersebut dapat mengakibatkan kerusakan tulang dan mengakibatkan penurunan kekuatan tulang (Rogers, 2011)

Orang dewasa memiliki dua tipe tulang yaitu : tulang kortikal (*compact*) dan tulang trabekular (*spongy* atau *cancellous*). Jumlah komponen tulang kortikal adalah 80% dan tulang trabekular adalah 20%. Tulang kortikal adalah bagian yang tersusun rapat dan merupakan bagian yang kuat sehingga memenuhi sebagian besar struktur tulang dan berfungsi sebagai protektor tulang. Tulang trabekular adalah bagian yang

berbentuk seperti spon atau sarang lebah, merupakan bagian yang kurang kuat dan memiliki luas permukaan yang lebih besar sehingga memungkinkan untuk menjadi metabolik aktif. Hal ini menyebabkan tulang trabecular lebih cepat mengalami proses *remodelling* daripada tulang kortikal dan memiliki efek yang lebih cepat terpengaruh oleh kondisi yang terkait dengan peningkatan pergantian tulang dibandingkan dengan tulang kortikal. Oleh karena itu tulang trabekular rentan untuk mengalami kehilangan massa tulang (Walsh, 2014).

Ada empat jenis dari sel-sel tulang utama yaitu: osteoblas, *lining cells*, osteosit dan osteoklas. Osteoblas merupakan sel yang berasal dari sel induk *mesenchymal* atau yang disebut dengan *osteoblastic stromal cell* yang terletak di sum-sum tulang. Sel osteoblas berperan pada modulasi pembentukan tulang baru (formasi tulang). *Lining cells* merupakan sel osteoblas yang sedang istirahat atau tidak bekerja untuk sistem pembentukan tulang. Osteosit adalah osteoblas yang tertanam pada tulang selama proses pembentukan dan mineralisasi tulang. Sel osteoklas merupakan sel yang berperan pada proses resorpsi tulang (Geusens, et al., 2004).

2.1.1 Fisiologi Tulang

Sel-sel tulang mengalami *modelling* dan *remodelling* yang memungkinkan tulang untuk tumbuh dan beradaptasi sesuai kebutuhan. Proses *modelling* terjadi ketika resorpsi tulang dan pembentukan tulang terjadi pada permukaan yang terpisah (pembentukan dan resorpsi tidak digabungkan). Contoh dari proses ini adalah selama peningkatan panjang dan diameter tulang panjang. *Remodelling* adalah

proses penggantian jaringan lama dengan jaringan tulang baru, terutama terjadi pada kerangka dewasa untuk mempertahankan massa tulang (IOF,2017) Proses *remodelling* melibatkan pembentukan tulang dan resorpsi tulang yang saling berkaitan. *Remodelling* memungkinkan perubahan arsitektur tulang dalam menanggapi faktor-faktor seperti beban mekanis, tapi tanpa merubah ukuran kerangka keseluruhan. Dalam kerangka dewasa, 5-10% dari tulang diremodeling setiap tahun. Remodelling tidak terjadi merata di seluruh kerangka, 80% dari renovasi terjadi di tulang trabekular (David, 2011).

Fisiologi remodeling tulang diawali dengan sinyal dari sel lining atau osteosit yang dipicu oleh stres, *microfracture*, sistem *biofeedback*, dan penyakit tertentu yang berpotensi serta pengobatannya. Sinyal dari *liningcell* melepaskan berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan. *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF) dihasilkan oleh sel stroma untuk proliferasi, kelangsungan hidup, dan diferensiasi dari prekursor osteoklas. Pada tahap kedua prekursor osteoblas menghasilkan RANK-Ligand (*receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*) untuk berikatan dengan reseptor yang ada pada permukaan prekursor osteoklas yaitu RANK, setelah itu akan terbentuk sel osteoklas yang matang dan aktif untuk meresorpsi tulang. Tahap ketiga yaitu osteoklas yang berikatan dengan matriks tulang melalui reseptor integrin pada membran osteoklas yang menghubungkan dengan matriks peptida tulang (Tanaka, et al.,2013).

Setelah tulang telah selesai diresorpsi dan terbentuk rongga pada tulang, pada tahap keempat adalah dilepaskannya sitokin-sitokin dan faktor-faktor pertumbuhan yang merupakan osteoblas dewasa pertama dari *mesenchymal stem*

cells yang kemudian menstimulasi pembentukan sel osteoblas. Osteoblas dewasa memproduksi osteoprotegerin (OPG) yang mengikat RANK-L, sehingga ikatan antara RANK-L dan RANK pada osteoklas terganggu akibatnya osteoklas mengalami apoptosis sehingga resorpsi tulang berhenti. Pada tahap kelima, pembentukan tulang dibagi menjadi dua tahap yaitu, pertama osteoblas mengisi rongga yang telah diresorpsi dengan osteoid dan yang kedua terjadi proses mineralisasi. Tahap keenam adalah ketika pembentukan tulang selesai, osteoblas dewasa mengalami apoptosis atau berubah menjadi lapisan sel atau osteosit (Clarke, 2008).

2.2 Osteoporosis

2.2.1 Definisi Osteoporosis

Osteoporosis adalah gangguan metabolisme tulang dimana terjadi ketidakseimbangan kerja osteoblas (sel pembangun) dan osteoklas (sel pembongkar) sehingga kepadatan tulang menurun disertai rusaknya mikroarsitektur tulang yang menyebabkan tulang menjadi mudah mengalami fraktur (Infodatin, 2015). Menurut kriteria dari WHO, osteoporosis didefinisikan apabila Bone Mass Density [BMD] pada -2,5 standar deviasi atau dibawahnya [T-score < -2,5 SD]. Osteoporosis merupakan penyakit yang kurang cepat untuk disadari (*silent disease*) sehingga diagnosis dan penanganannya sering terlambat. Keterlambatan diagnosis dan penanganan dari osteoporosis menyebabkan komplikasi yang serius, yaitu fraktur dan perubahan postur tubuh pasien (kifosis) yang dapat menurunkan

kualitas hidup dan meningkatkan disabilitas pada pasien osteoporosis (Assunta et al., 2013).

2.2.2 Etiologi Osteoporosis

Mekanisme dasar terjadinya osteoporosis adalah pertumbuhan dan perkembangan massa tulang yang buruk dan pengeroposan tulang pada periode setelah puncak massa tulang tercapai. Kedua faktor ini dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan genetik. Sekitar dua pertiga resiko fraktur pada wanita pascamenopause ditentukan oleh puncak massa tulang pada saat pramenopause. Sekitar setengah dari massa tulang terakumulasi selama masa pubertas. Hal ini terkait dengan peningkatan kadar hormon seks dan hampir selesai dengan penutupan *end plate*. Hanya ada akumulasi mineral tulang minimal selama 5 sampai 15 tahun berikutnya (*skeletal consolidation*). Puncak massa tulang dicapai sekitar umur 30. Studi pada pasangan kembar ibu dan anak menunjukkan bahwa 40% sampai 80% variabilitas pada massa tulang ditentukan oleh faktor genetik. Gen yang terlibat dalam osteoporosis termasuk reseptor estrogen, *transformasi growth-β*, dan apolipoprotein E dan kolagen. Pengeroposan tulang terjadi sebaliknya, sebagian besar ditentukan oleh faktor lingkungan (gizi, kebiasaan, dan obat-obatan) (Skugor, 2010).

2.2.3 Peran Osteoblas dan Osteoklas Pada Osteoporosis

Osteoporosis terjadi ketika metabolisme tulang seseorang terganggu. Metabolisme tulang secara normal adalah adanya keseimbangan antara aktivitas osteoklas dalam mengabsorpsi tulang dan aktivitas osteoblas dalam mengisi rongga

tulang yang telah diabsorpsi oleh osteoklas. Seseorang beresiko menderita osteoporosis apabila aktivitas osteoklas lebih tinggi daripada osteoblas, sehingga osteoblas tidak mampu mencukupi atau mengisi rongga tulang yang telah diabsorpsi(Raisz,2005).

2.3 Nikotin

Nikotin merupakan suatu jenis senyawa kimia yang termasuk ke dalam golongan alkaloid dengan nama kimia *3-(1-metil-2-pirolidil) piridin*(Adietomo et al.,2013).Nikotin sangat mudah didapatkan karena banyaknya tanaman tembakau di Indonesia. Selain itu, nikotin juga terdapat dalam sayur-sayuran seperti kentang, kembang kol, terong dan tomat dengan kadar yang berbeda-beda (anonim,2012).

2.3.1 Nikotin Meningkatkan Aktivitas Osteoblas

Nikotin dapat meningkatkan aktivitas, proliferasi, dan pelepasan sitokin dari osteoblas. Stimulasi $\alpha 4$ nAChR pada osteoblas dapat meningkatkan proliferasi osteoblas (Daffner,2012). Aktivasi reseptor $\alpha 3$ dan $\alpha 5$ nACH akan meningkatkan *bone morphogenic protein-2*(protein yang memiliki peran penting dalam regulasi induksi tulang), dan pemeliharaan dan perbaikan selama penyembuhan fraktur pada model tikus (Rothem,2011).Administrasi nikotin juga meningkatkan deposisi kalsium dan alkaline fosfatase yang mendorong mineralisasi tulang (Daffner,2012).

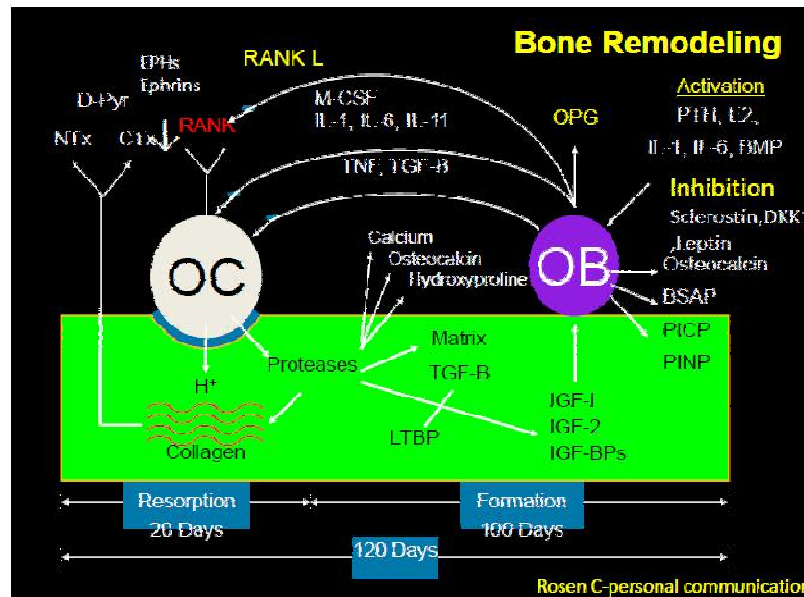
Administrasi nikotin juga meningkatkan *calcitonin gene related peptide* [CGRP](Dussor,et al.,2003). CGRP memiliki efek pleiotropik pada sel-sel tulang. CGRP menghambat maturasi sel osteoklas dan resorpsi tulang, dan anabolik untuk

sel osteoblas. Terdapat 2 jenis CFRP; CGRP- α and CGRP- β . CGRP- α dapat meningkatkan proliferasi dari osteoblas dan mencegah pengeroposan tulang pada tikus yang telah diovariectomi. CGRP- α dapat meningkatkan massa kepadatan tulang(SamplAe,2011).

Dalam studi yang telah dilakukan oleh Park, J., Kang, J. W., dan Lee, S. M. (2013) penggunaan dosis nikotin 1 mg/KgBB pada mencit dapat menurunkan ROS. Maka pada penelitian ini digunakan dosis setengahnya karena ekstrapolasi dari dosis mencit ke dosis tikus (Freireich, 1966).

2.3.2 Nikotin Menghambat Aktivitas Osteoklas

Nikotin dapat menurunkan aktivitas osteoklas dan resorpsi tulang dengan mekanisme kerja di nicotine acetylcholine receptor (nAChR) yang akan menurunkan ekspresi RANK-L, sehingga mencegah terjadinya ikatan kompleks antara RANK-L dengan RANK. Terganggunya ikatan RANK-L dengan RANK akan menghambat diferensiasi sel prekursor osteoklas dan menghambat aktivasi osteoklas sehingga proses resorpsi tulang menurun(Tanaka, et al., 2013). Aktivasi reseptor nikotin dapat menghambat diferensiasi sel prekursor osteoklas dan menurunkan aktivasi osteoklas dapat dilihat padagambar 2.1.



Gambar 2.1 Jalur pensinyalan RANK: protein transmembran tipe I RANK pada permukaan sel dalam hubungannya dengan faktor-faktor sitoplasmik yang menyangkut transduksi sinyal RANK. Nikotin menurunkan ekspresi RANK-L yang akan mencegah terjadinya ikatan kompleks antara RANK-L dengan RANK yang kemudian menghambat diferensiasi sel prekursor osteoklas dan menghambat aktivasi osteoklas.

2.4 Kadar Deoxypyridinoline

Proses metabolisme tulang terjadi secara terus menerus yang disebut dengan remodelling tulang. Termasuk didalamnya adalah proses degradasi yaitu resorpsi tulang oleh osteoklas serta proses pembentukan tulang oleh osteoblas. Matriks tulang organik sekitar 90% terdiri dari kolagen tipe I, yaitu *triple helical protein*. Kolagen tipe I dihubungkan secara silang (*cross-linked*) oleh molekul spesifik yang memberikan kekuatan pada tulang. *Cross-links* dari kolagen tipe I yang mature adalah pyridinium *cross-link*, pyridinoline (PYD) dan deoxypyridinoline (DPD).

Deoxypyridinoline (DPD) adalah bagian kecil dari struktur amino siklik yang menghubungkan rantai peptide molekul kolagen. DPD berfungsi sebagai indikator resorpsi tulang karena merupakan fragmen kolagen tulang yang diproduksi oleh

aktivitas osteoklas (Thomas, 2012). DPD dibentuk oleh enzim lysyl oxidase pada asam amino lisin. DPD dilepaskan ke sirkulasi selama proses resorpsi tulang (Hesley, et al, 1998). Aktivitas osteoklas dan osteoblas pada tulang dapat dinilai melalui biomarker resorpsi dan formasi tulang dan dalam beberapa kondisi dapat digunakan sebagai pengganti pemeriksaan histologis tulang. Biomarker tulang ini juga bisa digunakan untuk menentukan efek dari agen terapeutik pada beberapa pasien dengan osteoporosis (Singer dan Eyre, 2008).

2.4 Tikus sebagai Replikasi

2.4.1 Deskripsi Tikus Putih

Hewan percobaan atau hewan laboratorium adalah hewan yang sengaja dipelihara sebagai hewan model pengujian untuk mempelajari dan mengembangkan ilmu pengetahuan dari berbagai macam bidang dalam skala penelitian laboratoris. Tikus putih adalah salah satu hewan yang sering digunakan sebagai hewan coba dalam suatu penelitian. Hal ini karena tikus putih mudah diperoleh dalam jumlah banyak, mempunyai respon yang cepat dan memberikan gambaran secara ilmiah yang mungkin terjadi pada manusia, selain itu harganya yang relatif murah dijadikan sebagai salah satu pertimbangan dalam pemilihan hewan coba (Sihombing dan Tuminah, 2011). Tikus galur wistar adalah salah satu galur tikus putih yang sering digunakan pada penelitian sebagai hewan percobaan.

2.4.2 Konversi Umur Tikus Putih

Informasi konversi umur pada hewan coba adalah hal penting dalam suatu penelitian agar hasilnya bisa diaplikasikan pada manusia. Jika dibandingkan dengan

manusia pada masa mudanya tikus memiliki pertumbuhan yang pesat dan waktu hidup yang lebih singkat. Tikus berkembang sangat cepat pada masa muda dan mulai matang saat umur 6 minggu. Hal ini berbeda dengan manusia yang mengalami pertumbuhan yang lambat dan pubertas kira-kira pada usia 12 sampai 13 tahun. Pada masa dewasa setiap bulan umur tikus setara dengan 2,5 tahun umur manusia. Tikus betina menopause pada kisaran umur 15-18 bulan dimana pada manusia kira-kira terjadi pada umur 48-55 tahun. Tikus yang digunakan sebagai hewan coba mempunyai waktu hidup 3 tahun dengan ekspektasi umur manusia yaitu 70 tahun (Andreollo et al., 2012). Hubungan antara umur tikus dalam bulan dengan umur manusia dalam tahun pada fase dewasa dapat dilihat pada tabel 2.1

Tabel 2.1 Hubungan antara umur tikus dengan umur manusia pada fase dewasa

Umur tikus (bulan)	Umur manusia (tahun)
6	18
12	30
18	45
24	60
30	75
36	90
42	105
45	113
48	120

(Andreollo, et al., 2012)

Beberapa tahun terakhir juga telah diteliti hubungan antara umur tikus dan manusia yang menghubungkan beberapa parameter yang mempengaruhi tikus maupun manusia. Beberapa diantaranya adalah total waktu hidup, periode menyusui, periode pra pubertas, periode remaja, fase dewasa dan masa tua. Hasil

analisis perbandingan umur tikus dan manusia dengan fase hidup yang sama dapat dilihat pada tabel 2.2.

Tabel 2.2 Konversi Umur Tikus dan Manusia Berdasarkan Fase Hidup yang Sama

Parameter	Perbandingan Umur	
	Tikus (hari)	Manusia (tahun)
Masa hidup	13,8	=1
Masa menyusui	42,4	=1
Masa pra remaja	3,3	=1
Masa remaja	10,5	=1
Fase dewasa	11,8	=1
Masa tua	17,1	=1
Rata-Rata	16,4	=1

(Andreollo, et al.,2012)

Penggunaan metode perbandingan umur tikus dan manusia tergantung dari konteks yang akan dianalisis oleh peneliti, sehingga banyak metode yang digunakan. Semua teknik merupakan metode yang relatif. Oleh karena itu para peneliti secara umum menggunakan lebih dari satu metode untuk mendapatkan informasi umur (Sengupta,2013).

2.5.3 Tikus Model Osteoporosis

Pemahaman osteoporosis pascamenopause terhambat oleh sulitnya mempelajari penyakit yang dibatasi untuk manusia. Hal ini memungkinkan untuk menggunakan model hewan coba untuk menilai terapi pada osteoporosis (Khajuria, et al.,2012). Model hewan coba berperan penting dalam meningkatkan pengetahuan tentang etiologi, patofisiologi, dan diagnosis, serta teknik pencegahan dan terapeutik tentang osteoporosis. Saat ini tikus banyak digunakan sebagai model hewan coba untuk mempelajari osteoporosis karena harganya murah, bisa tumbuh dengan

cepat, memiliki *lifespan* yang relatif pendek dan tersedia dalam jumlah banyak (Lasota dan Danowska,2004).

Ada beberapa metode untuk mendapatkan pola osteoporosis standar, seperti diet rendah kalsium, agonis LHRH atau ovariectomi. Metode ovariectomi dianggap sebagai prosedur terbaik yang memberi model osteoporosis pada hewan coba (Yamazaki dan Yamaguchi,1989). Ovariectomi sendiri bisa dilakukan dengan berbagai cara.Pilihan prosedur bedah sangat penting, terutama jika menggunakan hewan coba dalam jumlah yang banyak dalam waktu yang singkat.

2.5.3.1 Prosedur Bilateral Oovorektomi pada Tikus

Prosedur bilateral oovorektomi dilakukan menurut metode Ingle DJ dan Grith JQ yang dimodifikasi yaitu tikus dianestesi dengan menggunakan Ketamin i.m dosis 40 mg/kgBB.Bulu abdomen dicukur kira-kira 1 cm garisan di atas ovarium, lalu dilakukan sterilisasi menggunakan alkohol 70% dan betadine solution. Kemudian dilakukan insisi transabdominal di atas uterus sepanjang 1,5-2 cm. Oviduk bagian distal dan ovarium diligasi kemudian diangkat.Luka potongan diberi Basitrasin serbu (Nebacetin). Prosedur yang sama dilakukan untuk ovarium kanan. Luka insisi dijahit dengan catgut kemudian diolesi Betadine dan Nebacetin, lalu ditutup dengan kasa steril. Kemudian diberikan Gentamisin i.m dengan dosis 60-80 mg/kgBB 1 kali perhari selama 3 hari dan Novalgin i.m dengan dosis 0,3 ml selama 1 hari (Raden,2011).