

**ANALISIS KANDUNGAN KALSIMUM SKELETON FETUS MENCIT (*Mus musculus L.*)
SETELAH PENDEDAHAN MORFIN SELAMA PERIODE
ORGANOGENESIS**

Arum Setiawan
Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya

ABSTRACT

This experiment was performed to examine the effects of Morphine on Histochemically Structure of fetuses tibia epiphyseal cartilage in pregnant mice at the organogenesis period. Thirty pregnant mice were divided randomly into 5 groups of 6. Morphine was dissolved in aquabides and administrated intramuscular on sixth to fifteenth days of gestation. Morphine was given at the dosage of 0,02; 0,05 and 0,13 mg/20g body weight, respectively. The remaining animals were used as controls and placebo group. At eighteenth day of gestations, the pregnant mice were sacrificed and caesarian sectioned to remove the fetuses. The histochemically structure of tibia epiphyseal cartilages were observed using Von Kossa staining method. Result of these studies indicated that morphine given to the pregnant mice at the organogenesis period caused calcium deposit retardation on the foetus tibial growth plate significantly.

ABSTRAK

*Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh morfin yang diberikan pada mencit (*Mus musculus L.*) bunting selama masa organogenesis terhadap kandungan kalsium skeleton fetusnya. Tiga puluh ekor mencit bunting secara acak dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dengan 6 ulangan. Morfin dilarutkan dalam aquabides, diberikan secara intramuskular pada saat kebuntingan hari ke-6 sampai hari ke-15. Dosis perlakuan morfin adalah 0,02 ; 0,05 dan 0,13 mg/20g bb, sedang sisanya sebagai kontrol dan plasebo. Pada hari ke-18 induk dikorbankan dan dilbedah cesar. Fetus diambil tulang panjang dari ekstremitas posteriornya (tibia) dengan cara amputasi. Sampel tulang dipreparasi dengan menggunakan metode Von Kossa Perak Nitrat. Untuk mendeteksi kalsium dalam matriks tulang diamati pada zona ossifikasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan kalsium os tibia fetus mencit mengalami penurunan yang signifikan.*

PENDAHULUAN

Morfin merupakan salah satu jenis narkotika yang sering disalahgunakan. Dunia kedokteran menggunakan morfin untuk obat penenang, obat untuk menghilangkan rasa sakit atau nyeri, untuk pengobatan edema paru akut, pengobatan batuk dan pengobatan diare. Dengan dosis sebesar 10–15 mg, morfin dapat menimbulkan rasa santai. Obat ini dapat diberikan secara sub kutan, intramuskuler dan intravena (Tjay & Rahardja, 1979).

Kemungkinan terjadinya pengaruh buruk morfin terhadap fetus dapat melalui : 1) Pemakaian obat selama persalinan untuk mengurangi rasa sakit, 2) Melalui penyalahgunaan oleh ibu yang menderita ketergantungan (adiksi) terhadap obat-obat narkotika, khususnya morfin sehingga pemakaiannya cenderung berulang. Penyalahgunaan obat-obatan ini oleh ibu hamil dapat menyebabkan ketergantungan pada fetus dalam kandungan. Hal ini akan tampak pada bayi-bayi yang baru lahir yaitu dengan munculnya gejala-gejala *withdrawal* (putus obat) meliputi muntah, diare, *tremor*, *irritable* dan kejang (Santosa, 1990).

Menurut Siswosudarmo (1988), morfin merupakan salah satu jenis narkotika yang diduga bersifat teratogenik. Berat molekul morfin yang hanya 282,3 dalton (< 600 dalton) menyebabkan molekul morfin mudah menembus barrier plasenta dan diserap oleh fetus, sehingga berdampak merugikan fetus. Peranan biokimia morfin dalam tubuh adalah sebagai *inhibitor* (penghambat) adenilatsiklase, yaitu enzim yang mengkatalisis konversi 5'-Adenosin Tri Fosfat menjadi 3',5'-Adenosin Mono Fosfat siklik (Foye, 1995). Adenilatsiklase yang tidak aktif menyebabkan terjadinya penurunan kadar cAMP dan penurunan permeabilitas membran sel terhadap ion kalsium. Penurunan kadar cAMP dalam sel ini menyebabkan terjadi penurunan sekresi ion kalsium dari mitokondria, inaktifasi protein kinase dan berpengaruh terhadap reaksi enzimatik yang lain (Shahib, 1989; Martini, 1998). Penurunan sekresi ion kalsium akan menyebabkan penurunan penyerapan ion kalsium yang sangat diperlukan untuk pembentukan dan pertumbuhan skeleton embrio mencit. Hal ini bisa mengakibatkan terjadinya kelainan pertumbuhan dan perkembangan skeleton pada embrio mencit (*Mus musculus*, L.).

Setiawan (2001), menyatakan bahwa morfin menghambat pertumbuhan kartilago epifisial os tibia fetus mencit, sehingga memungkinkan terjadi juga hambatan proses pembentukan tulang rangka mencit. Morfin juga menyebabkan penurunan jumlah ruas *vertebrae caudalis*, *metacarpalia*, *metatarsalia*, dan *sternum* dan menyebabkan beberapa kelainan pertumbuhan skeleton (Setiawan, 2002). Sampai saat ini belum ada data mengenai kandungan kalsium dalam skeleton fetus mencit dari induk yang diberi morfin selama periode organogenesis, sehingga menarik perhatian untuk diteliti lebih lanjut.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh morfin yang diberikan pada mencit yang sedang bunting selama masa organogenesis terhadap kandungan kalsium skeleton fetus mencit (*Mus musculus* L.).

METODE

Waktu dan Tempat.

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Mei sampai Oktober 2003, bertempat di Laboratorium Zoologi dan Laboratorium Mikroteknik Hewan Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Sriwijaya, Inderalaya.

Bahan dan Alat.

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah : hewan uji yaitu 30 ekor mencit (*Mus musculus* L.) betina belum pernah bunting , umur 2 bulan, dengan berat 25 – 30 g , dan 5 ekor mencit (*Mus musculus* L.) jantan dewasa fertil. Hewan uji diberi pakan berupa pellet Par G. Morfin HCl 10 mg/ml buatan Kimia Farma diperoleh dari PBF (Pedagang Besar farmasi) Kimia Farma . Bahan yang diperlukan dalam pembuatan preparat histologi tibia fetus yaitu : Formalin 10 % , Alkohol Absolut dan Alkohol 96 % , Parafin, Xylol, Toluol, Perak Nitrat 1 % , Sodium Tiosulfat 5 % , Safranin Aqueosa 0,5 % , gelas benda dan penutup, dan canada balsam.

Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah kandang untuk pemeliharaan hewan percobaan. Spuit injeksi ukuran 1 ml untuk pemberian perlakuan. Satu set alat bedah untuk membedah hewan perlakuan. 1 unit untuk preparasi skeleton. Kaca pembesar, mikroskop, mikrometer, serta alat fotomikrografi sebagai alat dokumentasi.

Cara Kerja.

1. Persiapan Hewan Uji.

Sebelum penelitian ini dimulai, hewan percobaan disiapkan dan diperiksa

siklus estrusnya dengan cara membuat preparat apus vagina. Setelah mendapatkan mencit yang memiliki siklus reguler sebanyak 30 ekor, dilakukan pembagian secara acak menjadi 5 kelompok, masing-masing 6 ekor tiap kelompok.

Mencit betina yang berada dalam stadium estrus dikandangan bersama-sama dengan mencit jantan untuk dikawinkan. Pencampuran mencit jantan dan mencit betina itu dilakukan pada sore hari dan apabila pada keesokan harinya ditemukan sumbat vagina (*vaginal plug*) atau sperma di dalam vagina, maka pada hari itu ditentukan sebagai hari pertama kebuntingan.

2. Perlakuan.

Sebelum perlakuan terlebih dahulu ditentukan dosis perlakuan morfin. Dosis yang digunakan ini berdasarkan pada pemakaian morfin pada manusia secara intramuskuler / intra vena yaitu : rata-rata 20 mg sekali suntik, dengan dosis maksimal adalah 50 mg.

Tiga puluh ekor mencit buting dikelompokkan menjadi 5 perlakuan secara acak, masing-masing perlakuan terdiri dari 6 ekor mencit. Dosis morfin untuk masing-masing perlakuan adalah sebagai berikut :

I. Kontrol (Tanpa Perlakuan).

II. Kontrol Placebo (Akuabides)

III. Perlakuan Morfin 0,02 mg/20 g bb.

IV. Perlakuan Morfin 0,05 mg/20 g bb.

V. Perlakuan Morfin 0,13 mg/20 g bb.

Perlakuan diberikan secara intramuskuler dengan volume 0,5 ml selama 10 hari berturut-turut, yaitu mulai hari ke-6 sampai dengan hari ke-15 kebuntingan.

3. Pengambilan Data.

Pengamatan fetus dilakukan pada hari ke-18 kebuntingan dengan cara pembedahan bagian perut untuk mengeluarkan fetus dari uterus. Fetus diambil tulang panjang dari *ekstremitas* posteriornya (*tibia*) dengan cara amputasi. Sampel tulang dipreparasi dengan menggunakan metode *Von Kossa Perak Nitrat* (Drury *et al.*, 1976). Prinsip kerja metode ini adalah ikatan antara kalsium dengan fosfat di dalam matriks kartilago akan digantikan oleh *Argentum* (Ag), sehingga terjadi ikatan antara *argentum* dengan fosfat. *Argentum* yang terikat dengan fosfat oleh sinar matahari atau oleh pereduksi hidroquinin akan tereduksi membentuk endapan berwarna hitam. Deteksi kalsium dalam matriks kartilago epifisialis tibia yaitu pada zona osifikasi, dilakukan terhadap adanya endapan berwarna hitam, sebagai

indikasi adanya kalsium dalam matriks kartilago epifisialis tibia fetus.

Cara mendeteksi kalsium dalam matriks tulang dengan mengamati kalsium pada zona ossifikasi. Cara kerja metode ini adalah : preparat tulang difiksasi dalam larutan formalin 10 %. Specimen tulang kemudian dibuat preparat irisan setebal 6 μ m dengan metode parafin. Hasilnya dideparafinasi dalam xylol dan dipindahkan ke akuades melalui alkohol bertingkat dari alkohol absolut. Kemudian dilakukan *washing* beberapa kali dengan akuades. Selanjutnya direndam dalam larutan AgNO₃ (perak nitrat) 1 % selama 30 menit. Perendaman dilakukan di tempat terang tetapi tidak terkena cahaya matahari langsung. Preparat kembali dicuci dengan akuades lalu direndam dalam larutan sodium thiosulfat 5 % selama 3 menit. Kemudian dilakukan lagi *washing* dengan air mengalir. Dilakukan pewarnaan dengan pewarnaimbangan berupa safranin 0,5 % akuosa selama 1 menit. Selanjutnya dideferensiasi dengan alkohol 96 % dan alkohol absolut. Kemudian dilakukan *clearing* dalam xylol setelah sebelumnya di lap dengan kertas saring. Preparat ditutup gelas penutup menggunakan canada balsam. Hasilnya adalah untuk timbunan kalsium

terwarna hitam, nukleus merah dan elemen jaringan lainnya merah jambu.

Analisis Data.

Gambaran histokimia (Analisis Kandungan Kalsium) kartilago epifisialis *tibia* fetus diamati secara deskriptif kualitatif. Pemberian skor dilakukan terhadap gambaran histokimia yaitu timbunan kalsium pada zona ossifikasi :

- + , untuk yang terwarna terang sekali (timbunan kalsium sangat sedikit).
- ++ , untuk yang terwarna coklat kemerahan (timbunan kalsium sedikit).
- +++ , untuk yang terwarna coklat kehitaman (timbunan kalsium banyak).
- ++++ , untuk yang terwarna hitam (timbunan kalsium banyak sekali).

HASIL DAN PEMBAHASAN.

Pengamatan terhadap gambaran histokimia (kandungan kalsium) kartilago epifisialis *tibia* fetus dilakukan pada zona osifikasi. Pada zona osifikasi ini terjadi pembentukan jaringan tulang endokondral sebagai rangka penyokong. Di samping itu, dalam zona ini juga terdapat kapiler darah dan osteoblas yang membentuk lapisan tidak utuh di atas septa matriks kartilago yang

mengapur dan selanjutnya osteoblas menghasilkan matriks tulang.

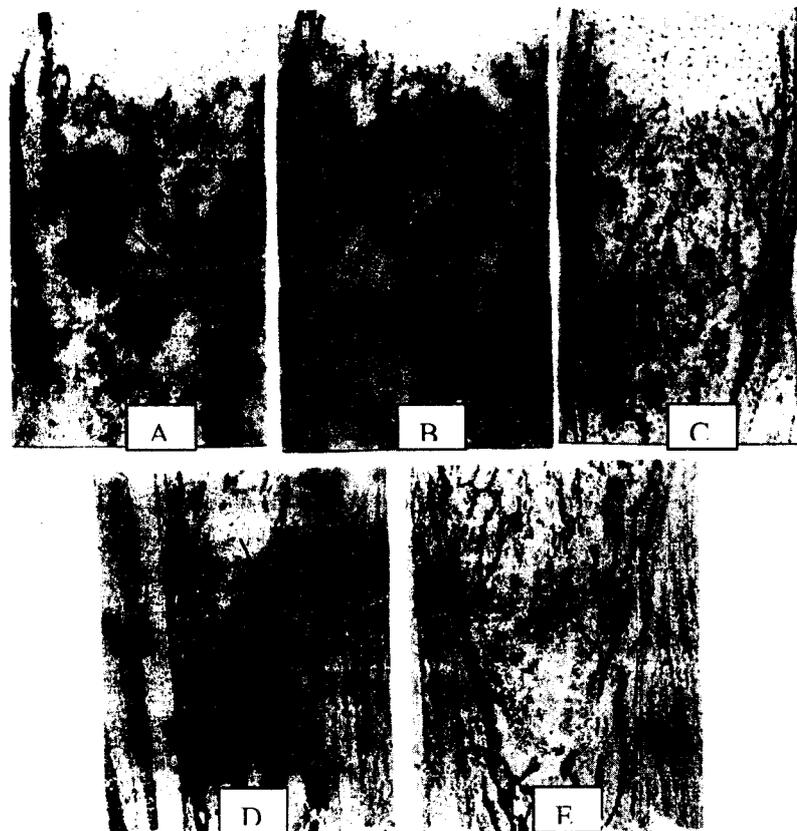
Pengamatan terhadap gambaran histokimia ini dilakukan untuk mengetahui kandungan kalsium yang terdapat dalam matriks kartilago epifisialis dan tampak jelas dalam zona osifikasi ini. Untuk mengetahui timbunan kalsium tersebut dilakukan pengecatan histokimia perak nitrat menurut metode Von Kossa (Drury *et al.*, 1976). Pengecatan akan menyebabkan tertimbunnya kalsium yang akan terdeteksi sebagai endapan merah sampai hitam. Prinsip pewarnaan ini pada dasarnya adalah reaksi

penggantian ikatan kalsium-fosfat dalam matriks kartilago menjadi ikatan perak (Ag) dengan fosfat. Perak yang terikat fosfat ini oleh sinar matahari atau oleh pereduksi hidroquinon akan tereduksi membentuk endapan berwarna hitam. Semakin tinggi timbunan kalsiumnya, semakin tinggi pula intensitas warna (hitam) yang dihasilkan.

Hasil pengamatan gambaran histokimia kalsium pada zona osifikasi kartilago epifisialis *tibia* secara kualitatif disajikan pada Tabel 1. Sedangkan gambaran fotomikrograf kandungan kalsium pada zona osifikasi tersebut disajikan pada Gambar 1.

Tabel 1. Deteksi Kalsium dalam Zona osifikasi Kartilago Epifisialis *Tibia*
Fetus dari Induk Mencit yang diberi Morfin.

Dosis Perlakuan (mg/20gb)	Hasil Reaksi Terhadap Metode Von Kossa	Keterangan	
		(Warna)	Deskripsi Kandungan Kalsium (Ca ⁺⁺)
Kontrol	++++	Hitam	Tinggi
Plasebo	++++	Hitam	Tinggi
0,02	+++	Coklat kehitaman	Sedang
0,05	+	Merah	Rendah
0,13	+	Merah	Rendah



Gambar 1. Fotomikrograf Timbunan Kalsium dalam Zona Osifikasi Kartilago Epifisialis *Tibia* Fetus.

(A) Kelompok Kontrol. (B) Kelompok Plasebo. (C) Kelompok Dosis 0,02 mg/20g bb. (D)) Kelompok Dosis 0,05 mg/20g bb.(E)) Kelompok Dosis 0,13 mg/20g bb. Keterangan : tanda panah (→) : endapan kalsium. Tebal Irisan : 6 μ m. Pewarnaan : Perak nitrat Von Kossa.

Hasil pengamatan secara diskriptif kualitatif menunjukkan adanya perbedaan warna antara kelompok kontrol dan plasebo dengan kelompok perlakuan. Pada kelompok

kontrol dan plasebo dapat terlihat dengan jelas adanya endapan hitam pada zona osifikasi (Gambar 1 A-B). Pada kelompok perlakuan morfin dengan dosis 0,02 mg/20g

bb warna endapan yang dihasilkan adalah coklat kehitaman, yang berarti pada perlakuan ini kandungan kalsium pada zona osifikasinya lebih rendah jika dibandingkan dengan kontrol dan plasebo. Untuk perlakuan dengan dosis 0,05 mg/20g bb dan dosis 0,13 mg/20g bb warna endapan yang dihasilkan lebih terang, yaitu berwarna merah. Hal ini berarti kandungan kalsium pada zona osifikasi dari kedua dosis tersebut lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, plasebo, dan perlakuan dosis 0,02 mg/20g bb. Dari penelitian ini dapat dikatakan bahwa morfin dapat mempengaruhi proses kalsifikasi kartilago epifisialis *tibia* fetus.

Banyak sedikitnya kandungan kalsium dalam zona osifikasi ternyata berhubungan dengan aktifitas kondrosit pada zona-zona sebelum-nya, yaitu pada zona istirahat, zona proliferasi, zona maturasi dan zona kalsifikasi. Ham & Cormack (1979) menyatakan, bahwa kondrosit pada masing-masing zona pada kartilago epifisialis mempunyai penampilan yang tidak sama secara morfologis. Hal ini disebabkan karena makin ke arah diafisis sel-sel kartilago berkembang sesuai dengan perubahan-perubahan yang terjadi pada pusat

penulangan. Zona proliferasi berfungsi sebagai tempat pembentukan sel-sel baru, sedangkan zona maturasi berfungsi sebagai penghasil enzim fosfatase yang diperlukan untuk kalsifikasi bahan ekstraseluler yang mengelilingi kondrosit yang hipertrofi. Aktifitas kondrosit pada kedua zona ini memegang peranan penting dalam osifikasi endokondral. Apabila terjadi gangguan atau hambatan pada kedua zona ini akibat adanya agensia teratogenik, maka proses kalsifikasi akan terganggu.

Menurut Subowo (1992), proses kalsifikasi bisa terjadi apabila kondrosit pada zona maturasi yang mengalami hipertrofi menghasilkan enzim fosfatase alkali, keadaan pH lingkungan yang cukup basa, cukup tersedianya ion fosfat dan kalsium dalam darah, dan adanya matriks interseluler organik yang mempunyai afinitas terhadap garam kalsium. Apabila salah satu persyaratan seperti tersebut diatas tidak terpenuhi, karena terjadi kerusakan atau gangguan fungsional pada kondrosit dalam masing-masing zona, maka kalsium yang sudah tersedia dari pasokan nutrisi lewat pembuluh darah tidak terendapkan secara sempurna dalam zona osifikasi kartilago epifisialis.

KESIMPULAN

Hasil pengamatan, analisis data dan pembahasan yang telah dilakukan, menghasilkan beberapa kesimpulan sebagai berikut : Morfin yang diberikan pada induk mencit bunting selama masa organogenesis menyebabkan terhambatnya proses kalsifikasi kartilago epifisial os *tibia* fetus yang ditunjukkan dengan semakin turunnya kandungan kalsium pada *os tibia* fetus seiring dengan semakin meningkatnya dosis perlakuan.

DAFTAR PUSTAKA

- Drury, R.A.B., E.A. Wallington & S.R. Cameron, 1976, *Carleston's Histological Technique*, Oxford University Press, London, pp. 150 – 151.
- Ebel, S., 1992, *Obat Sintetik (Tinjauan, Sintesis, Biotransformasi, Analisis)*, diterjemahkan oleh Mathilda B. Widiyanto, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, hal. 6-12.
- Foye, W.O., 1995, *Prinsip-prinsip Kimia Medisinal*, 2nd ed., diterjemahkan oleh R. Rasyid, K. Firman, T. Suwarno dan A. Musadad, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, hal. 487-495.
- Gibson, G.G. & Skett, P., 1991, *Pengantar Metabolisme Obat*, diterjemahkan oleh I. Aisyah B., UI Press, Jakarta, hal.150,195,232.
- Ham, A.W., & D.H., Cormack, 1979, *Histology*, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, pp. 377 – 435.
- Junqueira, L.C., J. Carneiro & R.O. Kelley, 1998, *Histologi Dasar*, Terjemahan oleh J. Tambayong, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, hal. 143 – 150.
- Martini, F., 1998, *Fundamentals of Anatomy and Physiology*, 4th edition, Prentice Hall International Inc., USA, pp. 400, 596.
- Mursyidi, A., 1989, *Analisis Metabolit Sekunder*, PAU UGM, Yogyakarta, hal. 94-96.
- Santosa, B., 1990, *Masalah Pemakaian Obat pada Kehamilan*, Laboratorium Farmakologi Klinik, Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta, hal. 1-15.
- Setiawan, A., 2002, Pengaruh Morfin Terhadap Pertumbuhan Kartilago Os Tibia Fetus Mencit (*Mus musculus L.*), *Jurnal Penelitian Sains*, FMIPA Universitas Sriwijaya.
- Setiawan, A., 2002, Pengaruh Morfin Terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Skeleton Fetus Mencit (*Mus musculus L.*), *Laporan Penelitian*, Lembaga Penelitian Universitas Sriwijaya.
- Shahib, N., 1989, *Ringkasan Biokimia Hormon*, Elstar offset, Bandung, hal.5-7.
- Siswosudarmo, R., 1988, *Efek Samping Obat Terhadap Perkembangan Janin (dalam Efek Samping Obat)*,



Laboratorium Farmakologi Klinik
Fakultas Kedokteran Umum, UGM,
Yogyakarta, hal. 131 – 132.

Subowo, 1992, *Histologi Umum*, PAU ITB,
PT. Bumi Aksara Jakarta.

Tjay, T.H., & K. Rahardja, 1979, *Obat-
obatan Penting (Khasiat dan
Penggunaannya)*, Departemen
Kesehatan Republik Indonesia,
Jakarta, hal.200-215, 216-218, 250-
255.