

PERTUMBUHAN SKELETON FETUS MENCIT (*Mus musculus L.*) SETELAH PEMBERIAN MORFIN SELAMA MASA ORGANOGENESIS

Arum Setiawan
Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya

ABSTRAK

*Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh morfin terhadap pertumbuhan skeleton fetus mencit (*Mus musculus L.*) setelah pemberian morfin selama masa organogenesis. Tiga puluh ekor mencit dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dengan masing-masing 6 ulangan. Pemberian morfin secara intramuskular dilakukan pada hari ke-6 sampai hari ke-15 kebuntingan. Dosis morfin yang diberikan adalah 0,02; 0,05 dan 0,13 mg/20gr bb. Kelompok yang lain adalah sebagai kontrol dan kontrol plasebo. Pada hari ke-18 kebuntingan mencit dibedah untuk diambil fetusnya. Pertumbuhan dan perkembangan skeleton fetus mencit diamati dengan menggunakan metode pewarnaan Alcian Blue-Alizarin Red S. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa morfin yang diberikan selama masa organogenesis menyebabkan terhambatnya pertumbuhan skeleton fetus mencit.*

Kata kunci : morfin, mencit, fetus, skeleton.

ABSTRACT

This experiment was performed to examine the effects of Morphine on growth and development of foetuses skeletal 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 foetuses. Foetuses skeletal growth and development were observed grossly using Alcian Blue-Alizarin Red S stain. Result of these studies indicated that morphine given to the pregnant mice at the organogenesis period caused retardation of foetuses skeletal growth.

Key word : morphine, mice, foetus, skeletal.

PENDAHULUAN.

Morfin adalah suatu alkaloida utama opium (getah kering dari buah *Papaver somniferum*) yang mempunyai khasiat analgesik yang sangat kuat. Morfin pertama kali diisolasi pada tahun 1805 oleh Sertuner (seorang ahli farmasi Jerman), identifikasi strukturnya dilakukan oleh Robinson tahun 1925 dan Schoepf tahun 1927 (Ebel, 1992).

Bentuk morfin biasanya berupa kristal berwarna putih dengan rasa pahit, mempunyai titik lebur 254 – 256 °C. Senyawa ini umumnya berbentuk garam. Morfin hidroklorida berupa kristal putih larut dalam air dengan memutar bidang polarisasi ke kiri, larut dalam ethanol, dan tidak larut dalam eter maupun kloroform. Rumus molekul morfin adalah $C_{17}H_{19}NO_3$ dengan berat molekul 282,3 dalton (Mursyidi, 1989).

Morfin mempunyai khasiat analgetik yang sangat kuat. Di samping itu juga memiliki banyak kerja pada bagian saraf sentral lainnya, antara lain : menurunkan rasa kesadaran (sedasi, hipnotis), menghambat pernafasan, menghilangkan refleksi batuk dan menimbulkan *euforia* (rasa nyaman), yang

semuanya berdasarkan pada penekanan sistem saraf pusat (SSP) (Tjay & Rahardja, 1979). Morfin ini akan mengubah impuls nyeri pada SSP. Kesadaran akan nyeri mungkin tetap ada atau berkurang, tetapi kemampuan untuk menafsirkan, menggabungkan, dan bereaksi terhadap nyeri menurun karena adanya sedasi, *euforia*, penurunan keresahan dan penderitaan (Foye, 1995).

Di dalam dunia kedokteran morfin digunakan 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).

Morfin sangat lipofilik dan tidak dapat langsung diekskresi karena dengan cepat morfin diserap ke dalam jaringan padat lemak termasuk otak. Akan tetapi morfin mengalami konjugasi fase kedua dengan asam glukoronidase dalam hati, membentuk metabolit morfin-3-glukoronidase. Metabolit ini larut dalam air dan tidak dapat langsung

masuk ke otak, konjugasinya lalu siap diekskresi (Gibson & Skett, 1991).

Selain digunakan dalam dunia kedokteran, morfin akhir-akhir ini sering di salah gunakan dan termasuk salah satu jenis narkotika golongan I. Penyalahgunaan morfin 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 *withdrawl* (putus obat) meliputi muntah, diare, *tremor*, *irritable* dan kejang (Santosa, 1990).

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, inaktivasi 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), membuktikan bahwa morfin yang diberikan pada mencit bunting selama masa organogenesis akan menghambat pertumbuhan kartilago epifisialis os tibia fetus mencit.

Penelitian ini dilakukan untuk mempelajari pengaruh morfin yang diberikan pada mencit yang sedang bunting selama masa organogenesis terhadap pertumbuhan dan perkembangan skeleton embrionya.

METODE

Waktu dan Tempat.

Penelitian ini dilakukan selama 4 bulan antara Juni 2002 sampai September 2002 bertempat di Laboratorium Zoologi Jurusan Biologi FMIPA UNSRI.

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 untuk preparasi skeleton yaitu : Alkohol 96 % , Pewarna *Alcian Blue – Alizarin Red S*, Aseton, KOH 1 % , dan Gliserin.

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 dan 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 dikandangkan 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. Rancangan Percobaan.

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

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

Kontrol (tanpa perlakuan)

Kontrol Placebo (akuabides)

Perlakuan Morfin 0,02 mg/20g bb.

Perlakuan Morfin 0,05 mg/20g bb.

Perlakuan Morfin 0,13 mg/20g 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. Variabel Pengamatan.

Pengamatan embrio dilakukan pada hari ke-18 kebuntingan dengan cara pembedahan bagian perut untuk mengeluarkan embrio dari uterus. Embrio dibersihkan dari cairan amnion yang menyelubunginya. Embrio yang hidup sekelahiran difiksasi dalam alkohol 96 %, selanjutnya dilakukan preparasi skeleton dengan metode pewarnaan *Alcian Blue - Alizarin Red S* (Metode Inouye, 1976).

Kelainan yang terjadi pada komponen *ekstremitas*, *costae*, *sternum*, dan *vertebrae* dicatat. Sedangkan tulang *metacarpalia*, *metatarsalia*, *sternum*, dan *vertebrae caudalis* dihitung jumlah penulangannya.

4. Analisis Data.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada tingkat kepercayaan 5 % dan 1 % dengan 5 perlakuan dan masing-masing perlakuan dengan 6 ulangan. Analisis Varian pola satu

arah dilakukan untuk data rerata jumlah komponen tulang *sternum*, *metacarpalia*, *metatarsalia*, dan *vertebrae caudalis*. Jika dari analisis varian menunjukkan hasil yang signifikan, uji statistik dilanjutkan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT). Data berupa jumlah embrio yang mengalami kelainan osifikasi skeleton dianalisis dengan uji *Chi-square*.

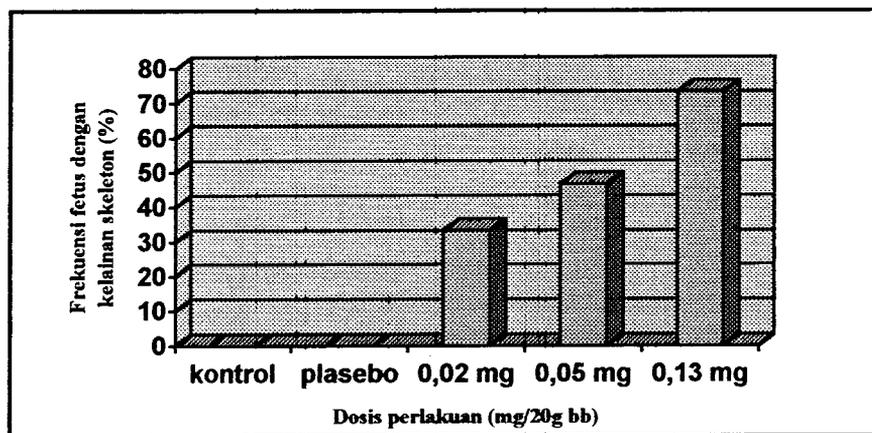
HASIL DAN PEMBAHASAN.

Pengamatan terhadap tingkat penulangan secara umum dilakukan setelah fetus diwarnai dengan *Alcian Blue - Alizarin Red S*. Pengamatan pertumbuhan skeleton ini dilakukan terhadap skeleton *axiale* yaitu pada *costae* dan *vertebrae caudalis*, serta pada *skeleton appendiculare* yang meliputi komponen *ekstremitas anterior* (ruas *metacarpalia*) dan komponen *ekstremitas posterior* (ruas *metatarsalia*).

Hasil pengamatan menunjukkan terjadi kelainan skeleton fetus dari induk bunting hari ke-18 yang diberi perlakuan morfin. Kelainan ini berupa terjadinya keterlambatan penulangan pada *sternum*, *vertebrae caudalis*, *metacarpalia* dan *metatarsalia*.

Tabel 1. Jumlah Fetus yang Mengalami Kelainan pada Skeleton dari Induk Mencit Bunting yang diberi Morfin.

Dosis Perlakuan (mg/kg bb)	Jumlah Fetus Total (ekor)	Jumlah Fetus Yang mengalami kelainan skeleton (ekor)	Frekuensi Fetus yang mengalami kelainan skeleton (%)
Kontrol	15	0	0
Plasebo	15	0	0
0,02	15	5	33,33
0,05	15	7	46,67
0,13	15	11	73,33



Gambar 1. Histogram Frekuensi Fetus yang Mengalami Kelainan Skeleton

Pada Tabel 1 dan Gambar 1. , terlihat bahwa kelainan pertumbuhan skeleton terjadi mulai dari dosis morfin yang paling rendah yaitu 0,02 mg/20g bb. Pada kelompok kontrol dan plasebo tidak ditemukan adanya fetus yang mengalami kelainan penulangan. Jumlah fetus terbanyak yang mengalami

kelainan penulangan skeleton adalah pada kelompok perlakuan tertinggi (dosis 0,13 mg/20g bb) yaitu 11 ekor fetus atau 73,33 % dari 15 ekor fetus yang diamati.

Analisis *Chi -square* menunjukkan bahwa $H_{hitung} > H_{Tabel}$ (H_0 ditolak), yang berarti terdapat hubungan antara pemberian

morfin dengan terjadinya kelainan skeleton. Dari Gambar 1. dapat dilihat bahwa semakin besar dosis morfin yang diberikan, frekuensi fetus yang mengalami kelainan skeleton cenderung semakin meningkat.

Hasil pengamatan terhadap komponen tulang penyusun *metacarpalia*, *metatarsalia*, *sternum* dan *vertebrae caudalis* juga menunjukkan adanya keterlambatan osifikasi. Hal ini dapat diketahui dengan jalan mengamati langsung atau dengan menghitung jumlah ruas komponen tulang penyusunnya.

a. *Metacarpalia*.

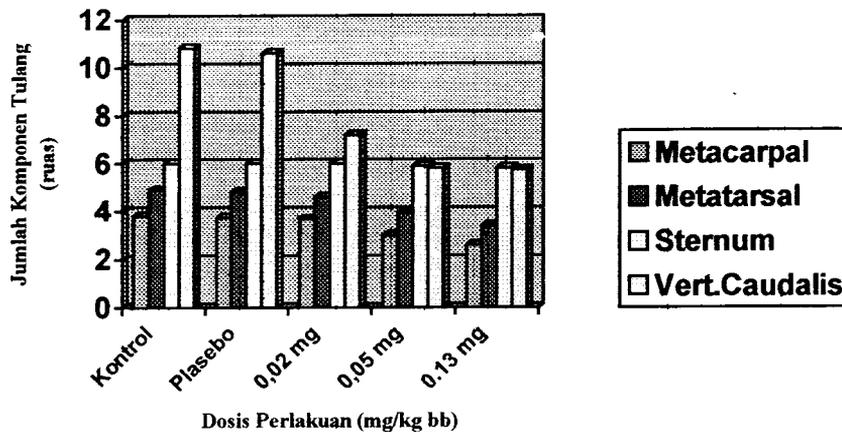
Hasil pengamatan terhadap komponen penyusun *metacarpalia* menunjukkan bahwa seiring dengan meningkatnya dosis morfin yang diberikan,

jumlah komponen *metacarpalia* yang menulang cenderung mengalami penurunan. Hal ini menunjukkan bahwa morfin berpengaruh terhadap proses osifikasi tulang *metacarpalia*. Dari hasil uji DMRT pada taraf 5 % dan 1 % diketahui bahwa penurunan jumlah komponen *metacarpalia* yang menulang secara nyata hanya tampak pada dosis perlakuan tertinggi yaitu 0,13 mg/20g bb. Jika dibandingkan dengan jumlah komponen *metacarpalia* yang menulang dari kelompok kontrol dan plasebo, maka pada perlakuan dosis paling rendah (0,02 mg/20g bb) tidak menunjukkan beda nyata, berarti pada dosis tersebut morfin belum berpengaruh terhadap proses osifikasi tulang *metacarpalia*.

Tabel 2. Rerata Jumlah Komponen Penyusun *Metacarpalia*, *Metatarsalia*, *Sternum* dan *Vertebrae Caudalis* yang menulang dari Induk Mencit yang diberi Morfin.

Dosis Perlakuan (mg/kg bb)	Rerata Jumlah Komponen yang menulang (ruas)			
	<i>Metacarpalia</i> X ± SD	<i>Metatarsalia</i> X ± SD	<i>Sternum</i> X ± SD	<i>Vert.Caudalis</i> X ± SD
Kontrol	3,80 ± 0,41 a	4,87 ± 0,35 a	6,00 ± 0,00 a	10,80 ± 3,14 a
Plasebo	3,73 ± 0,46 ab	4,80 ± 0,41 a	6,000 ± 0,00 a	10,60 ± 2,99 a
0,02	3,67 ± 0,49 ab	4,60 ± 0,63 ab	6,00 ± 0,00 a	7,20 ± 1,93 b
0,05	3,00 ± 1,31 bc	3,93 ± 1,28 bc	5,89 ± 0,35 ab	6,67 ± 2,09 b
0,13	2,60 ± 1,50 c	3,40 ± 1,99 c	5,80 ± 0,41 b	5,73 ± 2,05 b

Keterangan : Huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak ada beda nyata.



Gambar 2. Histogram Rerat Jumlah Komponen Tulang *Metacarpalia*, *Metatarsalia* *Sternum*, dan *Vertebrae Caudalis* dari Induk Mencit yang diberi Morfin.

b. *Metatarsalia*.

Menurut Rugh (1968), kondrifikasi tulang-tulang *metatarsalia* seperti halnya *meta-carpalia* terjadi pada hari ke-13 kebuntingan. Osifikasinya juga sama yaitu terjadi pada hari ke-16 kebuntingan. Jumlah komponen ruas *metatarsalia* pada fetus yang telah mengalami osifikasi sempurna adalah 5 ruas. Pada penelitian ini, jumlah ruas *metatarsalia* yang menulang untuk kelompok kontrol dan plasebo berkisar antara 4 – 5 ruas. Sedangkan pada kelompok perlakuan berkisar antara 0 – 5 ruas. Hal ini menunjukkan terdapat ruas tulang

metatarsalia yang belum mengalami osifikasi sama sekali.

Tabel.2 meunjukkan pengaruh morfin mulai tampak pada dosis terendah yaitu 0,02 mg/20g bb, yang ditandai dengan penurunan jumlah komponen tulangnya. Penurunan ini terjadi seiring dengan makin tingginya dosis morfin yang diberikan. Hal ini menunjukkan bahwa morfin mempunyai pengaruh terhadap proses osifikasi *metatarsalia*.

Hasil analisis menunjukkan ada perbedaan yang sangat bermakna ($P < 0,01$) untuk jumlah komponen ruas *metatarsalia* yang menulang antara kelompok kontrol, plasebo, dan kelompok perlakuan. Dari uji

DMRT diketahui bahwa pada dosis 0,02 mg/20g bb tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol dan plasebo. Sedangkan untuk kelompok perlakuan dosis 0,05 mg/20g bb dan dosis 0,13 mg/20g bb menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol dan plasebo.

c. *Sternum.*

Pertumbuhan tulang *sternum* untuk menciit terjadi pada hari ke-14 kebuntingan yang diawali oleh adanya proses kondrifikasi (Carlson, 1988). Proses kondrifikasi *sternum* ini terjadi paling akhir di antara komponen skeleton *aksial* yang lain. Hal ini kemungkinan karena *sternum* merupakan turunan dari *cingulum pectoralis* atau mungkin juga merupakan pengga-bungan bagian *ventral* antara *costae* kanan dan kiri. Proses osifikasinya terjadi pada hari ke-16 kebuntingan.

Hasil analisis ANAVA menunjukkan adanya beda nyata ($P>0,05$) antara kelompok kontrol, kelompok plasebo dan kelompok perlakuan. Jumlah rata-rata tulang *sternum* antara kelompok kontrol, plasebo dan perlakuan dosis 0,02 mg/20g bb adalah 6 ruas, yang menandakan *sternum* telah

mengalami osifikasi sempurna. Pengaruh morfin terhadap proses osifikasi *sternum* baru mulai terlihat pada kelompok perlakuan dosis 0,05 mg/20g bb yang rata-rata berjumlah 5,89 ruas. Jumlah ini menurun menjadi rata-rata 5,80 ruas pada kelompok perlakuan dosis 0,13 mg/20g bb. Jadi dapat dikatakan bahwa pada dosis tersebut morfin mempengaruhi proses osifikasi *sternum*.

d. *Vertebrae Caudalis.*

Dari Tabel 2 dapat dilihat bahwa semakin besar dosis morfin yang diberikan pada kelompok perlakuan, maka jumlah ruas *vertebrae caudalis* cenderung menurun.

Analisis statistik ANAVA menunjukkan adanya perbedaan yang sangat bermakna ($P<0,01$) antara kelompok kontrol, plasebo dan kelompok perlakuan. Uji DMRT memberikan petunjuk bahwa pada dosis terendah (0,02 mg/20g bb) morfin sudah memberikan pengaruh nyata terhadap proses osifikasi *vertebrae caudalis*. Akan tetapi antar perlakuan itu sendiri atau dengan makin meningkatnya dosis pemberian morfin tidak terdapat beda nyata.

KESIMPULAN.

Analisis data dan pembahasan yang telah dilakukan dari pengamatan dapat disimpulkan bahwa Morfin yang diberikan pada induk mencit bunting selama masa organogenesis menyebabkan hambatan pertumbuhan dan perkembangan skeleton fetus yaitu terhambatnya proses osifikasi pada komponen tulang penyusun *cranium*, *sternum*, *metacarpalia*, *metatarsalia* dan *vertebrae caudalis* dan semakin besar konsentrasi morfin yang diberikan, pertumbuhan dan perkembangan skeleton fetus makin terhambat.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, D. & D.M. Conning, 1988, *Experimental Toxicology (The Basic Principles)*, Royal Society of Chemistry, London. pp. 221-236.
- 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.
- Hawari, D., 1998, Angka Kesakitan dan Kematian Penderita Ketergantungan Narkotika jenis Opiat (Heroin), Fakultas Kedokteran UI, Jakarta, hal. 1-2.
- Hawari, D., 2000, Penyalahgunaan dan Ketergantungan NAZA (Narkotika, Alkohol dan Zat Aditif), Fakultas Kedokteran UI, Gaya Baru, Jakarta, hal. 1-2, 42-51.
- Inouye, M., 1976, *Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian blue- Alizarin Red's*, *Journal of Congenital Anomali* 16 : 171-173
- Loomis, T.A., 1978, *Essensial of Toxicology*, 3rd ed., Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 195-237.
- Mandagi, J., M. Wresniwiro & A.H. Sumarna, 1996, *Penanggulangan Bahaya Narkotika dan Psikotropika*, Bina Dharma Pemuda Printing, Jakarta, hal. 31 – 53.
- 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.

- Mutschler, E., 1991, *Dinamika Obat (Farmakologi dan Toksikologi)*, Penerbit ITB Bandung, hal. 82 – 36, 746 – 753.
- Nuhriawangsa, I., 1990, *Pemakaian Psikofarmaka (dalam Pemakaian Obat pada Kehamilan)*, Laboratorium Farmakologi Klinik, Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta, hal. 119-132.
- Santosa, B., 1990, *Masalah Pemakaian Obat pada Kehamilan*, Laboratorium Farmakologi Klinik, Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta, hal. 1-15.
- Shahib, N., 1989, *Ringkasan Biokimia Hormon*, Elstar offset, Bandung, hal.5-7.
- Tjay, T.H., & K. Rahardja, 1979, *Obat-obatan Penting (Khasiat dan Penggunaannya)*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, hal.200-215, 216-218, 250-255.
- Tuchmann-Duplessis, 1975, *Drugs Effects on The Fetus*, 1st ed., ADIS Press, New York-London-Hongkong- Mexico-Sydney-Auckland, pp. 10 – 20, 30 – 40.
- Wilson, J.G., 1973, *Environment and Birth Defects*, Academic Press, New York, San Fransisco, London, pp. 92-94.