

**EFEK DOKSISIKLIN SELAMA MASA ORGANOGENESIS  
TERHADAP STRUKTUR HISTOLOGI KARTILAGO EPIFISIALIS  
FEMUR FETUS MENCIT\***

**Heri Budi Santoso**

**Evi Mintowati Kuntorini**

Program Studi Biologi  
FMIPA Universitas Lambung Mangkurat  
Jl A. Yani Km 36 Banjarbaru, Kalimantan Selatan

**ABSTRAK**

Penelitian bertujuan mengetahui pengaruh pemberian doksisisiklin secara oral pada induk mencit bunting pada masa organogenesis terhadap gambaran histologi kartilago epifisialis femur fetus. Digunakan 40 mencit betina galur DDY yang belum pernah bunting, memiliki siklus estrus teratur, berat badan 25 g yang dikelompokkan menjadi 4 kelompok secara acak. Kelompok I (kontrol) diberi 0,5 ml akuades, berturut-turut kelompok II, III, dan IV diberi doksisisiklin dosis 26, 52, dan 104 mg/kg bb/hari. Pemberian dilakukan secara oral mulai kebuntingan hari ke 6 sampai hari ke 15 (masa organogenesis). Pengamatan dilakukan pada kebuntingan hari ke 18 dengan bedah sesar untuk mengambil fetus dari uterus. Preparat kartilago epifisialis femur fetus dibuat dengan metode paraffin dan pewarnaan Hematoksilin-Eosin. Tebal lapisan kondrosit dalam setiap zona kartilago epifisialis femur fetus dianalisis dengan Anova dan dilanjutkan uji DMRT. Data kerusakan kondrosit pada jaringan kartilago epifisialis femur fetus mencit dianalisis secara deskriptif.

Ditemukan bahwa doksisisiklin 104 mg/kg bb/hari menyebabkan perubahan lapisan kondrosit pada zona proliferasi, yaitu letak kondrosit saling berjauhan, tersusun tidak beraturan dalam masing-masing lajur, dan tidak membentuk deretan kumpulan sel yang sejajar dengan sumbu panjang tulang. Doksisisiklin juga menyebabkan menipisnya zona proliferasi, zona maturasi dan zona kartilago yang mengalami mineralisasi seiring dengan meningkatnya dosis.

Kata kunci: doksisisiklin; kartilago epifisialis femur

---

\* Telah dipresentasikan dalam Seminar PPD Forum HEDS 03-04 September 2003 di Universitas Sumatera Utara, Medan.

## **PENDAHULUAN**

Wanita hamil terkadang harus mengonsumsi antibiotik, yang salah satunya adalah doksisisiklin. Doksisisiklin adalah antibiotik golongan tetrasiklin. Antibiotik ini berpotensi sebagai agensia teratogen karena dapat dengan mudah melewati sawar plasenta, sehingga banyak terakumulasi dalam organ fetus seperti limpa, ginjal, hati, sumsum tulang, tulang, dentin, dan email gigi yang sedang mengalami kalsifikasi, pada tempat osifikasi, tempat pertumbuhan dalam epifisis dan diafisis (Goodman & Gillman, 1975; Levy dkk., 1980). Akumulasi doksisisiklin dalam beberapa organ tersebut, khususnya organ yang sedang mengalami kalsifikasi akan mengakibatkan kelainan perkembangan pada fetus. Hal ini disebabkan antara lain oleh karena fetus belum mempunyai enzim yang dapat memetabolisir doksisisiklin secara sempurna.

Penelitian teratologis membuktikan bahwa antibiotik golongan tetrasiklin dapat menyebabkan warna gigi menjadi kuning tetap bila diberikan selama kehamilan dan pada anak usia di bawah 8 tahun, karena membentuk kompleks yang tidak terpulihkan dengan ion Ca pada struktur gigi (Siswandono & Sukarjo, 1995). Penelitian dengan tikus, tetrasiklin mengakibatkan terjadinya celah palatum, hipoplasia mandibula, pertumbuhan tungkai yang lebih pendek, dan sindaktili (Woolam, 1967).

Penelitian pada tingkat kultur sel dan kultur organ, tetrasiklin menghambat biosintesis kolagen (Halme dkk., 1969), menghambat proses mineralisasi secara *in vitro* pada tulang embrio (Kaitila dkk., 1971), dan menghambat proses osteogenesis serta menyebabkan kecacatan pada jaringan tulang (Shapiro dkk., 1977; Levy dkk., 1980). Namun, mekanisme dan gambaran histologis penghambatan osteogenesis dan proses kalsifikasi pada tulang embrio akibat doksisisiklin belum dikaji secara tuntas.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji efek pemberian doksisisiklin secara oral pada induk mencit bunting selama masa organogenesis terhadap gambaran atau struktur histologis kartilago epifisialis femur fetus.

## **BAHAN DAN METODE**

Penelitian ini menggunakan 40 ekor mencit betina galur DDY, belum pernah bunting, memiliki siklus estrus teratur, dan berat 25 g. Sebelum penelitian mencit diadaptasikan selama 2 minggu. Perkawinan mencit betina yang sedang estrus dengan mencit jantan dilakukan sore hari dan ditempatkan pada kandang yang sama, dengan perbandingan 1 jantan : 4 betina. Apabila pada keesokan harinya ditemukan sumbat vagina maka pada hari itu ditentukan sebagai kebuntingan hari ke 1 (Kaufmann, 1992).

Doksisisiklin diberikan dalam dosis tunggal. Penentuan dosis berdasarkan dosis untuk manusia berat badan 70 kg dikonversikan kepada mencit berat badan 20 g menggunakan tabel konversi Laurence-Bacharach dengan faktor konversi 0,0026. Dosis terapi doksisisiklin secara oral adalah 100-200 mg/hari, maka teratogenisitas diperkirakan terjadi bila diberikan pada dosis 400 mg/hari. Konversi dosis pada mencit =  $0,0026 \times 400 \text{ mg/hari} = 1,04 \text{ mg/20g bb/hari} = 52 \text{ mg/kg bb/hari}$ . Berdasarkan dosis tersebut, ditentukan dosis perlakuan, yaitu 26, 52, dan 104 mg/kg bb/hari. Berdasarkan angka konversi tersebut diperoleh dosis (200-800) mg/hari pada manusia menjadi (26-104) mg/hari untuk mencit.

Dosis doksisisiklin/hari per kelompok perlakuan adalah sebagai berikut.

- Kelompok I (kontrol) : 0,5 ml akuades
- Kelompok II : 26 mg doksisisiklin/kg bb/hari
- Kelompok III : 52 mg doksisisiklin/kg bb/hari
- Kelompok IV : 104 mg doksisisiklin/kg bb/hari

Perlakuan diberikan selama masa organogenesis, yaitu mulai kebuntingan hari ke 6 sampai dengan kebuntingan hari ke 15. Pemberian dilakukan secara oral dengan menggunakan spuit injeksi 1 cc.

Pada kebuntingan hari ke-18, fetus dikeluarkan dari uterus dengan pembedahan sesar. Dari fetus yang terkumpul diambil femur tungkai belakang sebelah kanan secara amputasi dengan pisau tajam. Sediaan histologi kartilago

epifisialis femur mencit dibuat secara membujur dengan metode paraffin dan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (Suntoro, 1983).

Pengamatan terhadap sediaan penampang membujur kartilago epifisialis femur mencakup zona cadangan kondrosit, zona proliferasi, zona maturasi, dan zona kartilago yang mengalami mineralisasi. Dari tiap sediaan diambil acak 5 lajur yang paling jelas gambaran sel-sel kondrositnya pada masing-masing zona, kemudian diukur tebal lapisan sel pada masing-masing zona dengan mikrometer. Secara deskriptif kualitatif, juga diamati struktur sel kondrosit terhadap ada tidaknya kerusakan sel pada masing-masing zona.

Data rerata tebal lapisan setiap zona dalam kartilago epifisialis femur fetus dianalisis dengan Anova dan dilanjutkan dengan Duncan Multiple Range Test (Gaspersz, 1991). Data kerusakan sel kondrosit dan jaringan kartilago epifisialis femur fetus mencit dianalisis secara deskriptif kualitatif.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Penelitian ini menggunakan kartilago epifisialis femur fetus sebagai model terhadap pengamatan osteogenesis endokondralis tulang panjang. Pengamatan meliputi tebal lapisan sel pada zona cadangan kondrosit, zona proliferasi, zona maturasi, dan zona kartilago yang mengalami mineralisasi.

### **Zona cadangan kondrosit**

Hasil pengamatan deskriptif mikroskopis terhadap lapisan kondrosit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan menunjukkan adanya kartilago hialin yang terdiri dari kondrosit berbentuk bundar atau ovoid. Kondrosit dalam zona ini dalam keadaan istirahat, tidak mengalami perubahan morfologi.

Tebal lapisan kondrosit dalam zona cadangan kondrosit kartilago epifisialis femur menunjukkan kelompok kontrol memiliki ketebalan rata-rata

459,00 $\mu$ m, sedangkan pada kelompok perlakuan II, III, dan IV berturut-turut memiliki ketebalan rata-rata 458,01 $\mu$ m, 457,80 $\mu$ m, dan 456,90 $\mu$ m (Tabel 1).

Anava menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna ( $p > 0,05$ ) antara ketebalan zona cadangan kondrosit kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Ketebalan lapisan kondrosit yang sama pada zona ini diduga dikarenakan doksisisiklin tidak mengintervensi sel yang tidak sedang membelah.

Tabel 1. Rerata ketebalan zona cadangan kondrosit kartilago epifisialis femur fetus mencit dari induk setelah diberi doksisisiklin secara oral

Kelompok	Dosis (mg/kg bb/hari)	Ketebalan zona cadangan kondrosit ( $\mu$ m)	Panjang femur ( $\mu$ m)
I	0	459,00 <sup>a</sup>	7400 <sup>a</sup>
II	26	458,01 <sup>a</sup>	7390 <sup>a</sup>
III	52	457,80 <sup>a</sup>	7160 <sup>b</sup>
IV	104	456,90 <sup>a</sup>	7000 <sup>c</sup>

Huruf berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan bermakna

### Zona proliferasi

Ketebalan rata-rata lapisan kondrosit dalam zona proliferasi pada kelompok kontrol adalah 725,01 $\mu$ m, sedangkan pada kelompok II, III, dan IV berturut-turut 722,50 $\mu$ m, 680 $\mu$ m, dan 600 $\mu$ m (Tabel 2).

Anava menunjukkan perbedaan yang bermakna antar perlakuan. Uji lanjutan dengan DMRT menunjukkan perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) antara kelompok perlakuan IV dengan kelompok II dan I; kelompok III dengan kelompok II dan I, sedangkan antar kelompok IV dan kelompok III serta kelompok II dan I berbeda tidak nyata.

Tabel 2. Rerata ketebalan zona proliferasi kartilago epifisialis femur fetus mencit dari induk setelah diberi doksisisiklin secara oral

Kelompok	Dosis (mg/kg bb/hari)	Ketebalan zona proliferasi (µm)	Panjang femur (µm)
I	0	725,01 <sup>a</sup>	7400 <sup>a</sup>
II	26	722,50 <sup>a</sup>	7390 <sup>a</sup>
III	52	680,00 <sup>b</sup>	7160 <sup>b</sup>
IV	104	600,00 <sup>b</sup>	7000 <sup>c</sup>

Huruf berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan bermakna

Pengamatan mikroskopis terhadap ketebalan zona proliferasi menunjukkan adanya penurunan ketebalan lapisan sel sejalan dengan meningkatnya dosis doksisisiklin. Dibandingkan dengan kontrol, pada kelompok perlakuan IV nampak perubahan gambaran lapisan sel, yaitu kondrosit nampak tersusun tidak beraturan dalam masing-masing lajur. Kondrosit saling berjauhan dan tidak membentuk deretan kumpulan kondrosit yang sejajar dengan sumbu panjang tulang. Selain itu, ditemukan sebagian kondrosit mengalami degenerasi.

Degenerasi kondrosit diduga disebabkan oleh intervensi doksisisiklin pada proses mitosis yang terjadi pada zona proliferasi, yaitu menyebabkan perubahan integritas DNA dan menghambat sintesis protein (Bennet dkk., 1967). Akibatnya menurut Wilson (1973) akan terwujud dalam bentuk kematian/degenerasi sel, kegagalan interaksi sel, dan hambatan proliferasi. Hasil penelitian ini didukung oleh Levy dkk. (1980) yang menyatakan bahwa tetrasiklin menyebabkan beberapa kondrosit pada zona proliferasi dan zona maturasi kartilago epifisialis tikus mengalami degenerasi serta terjadi pembengkakan pada mitokondria dan retikulum endoplasma.

Kondrosit pada zona proliferasi menurut Ham & Cormack (1979) mengalami mitosis secara aktif dan berfungsi sebagai tempat pembentukan sel-sel baru untuk menggantikan sel-sel yang hipertrofi dan degenerasi pada bagian yang berbatasan dengan diafisis. Jika doksisisiklin mempunyai kemampuan merusak integritas DNA dan menghambat sintesis protein maka selanjutnya

dapat menghambat proliferasi sel pada zona ini sehingga akan mempengaruhi kondrosit pada zona-zona selanjutnya dalam kartilago epifisialis.

### Zona maturasi

Hasil pengamatan pada zona maturasi, baik pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan menunjukkan adanya kondrosit yang hipertrofi, yaitu kondrosit tidak lagi membelah diri, tetapi bertambah besar dan bervakuola.

Hasil pengamatan terhadap tebal lapisan kondrosit pada zona maturasi menunjukkan pada kelompok kontrol memiliki ketebalan rata-rata 299,01 $\mu$ m, sedangkan pada kelompok perlakuan II, III, IV berturut-turut memiliki ketebalan rata-rata 295,50 $\mu$ m, 220,00 $\mu$ m, dan 165,00 $\mu$ m (Tabel 3).

Tabel 3. Rerata ketebalan zona maturasi kartilago epifisialis femur fetus mencit dari induk setelah diberi doksisisiklin secara oral

Kelompok	Dosis (mg/kg bb/hari)	Ketebalan zona maturasi ( $\mu$ m)	Panjang femur ( $\mu$ m)
I	0	299,01 <sup>a</sup>	7400 <sup>a</sup>
II	26	295,50 <sup>a</sup>	7390 <sup>a</sup>
III	52	220,00 <sup>b</sup>	7160 <sup>b</sup>
IV	104	165,00 <sup>c</sup>	7000 <sup>c</sup>

Huruf berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan bermakna

Anava menunjukkan ada perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) antara ketebalan zona maturasi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Perbedaan ini karena doksisisiklin menghambat mitosis kondrosit pada zona proliferasi sehingga zona-zona di bawahnya akan semakin tipis ketebalannya. Ham & Cormack (1979) menyatakan bahwa kondrosit hipertrofi akan selalu diganti oleh kondrosit yang baru sebagai hasil proliferasi kondrosit pada zona proliferasi. Jika proliferasi kondrosit dalam zona proliferasi dihambat oleh

doksisiklin maka kondrosit yang hipertrofi dalam zona maturasi juga akan menipis jika dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Peranan kondrosit pada zona maturasi penting dalam proses kalsifikasi. Ornoy & Langer (1978) menyatakan bahwa kondrosit pada zona ini akan mengakumulasi ion  $Ca^{++}$  dalam mitokondrianya, yang selanjutnya akan membentuk vesikula matrik. Vesikula matrik akan saling beragregasi membentuk globula yang selanjutnya terbentuk kristal hidroksiapatit pada septa longitudinal zona maturasi. Kristal ini sebagai bahan untuk proses mineralisasi dan kalsifikasi tulang. Ham & Cormack (1978) menambahkan bahwa kondrosit pada zona ini juga akan menghasilkan enzim fosfatase yang penting untuk mempercepat proses kalsifikasi bahan ekstraseluler seperti hidroksiapatit.

Levy dkk. (1980) menemukan bahwa tetrasiklin dosis tinggi menyebabkan degenerasi kondrosit pada zona proliferasi dan zona maturasi, dan menyebabkan terhambatnya akumulasi ion  $Ca^{++}$  secara intraseluler dan ekstraseluler.

### **Zona kartilago yang mengalami mineralisasi**

Pengamatan pada zona kartilago yang mengalami mineralisasi pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan menunjukkan adanya satu atau beberapa lapisan kondrosit yang hipertrofi dan mati. Zona ini tipis dan berbatasan langsung dengan diafisis. Matrik kartilago dalam zona ini mulai mengalami kalsifikasi dengan adanya pengendapan hidroksiapatit sehingga tampak septa tipis atau sekat pembatas di sekeliling kondrosit yang hipertrofi dan mati.

Hasil pengamatan terhadap tebal lapisan kartilago yang mengalami mineralisasi disajikan pada Tabel 4.

Analisis statistik dengan anova menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ) antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.



Tabel 4. Rerata ketebalan zona kartilago yang mengalami mineralisasi kartilago epifisialis femur fetus mencit dari induk setelah diberi doksisisiklin secara oral

Kelompok	Dosis (mg/kg bb/hari)	Ketebalan zona kartilago yang mengalami mineralisasi ( $\mu\text{m}$ )	Panjang femur ( $\mu\text{m}$ )
I	0	292,20 <sup>a</sup>	7400 <sup>a</sup>
II	26	292,50 <sup>a</sup>	7390 <sup>a</sup>
III	52	240,00 <sup>b</sup>	7160 <sup>b</sup>
IV	104	233,90 <sup>c</sup>	7000 <sup>c</sup>

Huruf berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan bermakna

Zona cadangan kondrosit, zona proliferasi, zona maturasi, dan zona kartilago yang mengalami mineralisasi dari kartilago epifisialis femur kelompok kontrol dan kelompok perlakuan disajikan pada gambar 1,2,3, dan 4 lampiran 1.

## KESIMPULAN

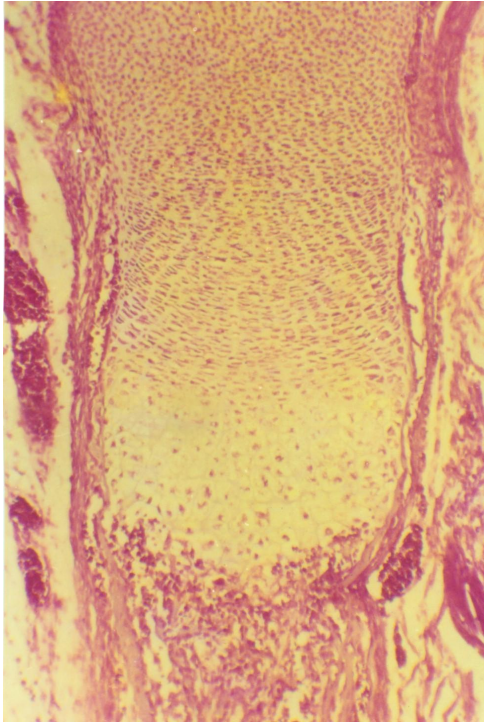
Doksisisiklin dosis 104 mg/kg bb/hari yang diberikan secara oral kepada induk mencit bunting selama masa organogenesis dapat menyebabkan perubahan gambaran lapisan kondrosit pada zona proliferasi, yaitu letak kondrosit saling berjauhan, tersusun tidak beraturan dalam masing-masing lajur, dan tidak membentuk deretan kumpulan-kumpulan sel yang sejajar dengan sumbu panjang tulang. Selain itu, doksisisiklin menyebabkan menipisnya zona proliferasi, zona maturasi, dan zona kartilago yang mengalami mineralisasi sejalan dengan meningkatnya dosis.

## UCAPAN TERIMA KASIH

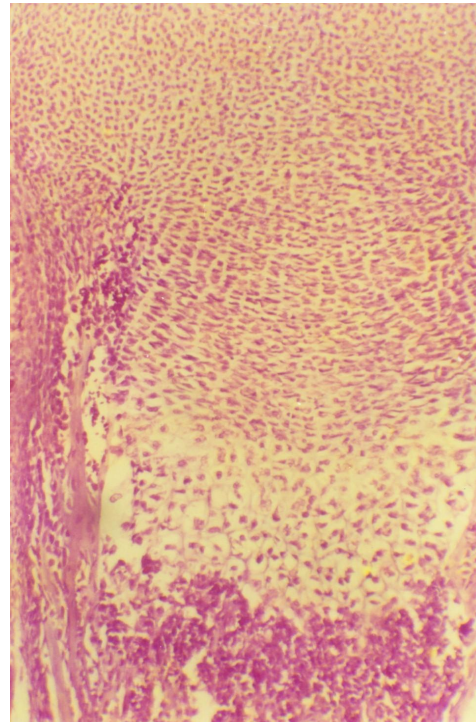
Terima kasih diucapkan kepada Forum HEDS yang telah mendanai penelitian ini dalam tahun anggaran 2002.

## DAFTAR PUSTAKA

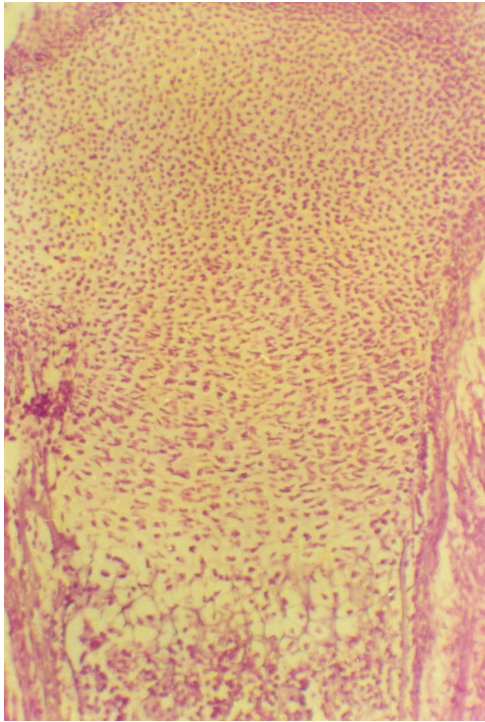
- Bennet JC, Proffit WR, & Norton LA. 1967. Determination of growth inhibitory concentration of tetracycline for bone in organ culture. *Nature. London* 216: 176-177.
- Gaspersz V. 1991. *Teknik analisis dalam penelitian percobaan*. Tarsito. Bandung.
- Goodman LS & Gillman A. 1975. *The pharmacological basic of therapeutics*. Third ed. The Mc Millan Co, New York.
- Halme J, Kivirikko KI, Kaitila I, & Saxen L. 1969. Effect of tetracycline on collagen biosynthesis in cultured embryonic bones. *Biochem.Pharmac.*18:827-836.
- Ham AW & Cormack DH. 1979. *Histology*. 8 th ed. J.B. Lippincot Co, Philadelphia.
- Kaitila I. 1971. The mechanism by which tetracycline hydrochloride inhibits mineralization in vitro. *Biochem. Biophys. Acta* 244: 584-594.
- Kaufmann MH. 1992. *The atlas of mouse development*. Academic Press Limited, London.
- Levy J, Ornoy A, Atkin I. 1980. Influence of tetracycline on the calcification of epiphyseal rat cartilage:transmission & scanning electron microscopic studies. *Acta Anat.*106: 360-369.
- Ornoy A & Langer Y. 1978. SEM observation on the origin & structure of matrix vesicles in epiphyseal cartilage of rats. *Israel J.Med.Scis* 14: 745-752.
- Shapiro IM, Burke AC, & Lee MH.1977. Effect of tetracycline on chondrocyte mitochondria. An explanation of tetracycline induced defects of mineralized tissues. *Biochem.Pharmac.*26:595-600.
- Siswandono & Soekarjo B. 1995. *Kimia Medisinal*. Airlangga University Press, Surabaya.
- Suntoro SH. 1983. *Metode pewarnaan (Histologi & Histokimia)*. Penerbit Bhratara Karya Aksara, Jakarta.
- Wilson JG. 1973. *Enviroment & birth defects*. Academic Press Inc, London.
- Woolam DHM. 1967. *Advances in teratology*. Vol 2. Logos Press, New York.



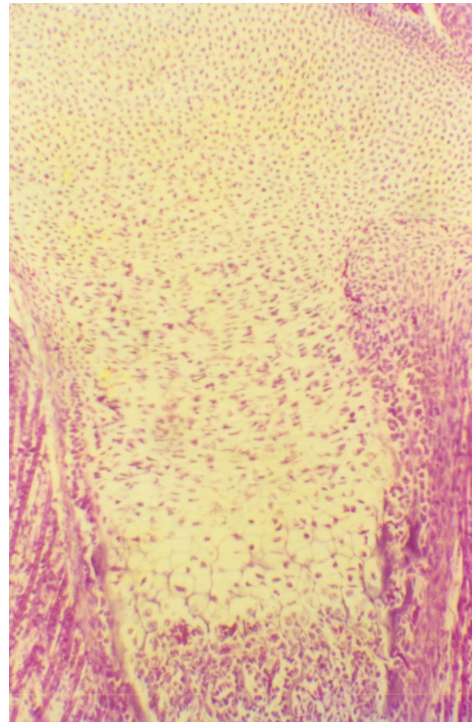
A. Perlakuan I (kontrol) : 0,5 ml akuades



B. Perlakuan II: 26 mg doksisisiklin/kg  
bb/hari



C. Perlakuan III: 52 mg doksisisiklin/kg bb/hari



D. Perlakuan IV: 104 mg doksisisiklin/kg bb/hari. Kondrosit pada zona proliferasi mengalami nekrosis & tersusun tidak beraturan.