

## **Pengaruh Irama Sirkadian Terhadap Jumlah Osteoklas Tulang Alveolar Marmut (*Cavia Cobaya*)**

*(The Influence Of Circadian Rhythm Towards The Number Of Osteoclast Formation On Marmots' Alveolar Bone)*

**Nik Andriena\*, Retno Indrawati R\*\*, Wisnu Setyari J\*\***

□ Mahasiswa Strata 1 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga

\*\*Departemen Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga  
Surabaya-Indonesia.

### **ABSTRACT**

**Background:** Light is one of the external stimuli that played an important role in mammal's circadian rhythm. The light-dark cycle in the environment could affect the secretion of melatonin from the pineal gland. Moreover, change of melatonin secretion could affect the bone resorption which is rolled by the numbers of osteoclast. **Purpose:** The aim of this study was to find the effect of circadian rhythm towards the number of osteoclast on marmots' alveolar bone. **Methods:** 24 marmots (*Cavia cobaya*) were divided into three groups. Group I (n=8) were exposed to constant light continuously; Group II or control group (n=8) were exposed to 12 hours light alternate with 12 hours dark environment and the third group, Group III (n=8) were placed in constant continuous darkness. Tooth separators were inserted in the marmots' upper teeth for 7 days. At the end of 21 days, the marmots were sacrificed and the maxillary alveolar bones were extracted for the microscopic examination using 400 x magnifications to look for the presence of osteoclast number. **Results:** There was osteoclast formation in one marmot in Group I (constant continuous light) but not in the other groups. **Conclusion:** The presence of light in the circadian rhythm does not influence the osteoclast formation in the marmots' alveolar bone.

**Keywords:** Melatonin, Circadian Rhythm, Osteoclast

**Latar Belakang:** Irama sirkadian (*circadian rhythm*) adalah proses biokimiawi, perilaku, atau fisiologis yang sesuai dengan beredarnya waktu dalam siklus 24 jam. Irama sirkadian mengontrol perubahan level hormon dan neurokimia yang mengontrol tidur, aktivitas, dan mood/suasana hati. Salah satu hormon yang dipengaruhi oleh irama sirkadian adalah melatonin. Kandungan melatonin dalam darah meningkat pada waktu malam mengakibatkan produksi reseptor *RANK-ligand* yang berdiferensiasi pada *hemopoetik cell* menurun. Penurunan fungsi dari reseptor ini menyebabkan jumlah osteoklas berkurang dan seterusnya proses resorpsi tulang menurun. Osteoklas adalah sel yang meresorpsi tulang dan cenderung berkembang serta membentuk suatu multinukleasi tetapi juga dapat membentuk mononuklear. **Tujuan:** Untuk mengetahui efek irama sirkadian terhadap jumlah osteoklas tulang alveolar *Cavia Cobaya*. **Metode:** Studi ini dilakukan pada 24 hewan coba (*Cavia Cobaya*) yang dibagi menjadi 3 kelompok. Kelompok I (n=8) yang terkena cahaya konstan terus menerus, kelompok II atau kelompok kontrol (n=8) terkena 12 jam cahaya bergantian dengan 12 jam kondisi gelap dan kelompok ketiga, kelompok III (n = 8) ditempatkan dalam kegelapan terus menerus konstan Separator gigi dipasang pada gigi atas marmut selama 7 hari. Pada akhir 21 hari, marmut dikorbankan dan tulang alveolar rahang atas diekstraksi untuk pemeriksaan mikroskopis menggunakan perbesaran 400 x untuk mencari keberadaan jumlah osteoklas. **Hasil:** Terdapat satu osteoklas pada kelompok I (cahaya kontinyu konstan) tetapi tidak ada osteoklas pada kelompok lain. **Kesimpulan:** irama sirkadian tidak berpengaruh terhadap jumlah pembentukan osteoklas pada marmut.

**Kata Kunci:** Melatonin, irama sirkadian, osteoklas.

## PENDAHULUAN

Irama sirkadian (*circadian rhythm*) adalah proses biokimiawi, perilaku, atau fisiologis yang sesuai dengan beredarnya waktu dalam siklus 24 jam. Irama sirkadian mengontrol perubahan level hormon dan neurokimia yang mengontrol tidur, aktivitas, dan mood/suasana hati. Pusat kontrol irama sirkadian terletak pada bagian ventral anterior hypothalamus.) Irama sirkadian amat peka terhadap rangsang cahaya, disamping faktor-faktor lain yang juga dapat mempengaruhi. Irama sirkadian telah diteliti secara luas pada manusia dari skala reaksi biokimia seperti produksi hormon, hingga pola perilaku seperti pola tidur dan waktu makan. Salah satu hormon yang dipengaruhi oleh irama sirkadian adalah melatonin. Kandungan melatonin dalam darah meningkat pada waktu malam mengakibatkan produksi receptor *RANK-ligand* yang berdiferensiasi pada *hemopoetik cell* menurun. Penurunan fungsi dari reseptor ini menyebabkan jumlah osteoklas berkurang dan seterusnya proses resorpsi tulang menurun. <sup>1, 2</sup>

Osteoklas adalah sel yang meresorpsi tulang dan cenderung berkembang serta membantu ke suatu multinukleasi tetapi juga dapat membentuk mononuklear. Multinukleasi osteoklas dibentuk oleh fusi dari prekursor sel yang sama dengan peredaran monosit. Pada saat resorpsi tulang akan terlihat adanya *ruffled border*. Resorpsi tulang terjadi dalam dua tahap, antara lain hilangnya mineral dari *narrow zone* pada tepi tulang, lalu terjadi disintegrasi organik matrik tulang. Osteoklas terlihat saat terjadi demineralisasi dan disagregasi dari organik matrik, pada akhirnya memungkinkan terjadi sekresi enzim. <sup>3</sup>

Keberadaan osteoklas pada permukaan periodontal dari tulang alveolar mengindikasikan terjadinya resorpsi aktif dan berada pada daerah itu sampai jaringan sekitar mengalami kerusakan. Osteoklas pada keadaan normal terlihat di ligamen periodontal, yang berperan untuk *remodelling* tulang. <sup>4</sup>

Tulang mengalami proses resorpsi dan formasi secara terus menerus yang disebut sebagai *remodelling* tulang. Proses *remodelling* tulang merupakan proses mengganti tulang yang sudah tua atau rusak, diawali dengan resorpsi atau penyerapan tulang oleh osteoklas dan diikuti oleh formasi atau pembentukan tulang oleh osteoblas. <sup>5</sup>

Prevalensi gangguan tidur yang cukup tinggi, yang mencapai lebih dari 50%, berpotensi untuk menyebabkan berbagai gangguan irama sirkadian. Gangguan irama sirkadian tersebut menyebabkan berbagai masalah pada tubuh manusia antara lain gangguan sekresi melatonin yang berpengaruh pada proses *remodelling* tulang, termasuk tulang alveolar. <sup>6</sup>

Dalam proses pembentukan tulang, hal yang sangat penting adalah koordinasi yang baik antara osteoklas dan osteoblas. Selama sistem ini berada dalam keseimbangan, pembentukan dan penghancuran tulang akan selalu seimbang. Proses *remodelling* diawali dengan pengaktifan osteoklast oleh sitokin tertentu. Sitokin yang berasal dari monosit dan yang berasal sel osteoblast (sel induk) sangat berperan pada aktivitas osteoklas. <sup>3</sup>

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek irama sirkadian terhadap jumlah osteoklas tulang alveolar *Cavia Cobaya*.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini bersifat jenis penelitian eksperimental laboratories yang dilakukan perlakuan pada 24 hewan coba *cavia cobaya*, jantan sehat, umur 2-3 bulan, berat badan antara 250-300 gram. Bahan yang digunakan untuk penelitian ini di antaranya: glass objek, mikroskop, Larutan buffer formalin 10%, EDTA, Larutan alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100%, Larutan Xylol, Larutan paraffin, Hematoxylin Eosin.

Hewan coba yang telah diberikan perlakuan, pemasangan alat separator dan perlakuan irama sirkadian selama 21 hari Dimatikan dan diambil tulang alveolarnya dengan menggunakan scalpel kemudian Maksila difikasasi dengan cara dimasukkan ke dalam larutan formalin buffer 10%, dilakukan dikalsifikasi dengan menggunakan EDTA (asam lemah) selama kurang lebih 1 bulan, Dilakukan proses dehidrasi dengan menggunakan alkohol. *Clearing* dengan memasukkan bahan yang telah didehidrasi tersebut ke dalam larutan xylol selama 2 x 30 menit. *Impregnasi* dengan larutan parafin pada suhu 56oC selama 2x30 menit, pembuatan blok (*Embedding*) kemudian dilakukan pemotongan tipis memanjang dengan ketebalan 6 mikro. Hasil sayatan kemudian dipindahkan ke dalam *waterbath* agar dapat mengembang dengan baik. Setelah itu dipindahkan ke *object glass* yang telah diberi label. Jaringan tersebut kemudian ditutup dengan *cover glass*. Sediaan jaringan dibiarkan kering dan dimasukkan ke dalam *oven* pada suhu 58-60oC selama 30 menit. Dilakukan pengecatan dengan *Hematoxylin Eosin* dengan metode progresif. Penghitungan jumlah osteoklas yang terdapat pada sediaan dengan pembesaran 400x menggunakan mikroskop.

## HASIL

Hasil pengamatan dari penelitian ini hanya didapatkan 1 osteoklas pada 1 hewan coba kelompok 1 sehingga tidak dapat dilakukan uji statistik .

Tabel 1: Jumlah Penghitungan Osteoklas

Kelompok n = 8	Jumlah Osteoklas
I(24 jam terang)	1
II(12jam terang 12jam gelap)	0
III(24 jam gelap)	0

## PEMBAHASAN

Osteoklas merupakan sel yang meresorpsi tulang dan cenderung berkembang serta membentuk suatu multinukleasi tetapi juga dapat membentuk mono nukleus. Jumlah osteoklas dipengaruhi oleh irama sirkadian manakala irama sirkadian dikontrol oleh *suprachiasmatic nucleus* (SCN) dan sangat peka terhadap rangsangan cahaya. 7

Rangsangan cahaya dapat mempengaruhi produksi hormon melatonin oleh kelenjar pine al. Perubahan jumlah produksi melatonin dapat mempengaruhi jumlah osteoklas dalam tubuh. 8

Tulang mengalami proses resorpsi dan formasi secara terus menerus yang disebut sebagai *remodelling* tulang. Proses *remodelling* tulang merupakan proses mengganti tulang yang sudah tua atau rusak, diawali dengan resorpsi atau penyerapan tulang oleh osteoklas dan diikuti oleh formasi atau pembentukan tulang oleh osteoblas. Keberadaan osteoklas pada permukaan periodontal dari tulang alveolar mengindikasikan terjadinya resorpsi aktif dan akan berada pada daerah itu saja sampai jaringan sekitar mengalami kerusakan. Osteoklas pada keadaan normal terlihat di ligamen periodontal, yang berperan sebagai *remodelling* tulang. 5

Jaringan tulang mengalami proses *remodelling* yang berlangsung secara terus menerus dimana terjadi proses resorpsi dan formasi tulang yang berlangsung secara bersamaan. Proses *remodelling* ini sangat diperlukan tulang untuk beradaptasi terhadap gangguan mekanik dan perubahan fisiologi tulang sehingga susunan matriks tulang menjadi kuat. Integritas massa tulang ditentukan oleh keseimbangan antara proses formasi dan resorpsi tulang. Perubahan dalam proses *remodelling* tulang akan mengakibatkan terjadinya ketidakseimbangan antara proses penghancuran tulang dan pembentukan tulang, proses ini merupakan dasar terjadinya hampir semua gangguan metabolisme tulang dan osteoporosis. Proses *remodelling* tulang merupakan hasil kerja dari dua jenis sel yang bekerja secara berlawanan memegang peranan penting terhadap proses ini yaitu sel osteoblas yang bekerja membentuk matriks tulang baru dan sel osteoklas yang menghancurkan matriks tulang. 9

Pada penelitian ini dilakukan penghitungan osteoklas pada tulang alveolar maksila yang tampak pada lapang pandang dengan pembesaran 400x menggunakan mikroskop cahaya. Hewan coba marmut yang dipakai adalah marmut (*Cavia Cobaya*) disebabkan oleh struktur anatomi marmut yang memungkinkan untuk pemasangan separator. Pemasangan separator bertujuan agar terjadi trauma dari rangsangan mekanis serta menumpuknya makanan di daerah tersebut sehingga plak dapat mengiritasi gingival dan terjadilah gingivitis yang dapat diamati dengan adanya perubahan warna mukosa rongga mulut menjadi kemerahan, mudah berdarah dan terjadinya pembengkakan pada gingiva. Dengan adanya trauma dari pemasangan separator ini, peneliti ingin membandingkan jumlah osteoklas pada setiap kelompok percobaan yang juga mendapat perlakuan irama sirkadian

Pada keadaan inflamasi akut, tubuh segera memberi respons yang berlangsung beberapa jam atau hari. Pemasangan separator dilakukan selama 7 hari bertujuan untuk memberikan rangsangan mekanis sehingga terjadi inflamasi. Pada keadaan ini terjadi penampang pembuluh darah sehingga aliran darah meningkat, peningkatan permeabilitas vaskuler disertai keluarnya protein plasma dan leukosit jaringan (eksudasi). Meskipun jenis pengaruh jejas dapat bermacam-macam, mediator yang dilepaskan tetap sama dan reaksi yang terjadi sama. 10 Hal ini dapat dilihat secara klinis terjadinya keradangan pada gingival di daerah gigi yang diberi separator.

Pemberian gaya mekanis akan menyebabkan daerah sekitar gigi dibagi menjadi 2 yaitu daerah regangan dan daerah tekanan. Pada daerah tekanan gaya mekanis akan merangsang osteoklas untuk melakukan resorpsi tulang alveolar. Setelah proses resorpsi selesai, osteoklas akan mengalami

apoptosis sehingga proses resorpsi berhenti. Pada daerah regangan, osteoblas teraktivasi untuk melakukan aktivitas pembentukan tulang baru (reposisi). Jika gaya memadai maka proses resorpsi dan aposisi tulang alveolar ini dalam seimbang . 11

Hasil dari penelitian ini, didapati pada hewan percobaan yang telah diberi perlakuan irama sirkadian 24 jam cahaya terang, kelompok I dari 8 hewan coba hanya ada satu menunjukkan hasil adanya osteoklas setelah dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 x tetapi merupakan osteoklas yang inaktif karena pembuluh darah hewan coba yang telah diberikan perlakuan mungkin mengalami kerusakan waktu memakai separator sehingga menyebabkan aliran darah kurang ke daerah gingival gigi. Osteoklas banyak timbul pada waktu siang karena kadar melatonin pada keadaan terang rendah sehingga proses resorpsi meningkat pada waktu siang banyak aktivitas seharian berlaku seperti makan, minum dan pergerakan. Selain irama sirkadian, hormon estrogen juga merupakan faktor yang mempengaruhi banyaknya osteoklas yang muncul walaupun hal ini tidak dapat dibuktikan pada penelitian ini. Sewaktu kadar estrogen menurun, aktivitas osteoblas berkurang, akibatnya, aktivitas osteoklas akan lebih tinggi untuk menyerap tulang sehingga defisiensi hormon ini juga mengganggu pertumbuhan tulang. Selain itu, Vitamin D dalam jumlah besar meningkatkan kadar kalsium serum dengan meningkatkan penguraian tulang. Dengan demikian, vitamin D dalam jumlah besar tanpa diimbangi kalsium yang kuat dalam makanan akan menyebabkan absorpsi tulang .5

Pada kelompok kedua (II) yaitu hewan percobaan yang telah diberi perlakuan irama sirkadian 12 jam terang dan 12 jam gelap tidak menunjukkan hasil adanya osteoklas setelah dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 400x ini adalah karena irama sirkadian yang diberikan selama 12 jam sahaja dan juga karena aktivitas pada waktu malam kurang dan pasif. Faktor hormonal juga mempengaruhi jumlah pembentukan osteoklas seperti Melatonin. Melatonin menghambat osteoklastogenesis dan aktivitas osteoklas dengan cara mengurangi ekspresi (*Receptor Activator Of Nuclear Factor-Kappa b-Ligand*) RANKL dan meningkatkan OPG (*Osteoprotegerine*) dalam sel osteoblas sehingga terjadi penurunan proses resorpsi tulang dan meningkatnya proses absorpsi tulang. 12

Pada kelompok ketiga (III) yaitu hewan percobaan yang telah diberi perlakuan irama sirkadian 24 jam gelap tidak menunjukkan hasil adanya osteoklas tetapi adanya osteoblas setelah dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Faktor ini disebabkan oleh pengaruh yang sama seperti di kelompok 2 dan dari hormon glukokortikoid. Hormon ini menghambat pembentukan dan aktivitas osteoklas. Faktor hormon Melatonin yang meningkat dalam gelap menjelaskan tidak adanya kemunculan osteoklas pada kelompok ini. Selain itu berkurangnya aktivitas pada waktu gelap. Faktor lain seperti pengaruh hormon glukokortikoid yang menghambat pembentukan dan aktivitas osteoklas juga mungkin berperan walaupun tidak dapat dibuktikan didalam penelitian

Hasil penelitian ini menunjukkan hasil yang berbeda dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Kotaro Miyoshi et al menggunakan 100 ekor tikus Wistar dimana hasil penelitian mereka membuktikan terdapatnya kadar osteoklas yang tinggi pada tulang alveolar kelompok hewan yang berada di bawah cahaya berbanding dengan kelompok hewan yang berada dalam gelap. 13

## DAFTAR PUSTAKA

1. Novi,W; Skripsi Pengaruh Irama Sirkadian Dan Rangsangan Mekanis Terhadap Hitung Jenis Leukosit Pada Marmut. 2011.
2. Fanny, L; Bersahabat dengan Hewan Coba, Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. 2012. Pp: 8-9, 71-97.
3. Orban's; Oral Histology and Embryologi. Elsevier. 1991. Pp : 219 -220.
4. Derek ; Kerja Osteoklas Pada Perombakan Tulang. BIK Biomed, Vol 3, No. 3, Pp : 97-106.
5. Guyton; Textbook of Medical Physiology. *11t hed. Pennsylvania: Elsevier Saunders*.2000. Pp : 429-436,439-440, 1009-1110.
6. Krauchi, K; Circadian Clues to Sleep Onset Mechanism Neuropsychopharmacology , 25, 2001. Pp: 92-96.
7. Reghunanandan, R; Neurotransmitter of the Suprachiasmatic Nuclei. *Journal of Circadian Rhythms* 2006, Vol 4 no 2.
8. Pena; Melatonin, Nature's Most Versatile, *Biological Journal*, 2006. pp 2813-2838.
9. Ardo, Sunariani; Modul Kuliah Universitas Utara Sumatera. 2005.
10. Adde, F; Proses Radang Akut dan Kronik. Perawat Online. 2011 .
11. Muhammad Nurul Amin; Perubahan Rasio Osteoklas dan Osteoblas Dalam Proses Remodeling Tulang Alveolar Marmut ( *Cavia Sp*) Yang Diinduksi Gaya Mekanis Yang Berbeda. *Dental Journal*, Vol 13, No1. 2007. pp.1-6.
12. Hiroki Koyama; *Journal of Orthodontics*. Vo1. 25, 2002. Pp : 101-107.
13. Kotaro,M; Hidei,M; Tooth Movement and Changes in Periodontal Tissue in Response to Orthodontic Force in Rats Vary depending on the time of day the force is applied. University Graduate School of dentistry, Sendai,Japan. 2001. pp. 330 -336.

