

**POTENSI PEMBERIAN EKSTRAK BENGKOANG
(*Pachyrhizus erosus*) TERHADAP EKSPRESI
INTERLEUKIN 6 (IL-6) DAN GAMBARAN
HISTOPATOLOGI TULANG VERTEBRAE
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL MENOPAUSE**

SKRIPSI

Oleh:

ROSSA AYU SONIA

105130107111004



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**POTENSI PEMBERIAN EKSTRAK BENGKOANG
(*Pachyrhizus erosus*) TERHADAP EKSPRESI
INTERLEUKIN 6 (IL-6) DAN GAMBARAN
HISTOPATOLOGI TULANG VERTEBRAE
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL *MENOPAUSE***

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
ROSSA AYU SONIA
105130107111004



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Potensi Pemberian Ekstrak Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap Ekspresi Interleukin 6 (IL – 6) dan Gambaran Histopatologi Tulang Vertebrae pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Menopause

Oleh:
ROSSA AYU SONIA
105130107111004

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada Tanggal 9 Januari 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Prof.Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

Drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P, M.Biotech
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof.Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah
ini:

Nama : Rossa Ayu Sonia

NIM : 105130107111004

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Potensi Pemberian Ekstrak Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*)
terhadap Ekspresi *Interleukin 6* (IL – 6) dan Gambaran
Histopatologi Tulang Vertebrae pada Tikus (*Rattus norvegicus*)
Model *Menopause*

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukri hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala risiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang,

Yang menyatakan,

(Rossa Ayu Sonia)

NIM. 105130107111004

Potensi Pemberian Ekstrak Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap Ekspresi Interleukin 6 (IL – 6) dan Gambaran Histopatologi Tulang Vertebrae pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Menopause

ABSTRAK

Menopause merupakan suatu kondisi dimana terjadi penurunan fungsi ovarium yang akan menyebabkan penurunan produksi hormon estrogen dalam tubuh. Penurunan hormon estrogen ini dapat menimbulkan beberapa gangguan di dalam tubuh, salah satunya adalah osteoporosis. Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) memiliki kandungan senyawa *daidzein* yang memiliki aktivitas estrogenik yang dapat digunakan sebagai terapi osteoporosis pada kondisi *menopause*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi pemberian ekstrak bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) pada hewan model menopause berdasarkan ekspresi IL-6 dan gambaran histopatologi tulang vertebrae. Hewan coba pada penelitian ini adalah tikus betina (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* dengan umur 8-12 minggu, yang dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu: Kelompok kontrol negatif (A), kelompok kontrol positif (B), Kelompok tikus *menopause* yang diberi terapi ekstrak bengkoang dengan dosis 400 mg/kgBB/hari (C), 800 mg/kgBB/hari (D), dan 1200 mg/kgBB/hari (E). Ekspresi IL-6 pada tulang vertebrae diamati menggunakan metode imunohistokimia yang dianalisis secara statistik kuantitatif menggunakan uji *One-way Anova* dan dilanjutkan dengan uji BNJ (*tukey*) $\alpha = 0,05\%$, dan gambaran histopatologi tulang vertebrae dengan pewarnaan Hematoxilin-Eosin diamati secara deskriptif kualitatif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi ekstrak bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) secara signifikan ($P < 0,05$) menurunkan ekspresi IL-6 dengan dosis terbaik adalah 1200 mg/kgBB/hari serta mampu memperbaiki gambaran histopatologi tulang vertebrae yang ditandai dengan penebalan lapisan tulang trabekula di bagian sum-sum tulang vertebrae. Disimpulkan sehingga ekstrak bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) dapat digunakan sebagai terapi osteoporosis pada kondisi menopause.

Kata kunci: Ekstrak Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*), IL-6, *Menopause*, Ovariektomi, Tulang Vertebrae

The Potency of Yam Extract (*Pachyrhizus erosus*) Therapy on Expression of Interleukin 6 (IL - 6) and Histopathology of Vertebrae on Rats (*Rattus norvegicus*) Model of Menopause

ABSTRACT

Menopause is a condition characterized by decreased ovarian function leading to decreased estrogen production in female body. This decrease of estrogen can cause some disturbances, which is osteoporosis. This study aimed to determine the effect of yam extract (*Pachyrhizus erosus*) in animal models of *menopause* based on expression of IL-6 and histopathological improvement of vertebrae. This study used female rats (*Rattus norvegicus*) Wistar 8-12 weeks of age that were divided into five groups : negative control group (A), positive control group (B), groups of rats after ovariectomy *menopause* which treated with yam extract doses of 400 mg / kg of BW / day (C), 800 mg / kg of BW / day (D), and 1200 mg / kg of BW/ day (E). The expression of IL-6 in vertebrae were analyzed quantitatively and histopathologically were analysed quantitative. The results showed that (*Pachyrhizus erosus*) therapy significantly ($P < 0,05$) decrease IL-6 expression with effective dose of 1200 mg /kg of BW and also can improve the histopathology of vertebrae bone marked by thickening of trabecular bone lyer in bone marrow vertebrae. The conclusion that extract (*Pachyrhizus erosus*) have possibly used for osteoporosis therapy in menopause condition.

Keywords: Yam extract (*Pachyrhizus erosus*), *Menopause*, Ovariectomy, IL-6, Vertebrae

KATA PENGANTAR

Puji Syukur atas kehadiran Allah SWT yang melimpahkan segala rahmat dan pertolongan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **“Potensi Pemberian Ekstrak Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap Ekspresi *Interleukin 6* (IL – 6) dan Gambaran Histopatologi Tulang Vertebrae pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Menopause*”**, menjadi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Program Kedokteran Hewan, Program Studi Pendidikan Dokter Hewan, Universitas Brawijaya.

: Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terimakasih kepada segenap pihak secara langsung maupun tidak langsung yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih terutama kepada

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh, DES sebagai Pembimbing I skripsi ini atas segala bimbingan, nasihat dan arahan yang diberikan tiada henti kepada penulis.
2. drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P., M.Biotech selaku Pembimbing II skripsi ini atas segala bimbingan, kesempatan, nasihat dan arahan yang diberikan tiada henti kepada penulis.
3. Drh. Arfan Lesmana, M.Sc selaku penguji I skripsi ini atas masukan dan arahan yang telah diberikan kepada penulis.
4. Drh. Aldila Noviatry, M. Biomed selaku penguji II skripsi ini atas masukan dan arahan yang telah diberikan kepada penulis.
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh, DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atasekepemimpinan dan fasilitas yang telah diberikan.
6. Para staf Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH), dan Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya khususnya Mbak vivi, Pak Mar dan Pak Har yang telah membantu dalam pemeliharaan hewan coba.

7. Seluruh sahabat kelas B dan angkatan 2010 PKH atas segala perhatian, dorongan, dukungan dan doa yang telah diberikan.
8. Keluarga tercinta Ayah M.Muhadjir, SH., MSi dan Ibu Esty Sulistyowati S.Pd ., M.Pd. Serta adikku Krisna Yoga Erlangga dan Sofy De trias Putri. yang senantiasa memberikan dorongan, semangat, dan do'a yang tiada henti demi keberhasilan putra - putrinya.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan serta ketulusan yang telah diberikan. Semoga Tugas Akhir ini dapat memberikan manfaat dan menambah ilmu pengetahuan bukan hanya untuk penulis namun untuk pembaca yang lain.

Malang,

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMBUNG.....	i
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN, ISTILAH DAN LAMBANG.....	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Batasan Masalah	5
1.4 Tujuan Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Model <i>Menopause</i>	7
2.2 Ovariectomi	9
2.3 <i>Menopause</i> dan Osteoporosis	10
2.4 Pengaruh <i>Menopause</i> terhadap tulang <i>Vertebrae</i>	11
2.5 Pengaruh <i>Interleukin-6 Menopause</i>	14
2.6 Fitoestrogen Bengkoang	17
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	20
3.1 Kerangka Konseptual.....	20
3.2 Hipotesis Penelitian	22
BAB 4. METODELOGI PENELITIAN	24

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	24
4.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	24
4.3 Rancangan Penelitian.....	25
4.4 Variabel Penelitian.....	27
4.5 Tahapan Penelitian.....	27
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	33
5.1 Pengamatan Terapi Ekstrak Bengkoang (<i>Pachyrhizus erosus</i>) pada Ekspresi Sitokin IL-6 Tulang Vertebrae	33
5.2 Pengamatan Terapi Ekstrak Bengkoang (<i>Pachyrhizus erosus</i>) pada Gambaran Histopatologi Tulang Vertebrae	37
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN.....	46



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	8
Gambar 2.2 Bengkoang (<i>Pachyrizus erosus</i>)	18
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	20
Gambar 5.1 Ekspresi IL-6 pada tulang vertebrae tikus model <i>menopause</i>	34
Gambar 5.1 Histopatologi tulang vertebrae tikus model <i>menopause</i>	38



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan Penelitian	26
Tabel 5.1 Ekspresi IL-6 pada tulang vertebrae	35

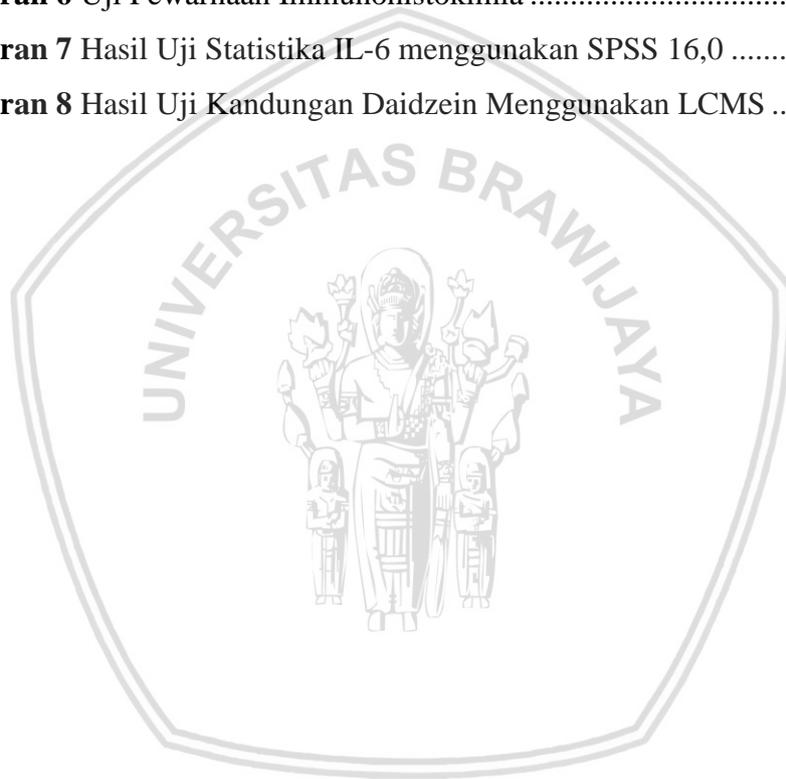


DAFTAR SINGKATAN

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
µm	<i>mikrometer</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variant</i>
BB	Berat badan
BNJ	Beda Nyata Jujur
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca	Kalsium
DAB	<i>Diaminobenzidine</i>
ER-α	<i>Estrogen Receptor α</i>
ER-β	<i>Estrogen Receptor β</i>
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
g	Gram
GnRH	<i>Gonadotropin Relasing Hormone</i>
HE	<i>Hematoxilin Eosin</i>
IL-1	<i>Interleukin 1</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
IL-7	<i>Interleukin 7</i>
IL-11	<i>Interleukin 11</i>
kg	Kilogram
LH	<i>Luteinizing Hormone</i>
LCMS	<i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i>
Mg	Miligram
M-CSF	<i>Macrophage- Colony Stimulating Factor</i>
OPG	<i>Osteoprotegrin</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PFA	<i>Paraformaldehida</i>
PTH	<i>Parathyroid Hormone</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
RANK	<i>Receptor Activator of NF-κB</i>
RANK-L	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
SHARP	<i>Strep-avidin conjugated horseradish peroxidase</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Sertifikat Laik Etik.....	47
Lampiran 2 Diagram Alir Penelitian.....	48
Lampiran 3 Skema Alur Perlakuan Tikus	49
Lampiran 4 Penentuan Dosis.....	50
Lampiran 5 Metode Pembuatan Preparat HE.....	52
Lampiran 6 Uji Pewarnaan Immunohistokimia	53
Lampiran 7 Hasil Uji Statistika IL-6 menggunakan SPSS 16,0	54
Lampiran 8 Hasil Uji Kandungan Daidzein Menggunakan LCMS	57





BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menopause merupakan suatu kondisi fisiologis yang akan terjadi pada wanita dan hewan betina, dimana akan terjadi penurunan fungsi dari ovarium. Pada masa *menopause*, pembentukan hormon estrogen dan progesteron, serta hormone-hormon reproduksi lain yang dihasilkan oleh ovarium menjadi berkurang. pada tahap *menopause*, ovarium juga akan berhenti melepaskan sel telur sehingga aktivitas menstruasi menurun hingga akhirnya berhenti (Walker and Herndon, 2008).

Estrogen bertanggung jawab pada fase pertumbuhan dan menutup perkembangan epifisis pada tulang panjang masa pubertas (Greenspan dan Strewler, 1993). Defisiensi estrogen akan menyebabkan terjadinya osteoklastogenesis yang meningkat dan berlanjut dengan kehilangan tulang. Akibat defisiensi estrogen ini akan terjadi peningkatan produksi dari IL-1, IL-6, dan TNF α lebih lanjut. Estrogen juga merangsang ekspresi dari osteoprotegerin (OPG) dan transforming growth factor- β (TGF- β) oleh sel osteoblas dan sel stroma, sehingga estrogen berfungsi menghambat penyerapan tulang dengan cara mempercepat atau merangsang apoptosis sel osteoklas (Oursler, 2003).

Penurunan fungsi ovarium pada kondisi *menopause* akan menyebabkan penurunan kadar hormon estrogen dalam tubuh. Hal ini akan akan meningkatkan absorpsi Ca pada tulang, akibat menurunnya transport Ca intestinal sehingga kadar Ca dalam tulang

berkurang. Kondisi menurunnya kadar kalsium tulang ini disebut osteoporosis (Hartiningsih, 2010). Osteoporosis merupakan gangguan metabolisme tulang yang ditandai pengurangan massa tulang, pengurangan densitas tulang dan fragilitas tulang yang meningkat, sehingga resiko fraktur menjadi lebih besar (Armandji, 1996). Penderita osteoporosis di Indonesia mencapai angka 19,7 %, data tersebut hasil analisa yang dilakukan Puslitbang Gizi Depkes pada 14 provinsi. Lima provinsi dengan risiko osteoporosis lebih tinggi adalah Sumatra Selatan (27,7%), Jawa Tengah (24,02%), DI Yogyakarta (23,5%), Sumatra Utara (22,82%), Jawa Timur (21,42%) dan Kalimantan Timur (10,5%) (DepKes RI, 2004). Osteoporosis juga terjadi pada hewan terutama hewan betina yang berusia tua yang ditandai dengan mudahnya anjing mengalami patah tulang (Fetter, 2009).

Selama ini masih belum ditemukan pengobatan osteoporosis untuk mengembalikan kondisi tulang menjadi seperti semula. Salah satu terapi yang dilakukan pada penderita osteoporosis untuk mengurangi pengeroposan tulang diantaranya menggunakan terapi pemberian kalsium dan vitamin D. Konsumsi kalsium dan vitamin D dilakukan secara teratur setiap hari dengan dosis yang telah ditentukan. Salah satu alternatif terapi osteoporosis adalah memberikan asupan kalsium dari luar untuk membantu mengurangi terjadinya osteoporosis. Salah satu sumber kalsium tersebut adalah tepung tulang ikan. Tepung tulang ikan yang banyak diteliti kandungannya adalah tepung tulang ikan madidihang (*Thunnus*

albacares) yang mempunyai kandungan mineral Ca dan P yang cukup tinggi (Thalib, 2009).

Osteoporosis atau pengeroposan tulang merupakan suatu penyakit degeneratif pada tulang yang sangat umum terjadi pada kondisi menopause. Osteoporosis dapat terjadi pada seluruh bagian tulang, namun paling sering dijumpai terjadi pada tulang-tulang panjang seperti tulang vertebrae. Osteoporosis sendiri tercatat sebagai penyakit degeneratif utama yang paling sering ditemukan, baik pada hewan atau manusia yang memasuki usia lanjut (WHO, 2004).

Berbagai macam cara telah dilakukan sebagai bentuk terapi pada penderita osteoporosis, salah satunya adalah dengan menggunakan terapi hormone estrogen. Akan tetapi, hal ini diketahui dapat memberikan efek negatif pada tubuh yang berakibat pada terjadinya gangguan hormonal. Oleh sebab itu, banyak diteliti mengenai terapi alternatif pada osteoporosis. Salah satu bentuk terapi alternatif yang saat ini aman dan mudah untuk dilakukan adalah dengan pemberian fitoestrogen sebagai *hormone replacement* (Glazier and Bowman, 2001).

Fitoestrogen merupakan senyawa alami yang memiliki aktivitas estrogenik, sehingga dapat mengisi situs reseptor yang kosong dalam tubuh dan memberikan efek estrogenik yang menyerupai estrogen endogen, meskipun intensitasnya lebih ringan. Hal ini diketahui mampu digunakan sebagai salah satu bentuk terapi alternatif pada pasien yang mengalami osteoporosis (Morito *et al.*, 2002). Beberapa senyawa yang

termasuk kelompok fibroestrogen adalah isoflavon, kumestan, dan lignin. Penelitian Abid (2005) dan Lukitaningsih (2009) mengungkapkan bahwa aktivitas estrogenik tersebut terkait dengan struktur kimia isoflavon menyerupai 17β estradiol.

IL-6 meningkatkan pembentukan sel osteoklas, terutama apabila kadar hormon estrogen menurun (Kawiyana, 2009). Berdasarkan hal tersebut diduga bahwa IL-6 merupakan salah satu sitokin yang memegang peranan penting dalam penyerapan tulang, melalui pengaruh peningkatan pembentukan dan aktivitas sel osteoklas. *Interleukin-6* akan meningkatkan pembentukan sel osteoklas, terutama apabila kadar hormon estrogen menurun. Oleh sebab itu, peningkatan IL-6 diketahui dianggap sebagai faktor risiko terjadinya osteoporosis (Saltel *et al*, 2006).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi bengkoang sebagai terapi pada hewan model *menopause* yang telah mengalami osteoporosis. Pemberian ekstrak bengkoang yang mengandung fitoestrogen berupa *daidzein* diharapkan dapat merangsang aktivitas osteoblas serta menghambat kerja hormon paratiroid dalam merangsang osteoklas sehingga tulang tidak mengalami keropos. Efek pemberian ekstrak bengkoang ini dianalisis berdasarkan ekspresi IL-6 dan gambaran histopatologi dari tulang vertebrae pada tikus model *menopause*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah yang diangkat, yaitu:

1. Bagaimana pengaruh pemberian terapi ekstrak bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap ekspresi IL-6 dari tulang vertebrae pada hewan model *menopause*?
2. Bagaimana pengaruh pemberian terapi ekstrak bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap gambaran histopatologi tulang vertebrae pada hewan model *menopause*?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka penelitian yang dilakukan dibatasi pada:

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus betina (*Rattus norvegicus*) dewasa galur *Wistar* umur 8-12 minggu dengan berat badan 180-200 g yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta yang telah mendapatkan persetujuan laik etik No: 392-KEP-UB dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya.
2. Ovariectomi digunakan sebagai metode untuk memperoleh hewan model *menopause* (Sabri, 2011).
3. Ekstraksi bengkoang dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%

4. Dosis terapi ekstrak bengkoang yang digunakan yaitu 400 mg/kgBB/hari, 800 mg/kgBB/hari, dan 1200 mg/kgBB/hari, selama 30 hari.
5. Pengamatan ekspresi IL-6 diamati dengan metode imunohistokimia dan gambaran histopatologi tulang vertebrae dengan pewarnaan *Hematoxilin-Eosin*

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang di atas, maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan, yaitu:

1. Mengetahui pengaruh pemberian terapi berupa ekstrak bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap ekspresi IL-6 dari tulang vertebrae pada hewan model *menopause*.
2. Mengetahui pengaruh pemberian terapi berupa ekstrak bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap gambaran histopatologi tulang vertebrae pada hewan model *menopause*.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk mengetahui potensi pemberian ekstrak bengkoang terhadap hewan model *menopause* pasca ovariektomi. Efek terapi dilihat berdasarkan ekspresi *Interleukin 6* (IL-6) dan gambaran histopatologi dari tulang vertebrae.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model *Menopause*

Penggunaan hewan model *menopause* menggunakan *Rattus norvegicus* strain Wistar yang memiliki klasifikasi yaitu (Suckow, 2006) :

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Sub filum : Vertebrata

Class : Mamalia

Sub Class : Theria

Infraklas : Eutheria

Ordo : Rodentia

Sub ordo : Myomorpha

Famili : Muridae

Sub family: Murinae

Genus : *Rattus*

Spesies : *Rattus norvegicus* strain Wistar



Gambar 2.1 Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar*

(Kusumawati, 2004)

Tikus termasuk dalam golongan *nocturnal* yang lebih aktif bergerak pada malam hari. Tikus membutuhkan pakan 15 g per 100 g berat badan per hari. Tikus yang digunakan untuk penelitian umumnya diberikan makan secara *ad libitum*. Pakan yang diberikan selama proses pemeliharaan umumnya mengandung lemak 4-5% dan protein 14%. Rata-rata berat badan umum tikus jantan dewasa berkisar antara 267 – 500 g dan betina 225 – 325 g. Tikus betina mengalami dewasa kelamin pada umur tujuh minggu, masa bunting selama 21-23 hari dan disapih pada umur 21 hari, dan mencapai masa *menopause* pada umur 15-20 minggu (Suckow *et al*, 2006). Kebutuhan untuk minum seekor tikus dewasa mengonsumsi sekitar 15 ml air per 100 g berat badan per hari. Air dalam proses pemeliharaan juga diberikan secara *ad libitum* (Schwiebert, 2007).

1.2 Ovariectomi

Hewan model *menopause* diperoleh setelah ovariectomi dilakukan yang akan menurunkan hormon estrogen sehingga akan menyebabkan relatif tingginya resorpsi tulang. Ovariectomi adalah tindakan mengamputasi, mengeluarkan dan menghilangkan ovarium dari rongga abdomen. Tindakan tersebut dilakukan dengan teknik laparotomi dengan mengambil ovarium bilateral. Ovariectomi digunakan sebagai teknik operasi untuk induksi hewan model *menopause* karena teknik pengerjaan yang mudah dan akan memberi hasil yang akurat terkait dalam menurunkan aktivitas hormon estrogen (Wisnu, 2009). Ovariectomi juga didefinisikan sebagai suatu tindakan pembedahan atau teknik laparotomi untuk pengambilan ovarium bilateral. Secara luas pada bidang biomedis, tikus ovariectomi dapat menjadi model wanita *menopause* (Woo *et al.*, 2005). Ovariectomi menyebabkan penurunan massa tulang di daerah trabekula tetapi tidak terjadi pada tulang kortikal. Selain itu, tindakan ovariectomi dapat segera menimbulkan gejala *menopause* tanpa menimbulkan gejala lain.

Menurut Sabri (2011), ovariectomi pada dasarnya memiliki prinsip yaitu mengangkat atau menonaktifkan kerja ovarium. Jika ovarium tidak berfungsi atau dihilangkan, maka menyebabkan kondisi *menopause* yang secara otomatis hipotalamus tidak mensekresikan *Gonadotropin Relasing Hormone* (GnRH) sehingga tidak terjadi pelepasan *luteinizing hormone* (LH) dan *follicle stimulating hormone* (FSH) dari pituitary anterior untuk

menghasilkan hormon-hormon seks terutama estrogen. Hormon estrogen merupakan hormon steroid yang dihasilkan oleh sel teka interna folikel ovarium, korpus luteum, plasenta dan sedikit dihasilkan oleh korteks adrenal.

2.3 *Menopause dan Osteoporosis*

Menopause umumnya didefinisikan sebagai kondisi dimana ovarium atau organ reproduksi betina sudah tidak lagi berfungsi secara maksimal. Hal ini akan menyebabkan berbagai perubahan dalam tubuh, khususnya perubahan hormon-hormon reproduksi yang dihasilkan oleh ovarium. Perubahan hormonal ini dapat memicu timbulnya penyakit, salah satunya adalah osteoporosis. Kondisi *menopause* secara alami akan terjadi pada wanita dan hewan betina yang telah memasuki usia lanjut, dimana fungsi ovarium semakin lama akan mengalami penurunan (Walker and Herndon, 2008). *Menopause* juga dapat terjadi akibat dilakukannya ovariectomi. Woo *et al.* (2005) juga menyatakan bahwa tikus yang telah di ovariectomi akan mengalami *menopause* yang dapat berakhir pada osteoporosis. Semakin lama waktu inkubasi ovariectomi, maka akan semakin memperparah pengeroposan pada tulang.

Tindakan ovariectomi dapat menyebabkan penurunan kadar estrogen dalam tubuh sehingga terjadi penurunan transport kalsium yang akan berpengaruh pada *parathyroid hormone* (PTH) dan *calcitonin*. PTH berfungsi untuk mempercepat resorpsi tulang dengan menambah

kecepatan diferensiasi sel-sel mesenkim menjadi osteoklas dan memperpanjang masa paruh sel-sel tersebut sehingga produksi PTH yang berlebih (hiper paratiriodisme) akan menyebabkan peningkatan aktivitas osteoklas. Sedangkan, hormon *calcitonin* yang disintesis oleh sel-sel parafollicular dari kelenjar tiroid dapat menghambat aktivitas osteoklas dengan berikatan dengan *calcitonin receptor* pada osteoklas (Wisnu, 2009). Hilangnya fungsi ovarium dalam hipoestrogenis yang merupakan faktor utama penurunan massa tulang, peningkatan jumlah osteoklas, serta peningkatan kadar enzim serum alkalin fosfatase yang dapat meningkatkan risiko terjadinya osteoporosis (Woo *et al*, 2005).

Osteoporosis dikenal sebagai penyakit skeletal dengan karakter penurunan masa tulang dan kemunduran *microachitectural* dari jaringan tulang yang mengarah kepada meningkatnya kerapuhan tulang dengan konsekuensi yang terjadi adalah peningkatan risiko fraktur tulang. Faktor risiko awal yang berhubungan dengan perkembangan osteoporosis melibatkan unsur jenis kelamin wanita/betina dan penambahan usia. Penurunan estrogen akan berakibat terjadinya kehilangan komposisi tulang pada kondisi pasca *menopause* (Lewiegki, 2008).

2.4 Pengaruh *Menopause* Terhadap Tulang Vertebrae

Efek samping yang paling sering terjadi pada kondisi *menopause* adalah osteoporosis. Penyakit osteoporosis sering disebut sebagai silent disease karena proses kepadatan tulang berkurang secara perlahan (terutama pada penderita osteoporosis senilis) dan berlangsung secara

progresif selama bertahun-tahun tanpa kita sadari dan tanpa disertai adanya gejala (Ott, 2002). Osteoporosis dapat menyerang pada seluruh bagian tulang, salah satunya adalah tulang vertebrae. Jika kepadatan tulang sangat berkurang sehingga tulang menjadi hancur, maka akan timbul nyeri tulang dan kelainan bentuk. Hancurnya tulang belakang menyebabkan nyeri punggung menahun. Tulang belakang yang rapuh bisa mengalami hancur secara spontan atau kerana cedera ringan (Anonymous). Biasanya nyeri timbul secara tiba-tiba dan dirasakan di daerah tertentu dari punggung, yang akan bertambah nyeri jika penderita berdiri atau berjalan. Jika disentuh, daerah tersebut akan terasa sakit, tetapi biasanya rasa sakit ini akan menghilang secara bertahap setelah beberapa minggu atau beberapa bulan. Jika beberapa tulang belakang hancur, maka akan terbentuk kelengkungan yang abnormal dari tulang belakang (punuk Dowager), yang menyebabkan ketegangan otot dan sakit. Tulang lainnya bisa patah, yang seringkali disebabkan oleh tekanan yang ringan atau karena jatuh (Kawiyana, 2009).

Terjadinya osteoporosis secara seluler disebabkan oleh karena jumlah dan aktivitas sel osteoklas melebihi dari jumlah dan aktivitas sel osteoblas (sel pembentuk tulang). Keadaan ini mengakibatkan penurunan massa tulang. Pada kondisi osteoporosis pasca *menopause*, hal yang paling mempengaruhi terjadinya osteoporosis pada tulang vertebrae adalah penurunan hormon estrogen. Dalam keadaan normal estrogen dalam

sirkulasi mencapai sel osteoblas, dan beraktivitas melalui reseptor yang terdapat di dalam sitosol sel tersebut (Noor, 2014).

Estrogen merupakan hormon seks steroid memegang peran yang sangat penting dalam metabolisme tulang, mempengaruhi aktivitas sel osteoblas maupun osteoklas, termasuk menjaga keseimbangan kerja dari kedua sel tersebut melalui pengaturan produksi faktor parakrin-parakrin utamanya oleh sel osteoblas. Seperti dikemukakan diatas bahwasanya sel osteoblas memiliki reseptor estrogen alpha dan betha ($ER\alpha$ dan $ER\beta$) di dalam sitosol. Dalam diferensiasinya sel osteoblas mengekspresikan reseptor betha ($ER\beta$) 10 kali lipat dari reseptor estrogen alpha ($ER\alpha$) (Quaedackers *et al*, 2001). Didalam percobaan binatang defisiensi estrogen menyebabkan terjadinya osteoklastogenesis dan terjadi kehilangan tulang. Akan tetapi dengan pemberian estrogen terjadi pembentukan tulang kembali. Di sisi lain estrogen akan merangsang ekspresi dari osteoprotegerin (OPG) dan TGF- β (Transforming Growth Factor- β) pada sel osteoblas dan sel stroma, yang lebih lanjut akan menghambat penyerapan tulang dan meningkatkan apoptosis dari sel osteoklas (Tandra, 2009).

Efek biologis dari estrogen diperantarai oleh reseptor yang dimiliki oleh sel osteoblastik diantaranya ialah estrogen receptor-related receptor a ($ERR\alpha$), reseptor estrogen α , β ($ER\alpha$, $ER\beta$). Sub tipe reseptor inilah yang melakukan pengaturan homeostasis tulang dan berperan akan terjadinya osteoporosis (Quaedackers *et al*, 2001). Estrogen juga diketahui

mempunyai efek terhadap sel osteoklas. Efek estrogen bisa memberikan pengaruh secara langsung maupun tidak langsung. Secara tidak langsung estrogen mempengaruhi proses diferensiasi, aktivasi, maupun apoptosis dari osteoklas (Bonnelye *et al.* 2003). Dalam diferensiasi dan aktivasinya estrogen menekan ekspresi RANK-L, M-CSF dari sel stroma osteoblas, dan mencegah terjadinya ikatan kompleks antara RANK-L dan RANK, dengan memproduksi reseptor OPG, yang berkompetisi dengan RANK. Begitu juga secara tidak langsung estrogen menghambat produksi sitokin-sitokin yang merangsang diferensiasi osteoklas. Terhadap apoptosis sel osteoklas, secara tidak langsung estrogen merangsang osteoblas untuk memproduksi TGF- β yang selanjutnya TGF- β ini menginduksi sel osteoklas untuk lebih cepat mengalami apoptosis. Sedangkan efek langsung dari estrogen terhadap osteoklas adalah melalui reseptor estrogen pada sel osteoklas, yaitu menekan aktivasi c-Jun, sehingga mencegah terjadinya diferensiasi sel prekursor osteoklas dan menekan aktivasi sel osteoklas dewasa (Gruber *et al.*, 2008).

1.5 Peran *Interleukin-6* (IL-6) kondisi *Menopause* dan Osteoporosis

Kondisi *menopause* dan osteoporosis tidak lepas kaitannya dengan faktor sitokin seperti *Interleukin-6* (IL-6). Terjadinya osteoporosis pada tingkat seluler disebabkan oleh aktivitas sel osteoklas melebihi dari aktivitas sel osteoblas. IL-6 merupakan mediator/sitokin yang merangsang terjadinya diferensiasi dari sel prekursor osteoklas menjadi sel osteoklas aktif, yang mengakibatkan penyerapan tulang dengan petanda peningkatan

kadar CTx dalam serum yang akhirnya bermuara pada terjadinya osteoporosis. Sampai saat ini belum diketahui apakah kadar IL-6 lebih tinggi pada penderita osteoporosis pasca menopause defisiensi estrogen, karena IL-6 tersebut merupakan salah satu sitokin yang meningkatkan diferensiasi sel prekursor osteoklas menjadi sel osteoklas aktif, yang mengakibatkan peningkatan penyerapan tulang dan berisiko terhadap kejadian osteoporosis pasca menopause defisiensi estrogen (Kawiyana, 2009).

Aktivitas estrogen di dalam sitosol sel-sel tulang akan mengakibatkan menurunnya sekresi sitokin seperti Interleukin-6 (IL-6), yang berfungsi dalam penyerapan tulang. Sel osteoblas merupakan sel target utama dari estrogen, untuk melepaskan beberapa faktor pertumbuhan dan sitokin, yang secara tidak langsung maupun secara langsung juga berpengaruh pada sel osteoklas. Estrogen juga diketahui merupakan salah satu yang berfungsi menstimulasi ekspresi gene dan produksi protein pada sel osteoblastik manusia, seperti misalnya produksi OPG, RANK-L, dan IL-6 (Gruber *et al*, 2002). Dalam sebuah studi didapatkan bahwa kemampuan estrogen mengatur produksi sitokin sangat bervariasi dari masing-masing organ maupun masing-masing spesies, begitu juga terhadap produksi dari IL-6. Dikatakan produksi dari IL-6 pada osteoblas manusia (human osteoblast) dan stromal sel sumsum tulang manusia (human bone marrow stromal cells), terbukti diinduksi oleh IL-1 dan TNF α , tidak secara langsung oleh steroid ovarium. Dengan demikian

dimungkinkan pada sel stroma osteoblastik dan sel osteoblas terjadi perbedaan tingkat aktivasi sel, sehingga akan terjadi perbedaan produksi dari protein yang dihasilkannya seperti misalnya: IL-6, RANK-L, dan OPG, dengan suatu stimulasi yang sama (Ott, 2002).

Defisiensi estrogen akan menyebabkan meningkatnya produksi dari IL-1, IL-6, dan TNF- α yang lebih lanjut akan diproduksi M-CSF dan RANK-L. Selanjutnya RANK-L menginduksi aktivitas JNK1 dan osteoclastogenic activator protein-1, faktor transkripsi c-Fos dan c-Jun. Dalam diferensiasi dan aktivasinya estrogen menekan ekspresi RANK-L, MCSF dari sel stroma osteoblas, dan mencegah terjadinya ikatan kompleks antara RANK-L dan RANK, dengan memproduksi reseptor OPG, yang berkompetisi dengan RANK. Begitu juga secara tidak langsung estrogen menghambat produksi sitokin-sitokin yang merangsang diferensiasi osteoklas seperti: IL-6, IL-1, TNF- α , IL-11 dan IL-7 (Manolagas, 2000). *Interleukin-6* merupakan salah satu yang perlu mendapatkan perhatian, oleh karena meningkatnya IL-6 terbukti memegang peranan akan terjadinya beberapa penyakit, antaranya berpengaruh pada remodeling tulang dan terjadinya penyerapan tulang berlebihan baik lokal maupun sistemik (Kawiyana, 2009).

Secara umum peran IL-6 berhubungan dengan IL-1 dan TNF- α , yang artinya ketiga sitokin ini dapat saling berkoordinasi pengeluarannya dari monosit aktif, terutama di daerah inflamasi sehingga sering disebut sitokin proinflamasi (*proinflammatory cytokine*). Dari ketiga

sitokin proinflamasi ini IL-6 yang lebih stabil di dalam plasma dari pada yang lainnya. Interleukin-6 juga berperan penting dalam metabolisme tulang melalui induksi osteoklastogenesis dan merangsang aktivitas osteoklas. IL-6 meningkatkan pembentukan sel osteoklas, terutama apabila kadar hormon estrogen menurun (Kawiyana, 2009). Berdasarkan hal tersebut diduga bahwa IL-6 merupakan salah satu sitokin yang memegang peranan penting dalam penyerapan tulang, melalui pengaruh peningkatan pembentukan dan aktivitas sel osteoklas. *Interleukin-6* akan meningkatkan pembentukan sel osteoklas, terutama apabila kadar hormon estrogen menurun. Oleh sebab itu, peningkatan IL-6 diketahui dianggap sebagai faktor risiko terjadinya osteoporosis (Saltel *et al*, 2006).

1.6 Fitoestrogen Bengkoang

Menurut Lukitaningsih (2009), klasifikasi tanaman bengkoang, adalah:

Kingdom : Plantae
 Divisio : Spermatophyta
 Sub division : Angiospermae
 Kelas : Dicotyledoneae
 Ordo : Fabales
 Famili : Fabaceae
 Genus : *Pachyrhizus*
 Spesies : *Pachyrhizus erosus*



Gambar 2.2 Bengkoang *Pachyrhizus erosus* (Widyatmoko, dkk, 2016).

Pachyrhizus erosus mengandung senyawa isoflavon. Struktur kimia isoflavon menyerupai 17β -estradiol (Gruber *et al.*, 2002; Delmonte dan Rader, 2006), sehingga *Pachyrhizus erosus* sering disebut sebagai kelompok tanaman fitoestrogen (Urasopon *et al.*, 2008). Komponen terbesar isoflavon adalah senyawa *daidzein* dan *genistein*, dapat ditemukan pada famili Fabaceae termasuk *Pachyrhizus erosus* yang terdistribusi dalam tanaman serta produknya (Kang *et al.*, 2007). *Daidzein* merupakan senyawa isoflavon yang aktivitas estrogeniknya lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa isoflavon lainnya.

Fitoestrogen walaupun bukan hormon namun strukturnya mirip dengan estradiol dapat pula menduduki reseptor estrogen dan mampu menimbulkan efek layaknya estrogen endogenous sendiri (Glazier dan Bowman, 2001). Fitoestrogen mempunyai afinitas ikatan dengan reseptor estrogen yang terdapat di beberapa organ tubuh, yaitu uterus, ovarium, kelenjar mammae, tulang, hipotalamus, kelenjar pituitary, sel leydig, prostat, dan epididymis (Kim dan Park, 2012). Fitoestrogen merupakan suatu

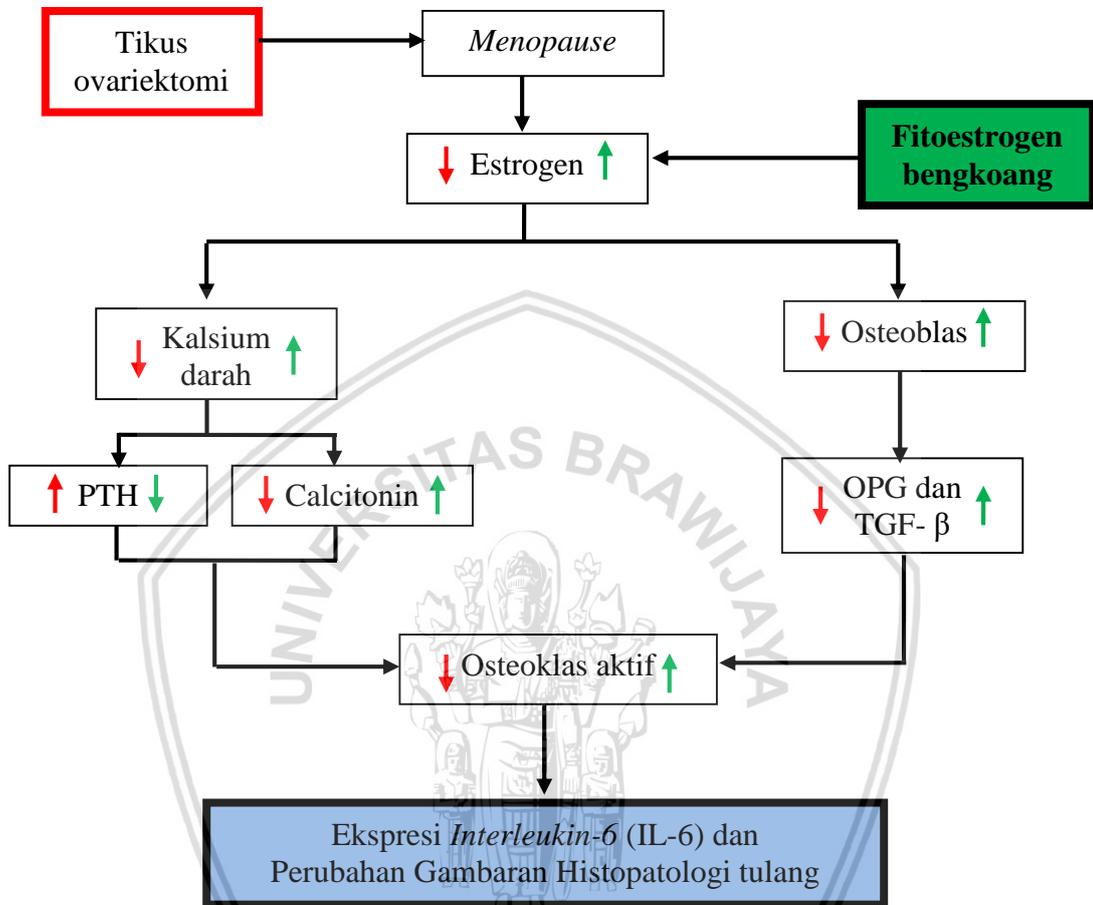
senyawa estrogen alam yang mampu berikatan dengan reseptor estrogen α dan β (Morito *et al.*, 2002).





BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan gambar:

: Variabel tergantung

: Variabel bebas

↓ : Stimulasi

↕ : Efek terapi bengkoang

↕ : Efek perlakuan ovariectomi

Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Proses ovariectomi yang dilakukan pada tikus akan mengakibatkan terjadinya kondisi *menopause* dan menurunkan secara drastis produksi hormon estrogen dalam tubuh tikus. Hal tersebut akan menyebabkan kadar Ca dalam darah menurun karena Ca yang bersumber dari luar tidak diserap secara maksimal. Menurunnya kadar Ca dalam darah akan menginduksi terjadinya penurunan transport kalsium yang akan berpengaruh pada hormon *parathyroid hormone* (PTH) yang diskresi oleh kelenjar parathyroid dan hormon *calcitonin* yang diskresi oleh kelenjar tiroid. *Parathyroid hormone* (PTH) berfungsi meningkatkan konsentrasi kalsium plasma dan mempercepat resorpsi tulang dengan menambah kecepatan diferensiasi sel-sel mesenkim menjadi osteoklas dan memperpanjang masa paruh sel-sel tersebut sehingga produksi PTH yang berlebih (*hiperparatiriodisme*) akan menyebabkan peningkatan aktivitas osteoklas. Adanya PTH dan efek langsung estrogen pada sel osteoblast dengan berikatan dengan Estrogen Reseptor- α (ER- α) menyebabkan sekresi sitokin salah satunya *Interleukin-6* (IL-6). Sitokin yang dihasilkan tersebut akan mengaktifasi osteoklas untuk merangsang resorpsi tulang. Hormon *calcitonin* yang disintesis oleh sel-sel parafollicular dari kelenjar tiroid yang berfungsi mengatur keseimbangan kalsium dalam plasma dan dapat menghambat aktivitas osteoklas dengan berikatan dengan *calcitonin reseptor* pada osteoklas.

Secara normal, adanya estrogen menyebabkan osteoblas mengeluarkan *Transforming Growth Factor β* (TGF- β) dan

Osteoprotegerin (OPG). TGF- β dan OPG akan menginduksi sel osteoklas agar lebih cepat mengalami apoptosis sehingga akan terjadi keseimbangan antara aktivitas osteoklas (resorpsi tulang) dan osteoblas (formasi tulang). Penurunan estrogen yang terjadi akan menyebabkan penurunan osteoblas sehingga TGF- β dan OPG akan mengalami penurunan. Hal ini akan menyebabkan resorpsi tulang meningkat, sedangkan formasi tulang menurun, sehingga akan menurunkan densitas tulang trabekula yang berakibat pada osteoporosis.

Pemberian terapi fitoestrogen bengkoang pada masa menopause diharapkan dapat meningkatkan kadar estrogen dalam tubuh sehingga penyerapan kalsium darah meningkat dan proses *remodelling* tulang akan stabil yaitu adanya keseimbangan antara resorpsi dan formasi tulang, sehingga reaksi seluler pembentukan tulang dapat kembali normal dengan tersedianya mineral yang merupakan materi pembentuk sel penyusun tulang yaitu osteosit dan osteoblas.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka hipotesis yang diambil dari penelitian ini, yaitu:

1. Pemberian ekstrak bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) dapat menurunkan ekspresi IL-6 dari tulang vertebrae pada tikus (*Rattus norvegicus*) model *menopause*.

2. Pemberian ekstrak bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) dapat meningkatkan luas permukaan tulang trabekula yang dilihat dari gambaran histopatologi tulang vertebrae pada tikus (*Rattus norvegicus*) model *menopause*.





BAB 4 METODELOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2014 – Juli 2015 dan bertempat di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Patologi Klinik RS. Dr. Soetomo Surabaya, dan Laboratorium Kimia Politeknik Negeri Malang.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: sonde lambung, kandang tikus, *syringe* 2 ml, timbangan, alat bedah yang terdiri dari *scalpel*, *blade*, gunting, pinset, *arteri clamp*, *needle holder*, kapas, jarum, benang *cat gut chromic*, benang *silk*, dan alas bedah. Selain itu, juga digunakan *rotary evaporator*, Erlenmeyer, kertas saring, pisau, sentrifus, *microtube*, tabung *ependorf*, pipet, seta mikroskop cahaya (*Olympus BX51*)

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain: hewan coba berupa tikus putih betina galur *wistar* usia 8-12 minggu, pakan standar AIN 93 M, air minum, zoletyl, alkohol 70%, alkohol, absolut,

alcohol bertingkat 90%; 80%; 70%; 50%; dan 30%, *povidone iodine*, ekstrak etanol bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) yang telah diencerkan dengan air, aquadest, PBS, H₂O₂, antibodi primer Rat anti IL-6, antibodi sekunder Rabbit anti rat IgG berlabel biotin, *block label*, *Diamanobenzidine* (DAB), *Mayer's Hematoxylin Eosin*, *cover glass*, paraformaldehyde 4%, larutan dekalsifikasi, serta xylene.

4.3 Rancangan Penelitian

Rancangan dalam penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba yang digunakan merupakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina dari galur *wistar* yang berusia 8-12 minggu. Penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok yang terdiri dari: Kelompok A (kontrol negatif) yaitu tikus normal yang tidak diovariectomi dan tidak diberi terapi, Kelompok B (kontrol positif) merupakan tikus model *menopause* yang telah diovariectomi tanpa diberi terapi, Kelompok C (terapi 1) merupakan tikus model *menopause* yang diberi terapi ekstrak bengkoang (*Pachyrizus erosus*) dengan dosis 400 mg/kg/hari, Kelompok D (terapi 2) merupakan tikus model *menopause* yang diberi terapi ekstrak bengkoang (*Pachyrizus erosus*) dengan dosis 800 mg/kg/hari, dan kelompok E (terapi 3) merupakan tikus model *menopause* yang diberi terapi ekstrak bengkoang (*Pachyrizus erosus*) dengan dosis 1200 mg/kg/hari. Kelompok perlakuan

penelitian dapat diamati pada **Tabel 4.1**. Penentuan jumlah sampel ditentukan berdasarkan rumus sebagai berikut (Kusriningrum, 2010):

$$t(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 15 + 5$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 5 kelompok perlakuan dibutuhkan minimal 4 kali ulangan pada setiap kelompok, sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan Penelitian

Kelompok	Perlakuan
A	Kontrol negatif
B	Kontrol positif
C	Terapi 1 (400 mg/kg/hari)
D	Terapi 2 (800 mg/kg/hari)
E	Terapi 3 (1200 mg/kg/hari)

4.4 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini, yaitu:

Variabel kontrol : Tikus *Rattus norvegicus* galur *wistar* dengan berat badan antara 180-200 gram, berumur 8-12 minggu yang diberi pakan standar AIN 93M dan air minum *ad libitum*.

Variabel bebas : Dosis terapi ekstrak bengkoang (*Pachyshius erosus*), Pembuatan model menopause.

Variabel tergantung : Gambaran histopatologi tulang vertebrae dan Ekspresi *Interleukin-6* (IL-6).

4.5 Tahapan Penelitian

4.5.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba diadaptasi terhadap lingkungan selama 7 hari dengan pemberian pakan berupa pakan standar AIN 93M dan air minum *ad libitum*. Komposisi ransum basal disusun berdasarkan standar AIN (2005) yaitu mengandung karbohidrat, protein, lemak, mineral, vitamin, dan air. Tikus ditempatkan pada kandang yang bebas dari suara rebut dan terjaga dari paparan polutan dengan suhu optimum kandang adalah 22-24°C dan kelembapan 50-60%.

4.5.2 Pembuatan Hewan Model *Menopause*

Hewan model *menopause* dibuat dengan cara ovariektomi yang dilakukan pada hewan coba pada hari ke-7 setelah hewan diadaptasikan.

Prosedur ovariektomi dilakukan berdasarkan Hartiningsih *et al* (2012), yaitu dengan membuat sayatan pada lateral abdomen ke arah caudal. Prosedur pembedahan dimulai dengan persiapan peralatan berupa *scalpel, blade, needle holder, arteri clamps*, gunting, pinset, jarum serta benang jahit. Hewan coba yang akan diovariektomi kemudian ditimbang untuk menentukan dosis anestesi. Anestesi dilakukan dengan menginjeksikan zoletyl dosis 7-10 mg/kgBB secara intramuscular pada celah *M. semimembranosus* dan *M. semitendinosus*. Setelah hewan coba teranestesi, tikus diposisikan rebah lateral, kemudian dilakukan pencukuran rambut pada area insisi, yaitu pada daerah fossa paralumbal. Area insisi kemudian didesinfeksi dengan alkohol 70 % sebelum melakukan insisi. Proses insisi dilakukan dengan menggunakan *blade* secara perlahan pada area insisi sepanjang 5-7 mm hingga membuka muskulus daerah abdomen (*M. obliques abdominis eksternus* dan *M. obliques abdominis internus*). Setelah rongga abdomen terbuka, maka dilakukan pencarian ovarium. Apabila ovarium sudah ditemukan, maka dilakukan penjepitan pada bagian bawah oviduct menggunakan *arteri clamps*. Selanjutnya dilakukan pengikatan pada pangkal *arteri clamps*, yaitu pada tuba falopii ovarium dengan menggunakan benang *cat gut chromic*. Ovarium selanjutnya dipotong dan dipastikan tidak terjadi pendarahan sebelum *arteri clamps* dilepas. Proses yang sama dilakukan pada ovarium yang lain.

Setelah kedua ovarium diangkat, saluran reproduksi direposisi kembali ke dalam rongga abdomen. Muskulus kemudian dijahit

menggunakan *cat gut chromic* dengan pola jahitan *simple interrupted*. Pada kulit luar dilakukan penjahitan dengan menggunakan benang *silk* dengan tipe jahitan *simple interrupted*. Selanjutnya area penjahitan didesinfeksi dengan menggunakan *povidone iodine*. Proses pemulihan luka pada tikus berlangsung selama 10 hari. Hewan coba kemudian dibiarkan selama 3 bulan hingga tercapai kondisi *menopause* yang ditandai dengan kondisi osteoporosis. Kondisi ini dikonfirmasi dengan melakukan perhitungan kadar hormon estrogen.

4.5.3 Pembuatan Ekstrak Bengkoang (*Pachyrizus erosus*)

Pembuatan ekstrak bengkoang dilakukan melalui beberapa tahapan. Tahap pertama yaitu persiapan sampel bengkoang (*Pachyrizus erosus*). Buah bengkoang yang diperoleh kemudian dikupas dan dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 30°C. Bengkoang yang telah kering kemudian diiris tipis-tipis hingga didapatkan potongan bengkoang yang lebih kecil. Sampel bengkoang selanjutnya ditimbang sebanyak 250 gram dan dimaserasi dengan 1 L etanol 96% dan didiamkan pada suhu kamar selama 5 hari dalam Erlenmeyer yang ditutup dengan aluminium foil. Sampel kemudian disaring, dan filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 47°C hingga diperoleh ekstrak yang masih mengandung pelarut dalam volume yang lebih kecil. Penguapan pelarut ekstraksi dilanjutkan dengan menggunakan oven pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental (Thalib, 2009).

4.5.4 Pemberian Terapi Hewan Model *Menopause*

Pemberian terapi ekstra bengkoang dimulai 3 bulan setelah diperoleh kondisi menopause. Pemberian dilakukan peroral melalui sonde lambung tikus sebanyak 2 ml/ekor, yang diberikan 1x sehari selama 30 hari. Pemberian ekstrak bengkoang sebagai terapi diberikan dengan dosis yang berbeda beda, yaitu 400 mg/kgBB (Kelompok C), 800 mg/kgBB (Kelompok D), dan 1200 mg/kgBB (Kelompok E). perhitungan dosis terapi ekstrak bengkoang mengacu pada **Lampiran 3**

4.5.5 Pembedahan dan Pengambilan Sampel Organ

Proses pembedahan diawali dengan proses euthanasia yang dilakukan dengan cara dislokasi leher (*cervical dislocation*) tikus. Hewan coba yang sudah dieuthanasi kemudian dilakukan pembedahan untuk mengambil bagian tulang vertebrae. Tulang vertebrae yang telah diisolasi kemudian disimpan dalam pot berisi larutan formalin untuk dilakukan pembuatan preparat histopatologi dan immunohistokima.

4.5.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Tulang Vertebrae

Proses pembuatan preparat histopatologi tulang verterbrae dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu: fiksasi, dekalsifikasi, dehidrasi, vakum, *embedding*, *sectioning*, penempatan di *object glass*, deparafinasi, rehidrasi, serta menggunakan pewarnaan. Pewarnaan preparat dilakukan dengan menggunakan pewarna Hematoxilin eosin (HE) (Muntiha, 2001). Skema kerja pembuatan preparat histopatologi dapat dilihat pada **Lampiran 5**.

4.5.7 Pembuatan Preparat Immunohistokimia Tulang Vertebrae

Poses pembuatan preparat immunohistokimia tulang vertebrae terdiri dari beberapa tahapan, yaitu proses deparafinasi, rehidrasi, pelabelan dengan antibodi, *counterstaining*, serta *mounting* dengan entellan.

Proses deparafinasi dengan menggunakan xylol bertingkat 1 – 2 masing-masing selama 5 menit. Proses rehidrasi dengan menggunakan alcohol absolut selama 3 menit, lalu alcohol 100%, 90%, 80%, dan 70% secara berurutan masing-masing selama 3 menit. Jaringan dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3x5 menit, lalu direndam dengan H₂O₂ selama 20 menit. Kemudian preparat dicuci dengan PBS pH 7,5 selama 3x5 menit. *Blocking* dilakukan dengan menggunakan BSA 1% selama 30 menit pada suhu ruang, lalu preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Preparat diinkubasi dengan antibody primer *Rat anti-IL-1* selama 1 jam pada suhu 4°C, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Selanjutnya ditambah dengan antibody sekunder *Rabbit anti-rat IgG* berlabel *biotin* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Preparat ditambahkan *Strep-avidin conjugated horseradish peroxidase* (SAHRP) selama 30-60 menit pada suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Preparat ditambahkan cromagen *Diaminobenzidine* (DAB) selama 10-20 menit pada suhu ruang, dibilas dengan aquadest selama 3x5 menit, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. *Counterstaining* dilakukan dengan

Mayer's Hematoxylin selama 5 menit pada suhu ruang dan dicuci dengan aquadest 3x5 menit. Selanjutnya, preparat dikering anginkan dan dilakukan mounting menggunakan *entellan* kemudian ditutup dengan *cover glass* (Ramos-Vara, 2005).

4.5.8 Analisis Data

Data penelitian berupa ekspresi *Interleukin-6* (IL-6) dan gambaran histopatologi tulang vertebrae. Analisa ekspresi IL-6 dilakukan secara kuantitatif, sedangkan gambaran histopatologi tulang vertebrae dilakukan secara deskriptif kualitatif. Hasil analisa kemudian di tabulasi menggunakan *Microsoft Office Excel* dan dianalisis menggunakan *SPSS 16.0 for Windows* dengan dianalisis menggunakan ragam ANOVA (*One Way Analysis of Variant*) dilanjutkan dengan uji *Tukey* dengan Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha=0,05$ (Kusriningrum, 2010)

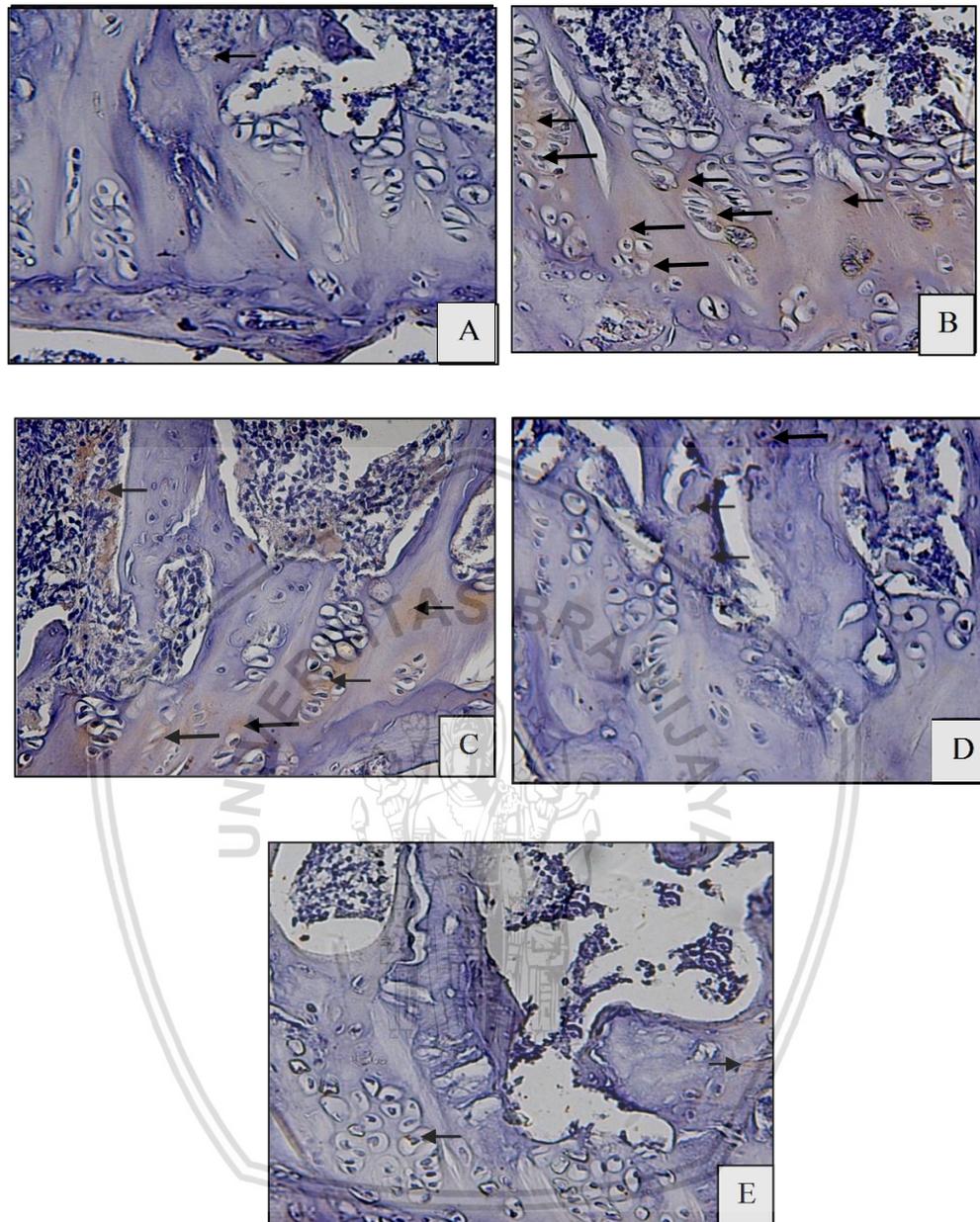


BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengamatan Terapi Ekstrak Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) pada Ekspresi Sitokin IL-6 Tulang Vertebrae

Penelitian pengaruh pemberian ekstrak bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap ekspresi sitokin IL-6 pada tulang vertebrae tikus putih (*Rattus norvegicus*) model *menopause* diamati secara kuantitatif. Ekspresi sitokin IL-6 diamati menggunakan mikroskop perbesaran 400X sebanyak lima lapang pandang yang dilanjutkan dengan pengamatan melalui program *immunoratio* untuk memperoleh rata-rata persentase area IL-6 setiap ulangan dari masing-masing kelompok. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan ragam ANOVA.

Hasil pengamatan ekspresi sitokin IL-6 pada tulang vertebrae (perbesaran 400X) tikus model *menopause* pada kelompok kontrol negatif (A), kelompok kontrol positif (B), kelompok terapi ekstrak bengkoang 400 mg/kgBB/hari (C), kelompok terapi ekstrak bengkoang 800 mg/kgBB/hari (D), dan kelompok terapi ekstrak bengkoang 1200 mg/kgBB/hari (E) memiliki perbedaan pada banyaknya ekspresi sitokin IL-6 yang ditunjukkan dengan warna coklat (tanda panah) yang berada pada sel – sel osteoklas bagian tulang trabekula muda (**Gambar 5.1**). Ekspresi sitokin IL-6 terendah ditunjukkan oleh kelompok A, sedangkan ekspresi tertinggi ditunjukkan oleh kelompok B. Pada kelompok terapi C, D, dan E menunjukkan telah terjadi penurunan ekspresi sitokin IL-6 yang ditandai dengan ekspresi warna coklat yang semakin berkurang



Gambar 5.1 Ekspresi IL-6 (warna coklat) pada tulang vertebrae tikus (*Rattus norvegicus*) model *menopause* (perbesaran 400x) dengan skala 300 μ m. Counterstain *Hematoxylene*.

Keterangan: A = Kontrol negatif; B = Kontrol positif; C = Terapi 1 (dosis 400 mg/kgBB/hari); D = Terapi 2 (dosis 800 mg/kgBB/hari); E = Terapi 3 (dosis 1200 mg/kgBB/hari). Ekspresi IL-6 ditunjukkan oleh tanda panah.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh data mengenai persentase ekspresi sitokin IL-6 pada sel-sel osteoklas bagian tulang trabekula muda vertebrae dari masing-masing kelompok, yaitu kontrol negatif, kontrol positif, terapi dosis 400, 800 dan 1200 mg/kgBB/hari. Terdapat perbedaan pada persentase ekspresi dari sitokin IL-6 oleh masing-masing kelompok perlakuan yang diberikan dosis berbeda. Rata-rata ekspresi IL-6 tertinggi ditunjukkan pada kelompok kontrol positif dan yang terendah adalah kelompok kontrol negatif yang disajikan pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Ekspresi IL-6 pada tulang vertebrae

No.	Kelompok	Rata-Rata Ekspresi IL-6 \pm SD	Peningkatan Ekspresi (%)	Penurunan Ekspresi (%)
1	K-	17,45 \pm 0,96 ^a	-	-
2	K+	69,6 \pm 1,66 ^d	75	-
3	P1	55,125 \pm 3,46 ^c	-	21
4	P2	36,9 \pm 1,87 ^b	-	47
5	P3	18,725 \pm 1,21 ^a	-	73

Keterangan: K- = Kontrol negatif; K+ = Kontrol positif; P1 = Terapi 1 (dosis 400 mg/kgBB/hari); P2 = Terapi 2 (dosis 800 mg/kgBB/hari); P3 = Terapi 3 (dosis 1200 mg/kgBB/hari). Notasi berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata antar perlakuan.

Berdasarkan hasil uji statistik *one way* ANOVA, menunjukkan bahwa terapi pemberian ekstrak bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) secara nyata ($p < 0,05$) menurunkan ekspresi IL-6 tulang vertebrae tikus model *menopause*. Kelompok (K+) memberikan pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok (K-). Hal ini menunjukkan bahwa kelompok (K+) mengalami kondisi osteoporosis sebagai akibat dari tindakan ovariektomi (pengangkatan ovarium bilateral) yang menyebabkan kadar estrogen menurun drastis sehingga terjadi peningkatan ekspresi IL-6 pada tulang vertebrae. Pada kelompok terapi (P1), (P2), dan (P3)

memberikan pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok (K+) dan (K-).

Kelompok (K-) menunjukkan ekspresi sitokin IL-6 yang paling rendah karena kelompok tersebut tidak diberi perlakuan ovariektomi sehingga hormon estrogen masih dihasilkan oleh sel teka interna. Estrogen dapat mempengaruhi proses diferensiasi, aktivasi, maupun apoptosis dari osteoklas. Dalam diferensiasi dan aktivasinya, estrogen menekan ekspresi RANK-L, M-CSF dari sel stroma osteoblas, dan mencegah terjadinya ikatan kompleks antara RANK-L dan RANK, dengan memproduksi reseptor OPG yang berkompetisi dengan RANK (Bell *et al.*, 2003).

Kelompok (K+) menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok A. Hal tersebut ditunjukkan pada peningkatan ekspresi sitokin IL-6 sebesar 75%. Peningkatan tersebut terjadi karena produksi hormon estrogen menurun drastis akibat tindakan ovariektomi. Estrogen yang menurun drastis menyebabkan osteoklastogenesis dan merangsang aktifitas osteoklas, sehingga proses pembentukan tulang terganggu. (Lee *et al.*, 2010).

Pada pemberian dosis 400 mg/kgBB/hari (P1), 800 mg/kgBB/hari (P2), dan 1200 mg/kgBB/hari (P3) mengalami penurunan ekspresi sitokin IL-6 sebesar 21%, 47%, dan 73%. Penurunan ekspresi yang paling tinggi ditunjukkan pada kelompok (P3) yaitu sebesar 73%. Hasil tersebut menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$) terhadap kelompok (K+). Penurunan tersebut menunjukkan bahwa terapi ekstrak bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) pada dosis terapi 1200 mg/kgBB/hari telah mampu menurunkan ekspresi sitokin IL-6 walaupun tidak berbeda nyata

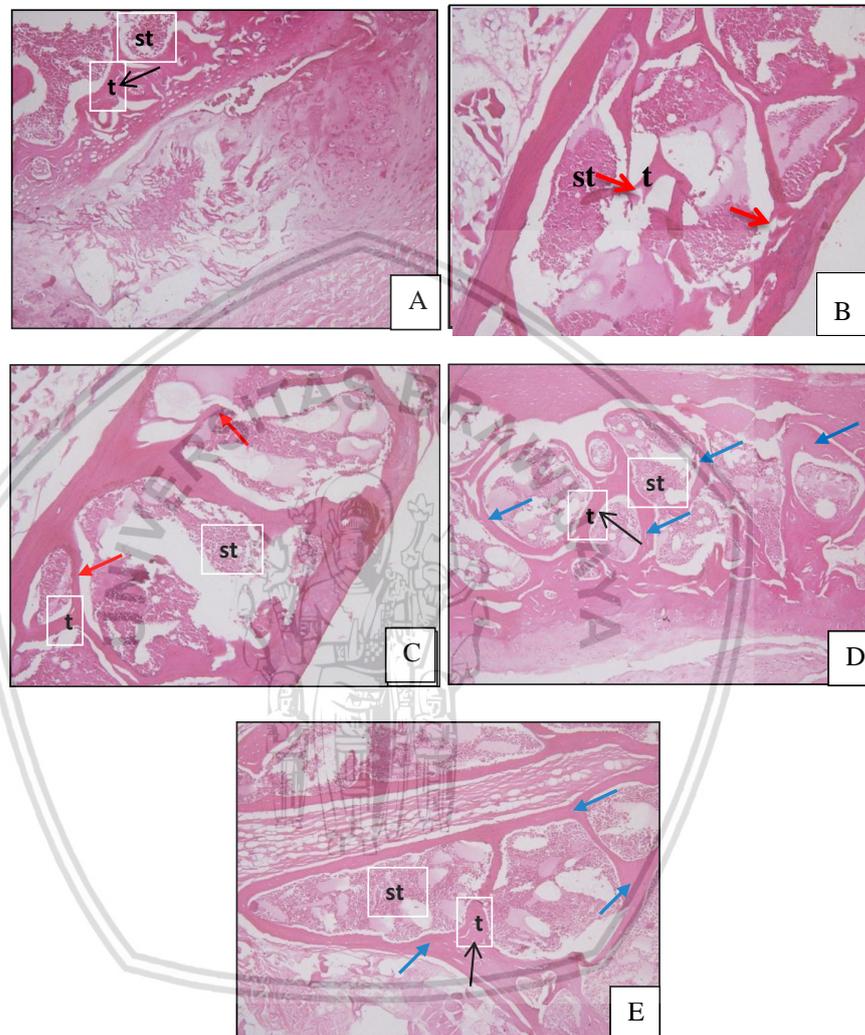
dengan kelompok (K-). Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian dosis terapi 1200 mg/kgBB/hari ekstrak bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) merupakan dosis terapi terbaik dalam penelitian ini.

Pemberian ekstrak bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) yang mengandung fitoestrogen berupa *daidzein* yang memiliki aktivitas estrogenik yang tinggi karena terkait dengan struktur kimia isoflavon menyerupai 17β estradiol. Berdasarkan hasil uji LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*), bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) memiliki kandungan isoflavon tertinggi yaitu *daidzein* yang berperan sebagai fitoestrogen yang mampu menimbulkan efek layaknya estrogen endogen sehingga dapat meningkatkan kadar estrogen dalam tubuh. Estrogen yang meningkat menyebabkan keseimbangan transport kalsium darah yang akan menurunkan kerja PTH dalam diferensiasi dan aktivasi osteoklas sehingga menyebabkan penurunan aktivitas osteoklas dalam resorpsi tulang. Sementara itu, keseimbangan transport kalsium juga dapat meningkatkan kerja hormon *calcitonin* sehingga mampu menghambat aktivitas osteoklas. Kondisi tersebut menyebabkan proses *remodelling* tulang menjadi stabil yaitu adanya keseimbangan antara resorpsi dan formasi tulang sehingga menghambat pengeroposan tulang.

5.2 Pengamatan Terapi Ekstrak Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) pada Gambaran Histopatologi Tulang Vertebrae

Penelitian pengaruh pemberian ekstrak bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap gambaran histopatologi caput tulang vertebrae tikus putih (*Rattus*

norvegicus) model *menopause* dibandingkan secara kualitatif. Pada tikus *menopause* terjadi perubahan pada luas permukaan trabekula.



Gambar 5.2. Gambaran histopatologi caput tulang vertebrae tikus (*Rattus norvegicus*) model *menopause* pada daerah trabekula counterstain *Hematoxylene-Eosin* perbesaran 400X.

Keterangan: A = kontrol negatif; B = kontrol positif; C = dosis 400 mg/kgBB/hari; D = dosis 800 mg/kgBB/hari; E = dosis 1200 mg/kgBB/hari. Notasi (t) menunjukkan tulang trabekula. Notasi (st) menunjukkan sumsum tulang. (←) menunjukkan kerusakan pada tulang trabekula vertebrae, (↔) menunjukkan remodelling tulang trabekula vertebrae

Pada gambaran histopatologi kelompok A, struktur tulang trabekula tampak jelas membentuk garis trayektori yang saling berhubungan. Pada gambaran histopatologi kelompok B atau tikus yang mendapat perlakuan ovariektomi tanpa terapi menunjukkan telah terjadi kerusakan jaringan tulang yang mengarah pada kejadian osteoporosis. Kerusakan tersebut ditandai dengan penipisan bagian sumsum tulang trabekula secara berlebih sehingga trabekula hampir tidak tampak. Pada gambaran histopatologi kelompok terapi C, D, dan E tulang trabekula mengalami penipisan dan adanya rongga yang terbentuk namun setelah diberi terapi ekstrak bengkoang struktur trabekula telah mengalami perbaikan. Kelompok B (kontrol positif) memiliki perbedaan struktur trabekula terhadap kelompok A (kontrol negatif). Hal tersebut ditandai dengan struktur trabekula kelompok B mengalami pengeroposan sehingga tulang trabekula hampir tidak tampak, sedangkan struktur trabekula kelompok A terlihat masih baik dilihat dari struktur spikula tulang yang saling berhubungan membentuk jaring-jaring (spikula). Perlakuan ovariektomi dan tidak diberikan terapi ekstrak bengkoang pada kelompok B menyebabkan terjadinya pengeroposan tulang yang berlebih.

Kelompok C (dosis 400 mg/kgBB/hari) memiliki perbedaan struktur trabekula terhadap kelompok B (kontrol positif). Struktur tulang trabekula pada kelompok C mengalami peningkatan perbaikan tulang trabekula yang dapat dilihat dari struktur spikula yang mengalami sedikit perbaikan jika dibandingkan dengan kelompok B sebagai efek dari terapi ekstrak bengkoang. Kelompok D (dosis 800 mg/kgBB/hari) memiliki struktur tulang trabekula yang terlihat lebih baik dibandingkan kelompok B dan C. Namun terdapat adanya rongga-rongga pada

jaringan tulang sebagai akibat dari perlakuan ovariectomi. Kelompok E (dosis 1200 mg/kgBB/hari) memiliki perbedaan struktur trabekula terhadap kelompok B (kontrol positif). Pada jaringan tulang kelompok E terlihat perbaikan tulang yang lebih baik dibandingkan kelompok C dan D, walaupun tidak terlihat lebih baik dari kelompok A. Sehingga pemberian dosis 1200 mg/kgBB/hari telah memberikan perbaikan maksimal pada struktur tulang trabekula yang telah mengalami pengeroposan tulang (osteoporosis) akibat ovariectomi yang diamati dari gambaran histopatologi caput tulang vertebrae.

Kondisi *menopause* diperoleh dengan melakukan tindakan ovariectomi sehingga menyebabkan produksi hormon estrogen dalam tubuh menurun secara drastis. Produksi hormon estrogen yang menurun akan menyebabkan relatif tingginya resorpsi tulang. Tindakan ovariectomi dapat menyebabkan penurunan kadar estrogen dalam tubuh sehingga terjadi penurunan transport kalsium yang akan berpengaruh pada *parathyroid hormone* (PTH) dan *calcitonin*. PTH berfungsi untuk mempercepat resorpsi tulang dengan menambah kecepatan diferensiasi sel-sel mesenkim menjadi osteoklas dan memperpanjang masa paruh sel-sel tersebut sehingga produksi PTH yang berlebih (hiperparatiriodisme) akan menyebabkan peningkatan aktivitas osteoklas. Sedangkan, hormon *calcitonin* yang disintesis oleh sel-sel parafollicular dari kelenjar tiroid dapat menghambat aktivitas osteoklas dengan berikatan dengan *calcitonin receptor* pada osteoklas. Jaringan tulang bersifat dinamis sehingga memerlukan proses *modelling-remodelling* untuk beradaptasi terhadap perannya sebagai pendukung kerangka dan regulator homeostasis mineral (Lerner, 2006). Apabila terjadi penurunan

produksi estrogen dan ketidakseimbangan transport kalsium, maka akan menyebabkan penurunan densitas tulang. Hal ini terjadi karena sel-sel osteoklas menangkap partikel-partikel matriks tulang dan kristal secara berlebihan melalui fagositosis yang akhirnya melarutkan benda-benda tersebut dan melepaskannya ke dalam darah (Karsdal *et al.*, 2007). Pemberian ekstrak bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) sebagai fitoestrogen mampu memberikan efek terapi pada peningkatan luas permukaan tulang trabekula pada caput tulang vertebrae. Fitoestrogen walaupun bukan hormon namun strukturnya mirip dengan estradiol dapat pula menduduki reseptor estrogen dan mampu menimbulkan efek layaknya estrogen endogenous sendiri (Glazier dan Bowman, 2001). Fitoestrogen mempunyai afinitas ikatan dengan reseptor estrogen yang terdapat di beberapa organ tubuh, yaitu uterus, ovarium, kelenjar mammae, tulang, hipotalamus, kelenjar pituitary, sel leydig, prostat, dan epididymis (Kim dan Park, 2012). Fitoestrogen merupakan suatu senyawa estrogen alam yang mampu berikatan dengan reseptor estrogen α dan β (Morito *et al.*, 2002).

Pachyrhizus erosus mengandung senyawa isoflavon dengan struktur menyerupai 17β -estradiol (Gruber *et al.*, 2002; Delmonte dan Rader, 2006). *Daidzein* merupakan senyawa isoflavon yang aktivitas estrogeniknya lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa isoflavon lainnya. Senyawa tersebut mampu meningkatkan kadar estrogen dalam tubuh sehingga penyerapan kalsium darah meningkat dan proses *remodelling* tulang akan stabil yaitu adanya keseimbangan antara resorpsi dan formasi tulang.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pemberian terapi ekstrak bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) menurunkan ekspresi IL-6 tulang vertebrae pada hewan model *menopause*. Dosis terapi 1200mg/kg BB/hari merupakan dosis terbaik karena memberikan efek terbaik terhadap penurunan ekspresi IL-6 tulang vertebrae.
2. Pemberian terapi ekstrak bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) memperbaiki gambaran histopatologi tulang vertebrae yang ditandai dengan penebalan lapisan tulang trabekula dibagian sumsum tulang vertebrae pada hewan model *menopause*. Dosis terapi 1200mg/kg BB/hari memberikan efek terbaik terhadap perbaikan gambaran histopatologi tulang vertebrae.

6.2 Saran

Perlu penelitian lebih lanjut tentang pemanfaatan ekstrak bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) untuk mengobati penyakit lainnya.



DAFTAR PUSTAKA

- Abid, M. 2005. *Pharmacological Evaluation of Pachyrhizus erosus (L) Seeds for CNS Activity* [Disertasi]. Bangalore: Rajiv Gandhi University of Health Science.
- Bonnelye, E., V. Kung, C. Laplace. 2002. Estrogen Receptor-Related Receptor α Impinges on The Estrogen Axis in Bone Potential Function in Osteoporosis. *J Endocrinology* 143(9):3658-70.
- Glazier, M.G., and M.A. Bowman. 2001. A Review of the Evidence for the Use of Phytoestrogens as a Replacement for Traditional Estrogen Replacement Therapy. *Arch Intern Med.* 161:1161-1172.
- Gruber, C.J., W. Tschugguel, C. Schneeberger, J.C. Huber. 2002. Production and Actions of Estrogens. *The New England Journal of Medicine*, 346(5):340-352.
- Iwamoto, J., Y. Sato., T. Takeda., and H. Matsumoto. 2008. Hip fracture protection by alendronate treatment in postmenopausal women with osteoporosis: a review of the literature. *Clinical Interventions in Aging*, 3 (3): 483-489.
- Kawiyana, I.K.S. 2009. *Osteoporosis Patogenesis, Diagnosis dan Penanganan Terkini*. Universitas Udayana. Denpasar
- Kawijayana, Siki. 2009. Interleukin-6 yang Tinggi Sebagai Faktor Risiko Terhadap Kejadian Osteoporosis Pada Wanita Pasca Menopause Defisiensi Estrogen. Artikel Majalah Interna. h: 18-24.
- Kusriningrum, R.S. 2010. *Perancangan Percobaan*. Surabaya. Airlangga University Press.
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat Dengan Hewan Coba*. Edisi pertama, Yogyakarta: Universitas Gajah Mada, h: 88-91.
- Lewiecki, E. M. 2008. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Obstetric Gynecology Clinical North America*, 35: 301-315.
- Manolagas, S.C. 2000. Birth and Death of Bone Cells Basic Regulatory Mechanism and Implications for The Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocrine Reviews* ; 21 (2): 115-37.
- Morito, K., T. Aomori, T. Hirose, J. Kinjo, J. Hasegawa, S. Ogawa, S. Inoue, M. Muramatsu, and Y. Masamune. 2002. Interaction of Phytoestrogens with Estrogen Receptors α dan β (II). *Biol. Pharm. Bull.* 25(1):48-52.

- Muntiha, M. 2001. *Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan Dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (H&E)*. Balai penelitian Veteriner. Bogor. 156-163.
- Noor, Z. 2014. *Buku Ajar Osteoporosis: Patofisiologi dan Peran Atom Mineral dalam Manajemen Terapi*. Jakarta: Salemba Medika
- Ott, S.M. 2002. Osteoporosis and bone physiology. *Journal Am Medic* 228:334-341.
- Quaedackers, M.E., D.B. Van, and S. Wissink. 2001. 4-hydroxytamoxipen transrepresses Nuclear factor-kb Activity in Human Osteoblastic U2-OS Cells Through Estrogen Receptor (ER) α and Not Through ER β . *J Endocrinology* 142:3
- Sabri, M. 2011. *Aktivitas Ekstrak Etanol Batang Sipatah-Patah (Cissus Quadrangula Salisb) Sebagai Antiosteoporosis Pada Tikus (Rattus Norvegicus)* [Skripsi] Program Studi Sains Veteriner, Sekolah Pascasarjana. IPB
- Saltel, F., A. Chabadel, Y. Zhao, M. Lafage-Proust, P. Clezardin, P. Jurdic, E. Bonnellye. 2006. Transmigration: A New Property of Mature Multinucleated Osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research*. 21 (12):1913-1923
- Schwiebert, R. 2007. *The Laboratory Mouse*. Laboratory Animals Centre National University of Singapore: 1-24.
- Suckow, M.A., C.L. Franklin, and H.W. Steven. 2006. *The Laboratory Rat*. Elsevier Academic Press. California. 371-372.
- Tandra. 2009. *Osteoporosis*. Jakarta. PT. Gramedia Pustaka Medika.
- Walker, M. L., J. G. Herndon. 2008. Minireview: Menopause in Nonhuman Primates. *J Biology of Reproduction* 79, 398-406.
- WHO. 2004. WHO Scientific Group on The Assesemnt of Osteoporosis at Primary Health Care Level. Summary Meeting Report. Brussels, Belgium 5-7 May 2004.
- Widyatmoko, Ardian, D. Hastutik, A. Sudarmanto, E. Lukitaningsih. 2016. Kandungan Vitamin C, Vitamin A dan *Alpha Hydroxy Acid* dalam Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*). *Trad. Med. Journal*. Vol. 21(1), p 48-54.
- Wisnu, T.J. 2009. The ovariectomized rat as an animal model for postmenopausal bone loss. *Cells and Materials* S1: 69-74.

Woo, D.G., C. Yong Ko, T.W. Lee, H. Sung Kim, and B. Yi Lee. 2005. Long-Term Study for the Effect of Ovariectomy on Rat Bone - Use of In-Vivo Micro-CT. *Journal World Academy of Science, Engineering and Technology*. 921-924.



