

**EFEKTIFITAS KOMBINASI EKSTRAK AIR DAUN CIPLUKAN
(*Physalis angulata* L.) DAN ALBUMIN TERHADAP JUMLAH
OSTEOKLAS TULANG TIBIA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)
STRAIN WISTAR PASCA OVARIEKTOMI**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

Kadek Putri Paramita Abyuda

165070101111074

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

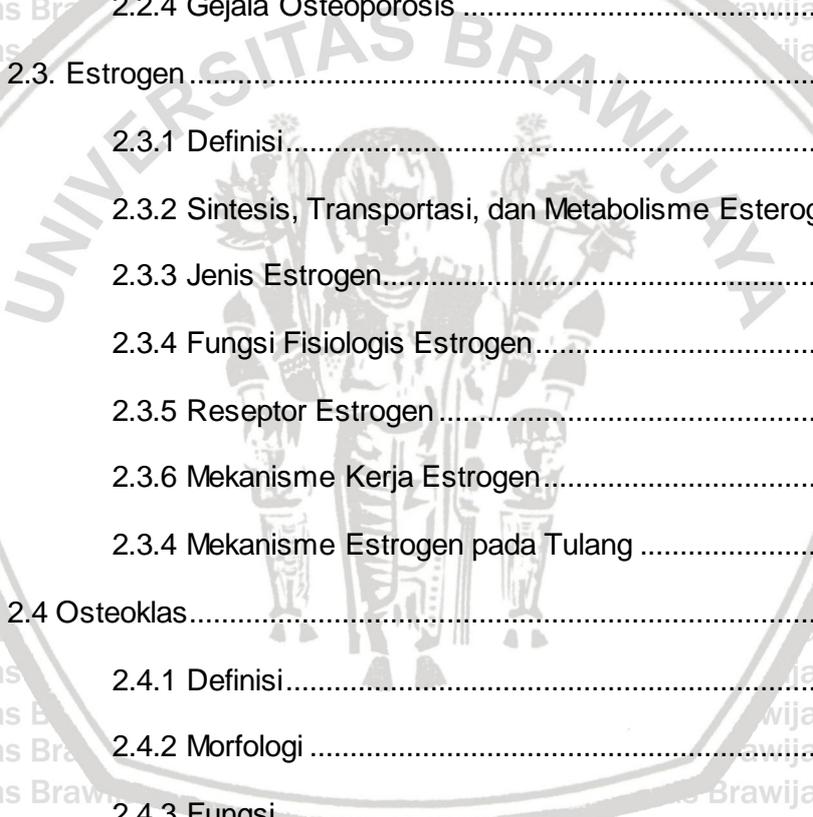
MALANG

2019

DAFTAR ISI

Judul	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak.....	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Tabel.....	xiv
Daftar Gambar.....	xv
Daftar Lampiran.....	xvi
Daftar Singkatan.....	xvii
BAB 1 Pendahuluan	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Akademis.....	5
1.4.2 Manfaat Praktis	5
BAB 2 Tinjauan Pustaka.....	6
2.1 Menopause.....	6
2.1.1 Definisi Menopause	6





2.1.2 Etiologi Menopause 6

2.1.3 Patofisiologi Menopause 7

2.1.4. *Post-Menopausal Syndrome* 8

2.2 Osteoporosis 8

2.2.1 Definisi Osteoporosis 8

2.2.2 Jenis Osteoporosis 9

2.2.3 Patogenesis Osteoporosis 10

2.2.4 Gejala Osteoporosis 11

2.3. Estrogen 12

2.3.1 Definisi 12

2.3.2 Sintesis, Transportasi, dan Metabolisme Esterogen 13

2.3.3 Jenis Estrogen 16

2.3.4 Fungsi Fisiologis Estrogen 16

2.3.5 Reseptor Estrogen 17

2.3.6 Mekanisme Kerja Estrogen 18

2.3.4 Mekanisme Estrogen pada Tulang 18

2.4 Osteoklas 20

2.4.1 Definisi 20

2.4.2 Morfologi 21

2.4.3 Fungsi 22

2.4.4 Regulasi 23

2.5 Albumin 24

2.5.1 Deskripsi 24

2.5.2 Hubungan Albumin dan Estrogen 25

2.6 Terapi Menopause 26



2.6.1 Deskripsi Umum.....	26
2.6.2 Efek Samping.....	28
2.6.3 Terapi Alternatif.....	28
2.7 Fitoestrogen.....	30
2.7.1 Definisi.....	30
2.7.2. Mekanisme Kerja Fitoestrogen.....	31
2.7.3 Efek Fisiologis Fitoestrogen.....	32
2.8. Ciplukan (<i>Physalis angulata L.</i>).....	33
2.8.1. Taksonomi Tanaman.....	33
2.8.2. Deskripsi, Distribusi, dan Morfologi Tanaman.....	33
2.8.3. Kandungan Kimia.....	34
2.8.4. Penggunaan di Masyarakat.....	35
2.8.5. Ekstrak Air Daun Ciplukan Sebagai Fitoestrogen.....	36
BAB 3 Kerangka Konsep dan Hipotesis Penelitian.....	38
3.1 Skema Kerangka Konseptual.....	38
3.2 Hipotesis Penelitian.....	40
BAB 4 Metode Penelitian.....	41
4.1 Rancangan Penelitian.....	41
4.2 Sampel Penelitian.....	41
4.3. Variabel Penelitian.....	42
4.3.1 Variabel Bebas.....	42
4.3.2 Variabel Tergantung.....	42
4.4. Tempat dan Waktu Penelitian.....	42
4.5. Instrumen Penelitian.....	43
4.5.1 Alat Penelitian.....	43

4.5.1.1. Alat Pembuatan Ekstrak Air Daun Physalis (EAP) dan Penyediaan Albumin.....	43
4.5.1.2. Alat Pemeliharaan Pemeliharaan Hewan Coba.....	43
4.5.1.3. Alat Ovariektomi Tikus.....	43
4.5.1.4. Alat Pemberian Perlakuan.....	43
4.5.1.5. Alat Pembedahan Tikus Pasca Ovariektomi dan Pengambilan Sampel.....	43
4.5.1.6. Alat Pembuatan Preparat Jaringan.....	43
4.5.1.7. Alat Pemeriksaan Histologi Sel Osteoklas.....	44
4.3.2 Bahan Penelitian.....	44
4.5.2.1. Bahan Pembuatan Ekstrak Air Daun Physalis (EAP) dan Albumin.....	44
4.5.2.2. Bahan Pemeliharaan Pemeliharaan Hewan Coba.....	44
4.5.2.3. Bahan Ovariektomi Tikus.....	44
4.5.2.4. Bahan Pemberian Perlakuan.....	44
4.5.2.5. Bahan Pembedahan Tikus Pasca Ovariektomi dan Pengambilan Sampel.....	45
4.5.2.6. Bahan Pembuatan Preparat Jaringan.....	45
4.6 Definisi Operasional.....	45
4.7 Prosedur Penelitian.....	46
4.7.1 Prosedur Persiapan.....	46
4.7.1.1 Persiapan Hewan Coba.....	46
4.7.1.2 Pengelompokan Hewan Coba.....	47
4.7.1.3. Pembuatan Ekstrak Air Daun Ciplukan dan Penyediaan Albumin.....	47

4.7.2	Prosedur Perlakuan Pada Hewan Coba	48
4.7.2.1.	Pembuatan Tikus Ovariectomi.....	48
4.7.2.2.	Pemberian Ekstrak Air Daun Ciplukan.....	49
4.7.3.	Prosedur Pembuatan Preparat Histologi	49
4.7.3.1.	Pengambilan Sampel Hewan Coba.....	49
4.7.3.2.	Pembuatan Preparat Histologi.....	50
4.7.3.3.	Pemeriksaan Histologi Untuk Menghitung Jumlah Osteoklas.....	52
4.8	Analisis Data	53
4.9.	Jadwal Penelitian.....	54
4.10.	Alur Penelitian	56
BAB 5	Hasil Penelitian dan Analisa Data	57
5.1	Hasil Penelitian.....	57
5.1.1	Gambaran Histologis Osteoklas	58
5.1.2	Hasil Perhitungan Osteoklas	59
5.2	Analisis Data	60
5.2.1	Uji Normalitas	61
5.2.2.	Uji Homogenitas	61
5.2.3	Uji <i>One Way ANOVA</i>	61
5.2.4	Uji <i>Post-Hoc Multiple Comparison</i>	62
5.2.5	Uji Korelasi <i>Pearson</i>	63
BAB 6	Pembahasan.....	65
6.1	Jumlah Osteoklas <i>Tikus Rattus novergicus</i> Strain Wistar pada Kontrol Negatif dan Kontrol Positif OVX 5 dan OVX 9.....	65



6.2 Osteoklas *Tikus Rattus norvegicus* Strain Wistar pada Kontrol Positif

OVX9, Kelompok Perlakuan Clplukan Dosis Tunggal dan Kombinasi . 66

6.3 Keterbatasan Penelitian 69

BAB 7 Penutup..... 70

7.1 Kesimpulan..... 70

7.2 Saran 71

Daftar Pustaka..... 72

Lampiran..... 77



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**EFEKTIFITAS KOMBINASI EKSTRAK AIR DAUN CIPLUKAN (*Physalis angulata*
L.) DAN ALBUMIN TERHADAP JUMLAH OSTEOKLAS TULANG TIBIA TIKUS
PUTIH (*Rattus norvegicus*) STRAIN WISTAR PASCA OVARIKTOMI**

Oleh :

Kadek Putri Paramita Abyuda

NIM. 165070101111074

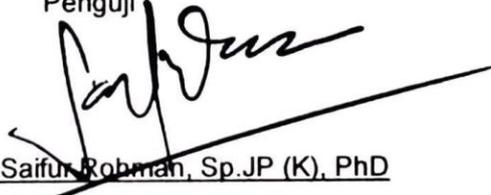
Telah diuji pada

Hari : Selasa

Tanggal : 10 Desember 2019

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji



dr. Mohammad Saifur Rohman, Sp.JP (K), PhD

NIP. 196810311997021001

Pembimbing I/Penguji II,

Pembimbing II/Penguji III,



Dr. drg. Nur Permatasari, MS

NIP. 196010051991032001



Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, Sp. OG(K)

NIP. 195706301984121001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran



dr. Tri Wahyu Astuti, M.Kes, Sp.P (K)

NIP. 196310221996012001

ABSTRAK

Abyuda, Kadek Putri Paramita. 2019. **Efektifitas Kombinasi Ekstrak Air Daun Ciplukan (*Physalis angulata* L.) dan Albumin Terhadap Jumlah Osteoklas Tulang Tibia Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar Pasca Ovariektomi.** Tugas akhir, Program Studi S1 Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. drg. Nur Permatasari, MS. (2) Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, Sp. OG(K).

Menopause merupakan keadaan saat siklus menstruasi berhenti secara permanen disebabkan akibat ovarium yang gagal memproduksi ovum, yang terjadi minimal 12 bulan berturut-turut. Keadaan ini menyebabkan defisiensi hormon estrogen pada wanita. Hormon estrogen bermanfaat salah satunya dalam proses *remodeling* tulang. Daun Ciplukan (*Physalis angulata* L.) mengandung senyawa aktif physalin dan withanolide dimana menurut penelitian sebelumnya dapat berpotensi sebagai fitoestrogen. Selain itu terdapat kondisi hipoalbumin pada wanita menopause. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efektifitas pemberian ekstrak air daun ciplukan dan albumin berbagai dosis dalam menurunkan jumlah sel osteoklas pada tulang tibia tikus putih pasca ovariektomi. Metode yang digunakan adalah eksperimental, dimana penelitian ini menggunakan tikus model menopause atau tikus ovariektomi selama 5 minggu yang kemudian di terapi selama 4 minggu dengan ekstrak air daun *physalis* dikombinasikan dengan albumin berbagai dosis, yang kemudian dilakukan pembedahan untuk mengambil tulang tibia dan diamati perubahan jumlah sel osteoklas dengan mikroskop. Hasil penelitian menunjukkan signifikansi saat diuji *one-way ANOVA* dengan nilai $p = 0.001$ dan $p=0.000$. Dan konsentrasi albumin saat ditambahkan ke ekstrak air daun ciplukan menunjukkan korelasi negatif terhadap jumlah osteoklas pada tikus dengan nilai korelasi yang kuat ($p = -0.659$). Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak air daun Ciplukan dengan kombinasi albumin dapat menurunkan jumlah sel osteoklas secara *in vivo*.

Kata kunci: *Physalis*, albumin, menopause, sel osteoklas, fitoestrogen, osteoporosis

ABSTRACT

Abyuda, Kadek Putri Paramita. 2019. **Combination Effect Water Extract of Ciplukan Leaves (*Physalis angulata*) Extract and Albumin towards Osteoclast Number Tibia Bone in Post Ovariectomy Wistar Strain Rats (*Rattus norvegicus*)**. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: : (1) Dr. drg. Nur Permatasari, MS. (2) Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, Sp. OG(K).

Menopause is a condition when the menstrual cycle stops permanently due to an ovary that fails to produce the ovum, which occurs at least 12 consecutive months. This situation causes deficiency of the estrogen hormone in women. Estrogen is one of the main hormones of women, which highly functioning in regulation in the body, one of them is in the process of bone remodeling. Ciplukan (*Physalis angulata* L.) leaves contain active compounds of physalin and withanolide which according to previous studies can be potential as phytoestrogens. In addition there is a condition of hypoalbumin in menopausal women. The purpose of this study was to determine the effectiveness of administration of water extracts of ciplukan leaves and albumin in various doses in reducing the number of osteoclast cells in the tibia bones of post ovariectomized white rats. The method used was experimental, in which this study used a menopausal mouse model or ovariectomy mouse for 5 weeks which was then treated for 4 weeks with physalis leaf water extract combined with various doses of albumin, which after 9 weeks were then surgically removed to collect the tibia bone and observed changes in the number of cells osteoclasts under the microscope. The results showed significance when tested one-way ANOVA with $p = 0.001$ and $p = 0.000$. And the concentration of albumin when added to the water extract of ciplukan leaves showed a negative correlation with the number of osteoclasts in rats with a strong correlation value ($p = -0.659$). The conclusion of this study is the water L extract of Ciplukan leaves with a combination of albumin can reduce the number of osteoclast cells in vivo.

Keywords: Physalis, albumin, menopause, osteoclast cells, phytoestrogens, osteoporosis.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Menurut *International Osteoporosis Foundation (IOF)*, 1 dari 4 wanita Indonesia dalam rentan usia 50 – 80 tahun memiliki risiko terkena osteoporosis, dimana wanita juga 4 kali lebih berisiko mengalami osteoporosis dibandingkan pria, dan lebih sering ditemukan wanita pasca menopause. Berdasarkan WHO, definisi menopause adalah keadaan dimana seorang wanita mengalami *amenorrhea* (atau tidak menstruasi) selama 12 bulan berturut-turut tanpa adanya penyebab patologis. Data Departemen Kesehatan Republik Indonesia, prevalensi terjadinya menopause pada wanita akan semakin bertambah seiring usia diprediksi pada tahun 2050 akan terdapat 200 juta kasus osteoporosis di dunia yang mana 50% dapat menyebabkan patah tulang panggul dan paha yang dapat menyebabkan cacat seumur hidup hingga kematian.

Terdapat berbagai tipe osteoporosis yaitu osteoporosis primer tipe-1 yang berkaitan dengan penurunan hormon, osteoporosis primer tipe-2 berkaitan dengan penuaan, osteoporosis sekunder yang berkaitan dengan penyakit penyerta atau penggunaan obat, dan osteoporosis idiopatik (Sipos *et al.*, 2009).

Pada wanita pasca menopause akan terjadi mekanisme osteoporosis primer baik tipe-1 dan tipe-2, dimana terjadinya penurunan signifikan terhadap hormon estrogen yang mempercepat pengeroposan tulang. Selama kehidupan, tulang mengalami dua jenis pertumbuhan tulang yang disebut *modelling* dan *remodeling*, proses *modelling* berakhir hingga akhir masa pubertas, sedangkan *remodeling* merupakan proses regenerasi yang terjadi terus menerus

dikarenakan *microfracture* yang terjadi pada tulang manusia sepanjang hidupnya.

Kedua proses pertumbuhan tulang ini diperankan oleh sel osteoblast dan penghancuran yang diperankan oleh osteoklas. Pada osteoporosis tipe-2 terjadi ketidakseimbangan proses reabsorpsi tulang, penyerapan terjadi lebih cepat dari kemampuan pembentukannya yang pada akhirnya menurunkan tingkat kepadatan tulang (Sandhu dan Hampson, 2016).

Pada keadaan menopause, defisiensi hormon estrogen menyebabkan peningkatan aktivitas osteoklas sehingga terjadi reabsorpsi tulang yang berlebihan. Estrogen pada wanita bekerja menekan diferensiasi osteoklas melalui penghambatan interaksi RANK dan RANKL, dengan produksi hormon OPG yang dihasilkan oleh osteoblast. Estrogen juga menghambat sitokin-sitokin pro-osteoklastogenesis seperti TNF- β , IL-6, IL-1, dan TNF- α . Selain melalui sitokin estrogen juga dapat menginduksi apoptosis osteoklas secara langsung sehingga dapat menurunkan aktivitas absorpsi (Sihombing, *et al.*, 2012). Pada tikus model menopause atau ovariectomi, Estrogen juga dapat menghambat faktor HIF1- α yang merupakan aktivator osteoklas, pada tikus pasca ovariectomi terjadi keadaan hipoestrogen yang menyebabkan tidak adanya yang menghambat rilis HIF1- α sebagai aktivator osteoklas (Miyamoto, 2015).

Dalam mengatasi kondisi *postmenopausal syndrome* terapi yang digunakan saat ini adalah terapi sulih hormon, yaitu dengan pemberian estrogen.

Terapi ini digunakan untuk mengurangi gejala-gejala menopause dan mencegah osteoporosis. Namun, pemberian estrogen ini berkontribusi pada munculnya beberapa penyakit *estrogen-dependent cancer*, seperti kanker payudara, kanker endometrium, dan kanker ovarium. Untuk itu munculah berbagai studi yang mengembangkan tentang fitoestrogen, yaitu senyawa

tanaman yang memiliki struktur mirip 17- β -oestradiol, mampu bekerja pada reseptor estrogen (Usui 2006), yang biasanya ditemukan pada tanaman kacang-kacangan dan biji-bijian (Rietjens *et al.*, 2016).

Ciplukan (*Physalis angulata* L.) merupakan tumbuhan herbal yang bisa hidup sepanjang tahun di Indonesia. Menurut penelitian sebelumnya, Ciplukan mengandung senyawa aktif physalin dan withanolide yang bermanfaat sebagai anti inflamasi, dapat menekan sitokin-sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , IL-1, IL-6, dan IL-12, yang dapat bekerja sebagai inhibisi produksi osteoklas berlebihan. (Soares *et al.*, 2006). Berdasarkan hasil penelitian secara *in vitro* pada kultur sel endotel menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun *Physalis* dosis 1500mg/kgBB mempunyai kerja yang menyerupai estrogen yaitu dapat meningkatkan ekspresi seluler *estrogen receptor* dan *endothelial nitric oxide* dan meningkatkan produksi *nitric oxide* pada HUVECs (Permatasari *et al.*, 2010). Dan pada penelitian lanjutan dosis 1500mg/kgBB dapat memperbaiki kadar MDA tulang mandibula tikus model menopause yang dilakukan dengan perlakuan ovariektomi (Permatasari *et al.*, 2017). Sedangkan menurut Lestari *et al.* (2016) pada tikus model menopause, terjadi peningkatan TNF- α yang mana bisa menimbulkan fibrosis pada ventrikel.

Dan dengan pemberian ciplukan menurunkan terjadinya fibrosis ventrikel yang mana menunjukkan potensi ciplukan dalam menghambat TNF- α . Dengan demikian, ciplukan memiliki potensi sebagai fitoestrogen,

Selain itu, keadaan hipoestrogen pada wanita menopause pada wanita menopause mempengaruhi kadar albumin dalam tubuh. Menurut Ahn *et al.* (2016), Estrogen dapat bekerja pada *renin angiotensin aldosterone system*, pada tikus didapatkan estrogen mampu menurunkan kerja *Angiotensin Converting Enzyme*, sehingga dapat terjadi penurunan pada tekanan arteri eferen dan

tekanan intraglomerular yang menurunkan angka terjadinya albuminuria.

Albumin merupakan protein utama dalam plasma darah. Fungsi utama albumin adalah untuk mengangkut berbagai ligan, transport metabolit, *plasma buffer* untuk mempertahankan tekanan onkotik plasma (Devaraj *et al.*, 2015). Total serum protein dan kadar albumin menurun secara signifikan pada wanita menopause (Jagtap *et al.*, 2017). Afshinnia *et al.*, (2016) menemukan bahwa kadar albumin kurang dari 3 g/dL meningkatkan kemungkinan terjadinya osteoporosis tiga kali lipat pada manusia, dan menyarankan adanya hubungan independen antara osteoporosis dan hipoalbumin.

Berdasarkan uraian diatas, maka perlu diteliti lebih lanjut tentang pengaruh pemberian kombinasi ekstrak air daun Ciplukan (*Physalis angulata L.*) dan albumin pada penurunan kadar osteoklas pada tikus pasca ovariektomi untuk mengetahui potensi ciplukan sebagai alternatif obat pada osteoporosis akibat *post-menopausal syndrome*.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas maka penelitian ini tujuan untuk menjawab rumusan masalah sebagai berikut:

Apakah kombinasi ekstrak air daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dan albumin dapat menurunkan jumlah osteoklas tulang tibia tikus putih (*rattus norvegicus*) strain wistar pasca ovariektomi?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan membuktikan bahwa kombinasi ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dengan albumin

dapat menurunkan jumlah osteoklas tulang tibia tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar pasca ovariektomi.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Mengetahui dan membandingkan jumlah osteoklas pada tulang tibia tikus tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar pasca ovariektomi dan tidak dilakukan ovariektomi.
2. Mengetahui dan membandingkan jumlah osteoklas pada tulang tibia tikus tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar pasca ovariektomi yang diberikan kombinasi ekstrak air daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dan albumin dalam berbagai dosis albumin dan tanpa albumin
3. Mengetahui hubungan *dose-response* kombinasi ekstrak air daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dengan albumin dalam menurunkan jumlah osteoklas tulang tibia tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar pasca ovariektomi.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Akademis

Dapat digunakan sebagai dasar teori untuk mengembangkan penelitian dari khasiat ciplukan (*Physalis angulata L.*).

1.4.2. Manfaat Praktis

Dapat menambah ilmu yang dapat dikembangkan dalam terapi osteoporosis pada *post-menopausal syndrome* dan juga menjadi alternatif pengobatan osteoporosis.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Menopause

2.1.1. Definisi Menopause

Menopause adalah keadaan siklus menstruasi berhenti secara permanen disebabkan karena keadaan ovarium yang gagal memproduksi estrogen.

Menurut WHO menopause keadaan ini minimal terjadi selama 12 bulan berturut-turut tanpa adanya penyebab patologi. Menopause adalah bagian alami dari penuaan yang biasanya terjadi antara usia 45 dan 55 tahun dimana terjadi perubahan keseimbangan hormon seks tubuh yang terjadi saat usia bertambah.

2.1.2. Etiologi Menopause

Menopause terjadi saat simpanan folikel di dalam ovarium telah berkurang dan ketidakmampuan untuk mempertahankan siklus menstruasi. Menopause merupakan penanda berakhirnya masa reproduktif seorang wanita. Selama proses menopause seorang wanita mengalami perubahan baik mental maupun fisik (Voorhuis *et al*, 2010).

Sepanjang kehidupan seksual seorang wanita kira kira 400 folikel primodial tubuh menjadi folikel vesikuler dan berevolusi. Sementara beratus ratus dan ribuan ovum berdegenerasi. Pada usia sekitar 45 tahun, hanya tinggal beberapa folikel primodial tetap tertinggal untuk dirangsang oleh FSH dan LH, dan pembentukan estrogen oleh ovarium berkurang bila jumlah folikel primodial mendekati nol. Bila pembentukan estrogen turun sampai tingkat kritis, estrogen tidak dapat lagi menghambat pembentukan FSH dan LH yang cukup untuk menyebabkan siklus ovulasi. Akibatnya, FSH dan LH (terutama FSH) setelah itu

dihasilkan dulu jumlah besar dan tetap. Estrogen dihasilkan dalam jumlah subkritis dalam waktu pendek setelah menopause, tetapi setelah beberapa tahun, waktu sisa terakhir. Folikel primodial menjadi atretis, pembentukan estrogen oleh ovarium turun sampai nol (Guyton, 2010).

2.1.3. Patofisiologi Menopause

Pada saat usia tersebut, kondisi kadar hormon yang naik turun akan menyebabkan berbagai gangguan. Ada dua faktor utama yang berperan dalam hal ini. Pertama, lebih sedikit folikel yang matang, selanjutnya produksi sel telur mulai berkurang, dan mengakibatkan ovulasi tidak terjadi pada setiap siklus menstruasi (Ismiyati, 2010).

Konsekuensi dari perubahan tersebut adalah pola baru perubahan kadar hormon selama siklus menstruasi. Pertama, jika folikel tidak matang, hanya sedikit estrogen yang diproduksi selama dua minggu pertama siklus. Karena tidak ada sel telur yang matang dalam folikel, maka folikel itu tidak dapat melepaskan sel telur. Jika ovulasi tidak terjadi, maka tidak akan ada progesteron sehingga efek progesteron tidak terjadi. Kedua, gagalnya ovarium mengeluarkan sel telur yang matang akan menyebabkan kadar estrogen turun menjadi sangat rendah sehingga lapisan endometrium tidak terstimulasi untuk menyiapkan sel telur yang dibuahi. Hal ini menyebabkan menstruasi tidak terjadi.

Ketika kadar estrogen dan progesteron menurun, kelenjar hipotalamus dan kelenjar pituitary berusaha untuk mengoreksi keadaan ini dengan meningkatkan produksi FSH dan LH untuk menstimulasi ovarium melakukan fungsinya. Jika ovarium tidak mampu bereaksi dengan mematangkan folikel dalam setiap siklus, kadar FSH dan LH yang tinggi ini akan mengganggu kerja normal sistem tubuh lainnya termasuk metabolisme, kimiawi otak, dan keadaan tulang (Ismiyati,

2010). Yang selanjutnya dapat menyebabkan munculnya *Post-Menopausal Syndrome* pada perempuan pasca menopause.

2.1.4. *Post-Menopausal Syndrome*

Post-Menopausal Syndrome adalah kumpulan gejala yang ditimbulkan akibat hilangnya fungsi ovarium dan mereka yang berasal dari proses penuaan atau dari tekanan sosio-lingkungan hidup dari usia paruh baya. Banyak gejala yang dapat ditimbulkan pada *post-menopausal syndrome* seperti *hot flushes*, iritabilitas, perubahan suasana hati, insomnia, vagina kering, kesulitan berkonsentrasi, kebingungan mental, inkontinensia, gejala osteoporosis, depresi, sakit kepala, gejala vasomotor, insomnia, dan lain sebagainya. (Dalal dan Agarwal, 2015)

Selama tahap ini, gejala menopause, seperti *hot flashes*, dapat meringankan pada banyak perempuan. Tapi, sebagai hasil dari tingkat estrogen yang lebih rendah, wanita menopause berada pada peningkatan risiko untuk sejumlah kondisi kesehatan, seperti osteoporosis dan penyakit jantung. Obat-obatan, seperti terapi hormon dan / atau perubahan gaya hidup sehat, dapat mengurangi risiko beberapa kondisi ini.

2.2. Osteoporosis

2.2.1. Definisi Osteoporosis

Osteoporosis berasal dari kata *osteon* dan *porous*, *osteon* artinya tulang, dan *porous* berarti berlubang-lubang atau keropos. Jadi, osteoporosis adalah tulang yang keropos, yaitu penyakit yang mempunyai sifat khas berupa masa tulangnya rendah atau berkurang, disertai gangguan mikro-arsitektur tulang dan penurunan kualitas jaringan tulang, yang dapat menimbulkan kerapuhan tulang (Rachner, 2011).

Osteoporosis sering dijuluki "*silent thief*" mencuri massa tulang secara diam-diam dan juga "*silent disease*" menimbulkan gejala bila penurunan densitas tulang lebih dari 30% dan biasa gejala yang ditimbulkan berupa fraktur.

Seseorang dikatakan osteoporosis, jika T-score hasil pemeriksaan gold standardnya yaitu DXA $< -2,5$ (Rachner, 2011).

2.2.2. Jenis Osteoporosis

Terdapat 3 jenis osteoporosis berdasarkan penyebabnya:

1. Osteoporosis Primer

Osteoporosis primer adalah kehilangan massa tulang yang terjadi sesuai dengan proses penuaan. Menurut infoDatin 2015 osteoporosis primer ini terdiri dari 2 bagian yaitu

a. Tipe I (*Hormone-related*)

Berkurangnya hormon estrogen pada wanita pasca menopause, dimana hormon estrogen membantu mengatur pengangkutan kalsium kedalam tulang.

Biasanya gejala timbul pada perempuan yang berusia antara 51-75 tahun, tetapi dapat muncul lebih cepat atau lebih lambat. Penurunan produksi estrogen terjadi 2-3 tahun sebelum menopause dan terus berlangsung 3-4 tahun setelah menopause. Hal ini berakibat menurunnya massa tulang sebanyak 1-3% dalam waktu 5-7 tahun pertama setelah menopause.

b. Tipe 2 : Osteoporosis *senile*/penuaan

Merupakan akibat dari kekurangan kalsium yang berhubungan dengan usia dan ketidakseimbangan antara kecepatan hancurnya tulang (osteoklas) dan pembentukan tulang baru (osteoblas). Senilis berarti bahwa keadaan ini hanya terjadi pada usia lanjut. Penyakit ini biasanya terjadi pada orang-orang

berusia diatas 70 tahun dan 2 kali lebih sering menyerang wanita. Wanita sering kali menderita osteoporosis senilis dan pasca menopause.

2. Osteoporosis Sekunder

Osteoporosis sekunder disebabkan oleh keadaan medis lain, penggunaan obat-obatan, dan juga diperberat dengan kesalahan pada gaya hidup seperti konsumsi alkohol secara berlebihan, rokok, kafein, dan kurangnya aktifitas fisik. Pada jenis ini terjadi penurunan densitas tulang dengan cukup berat yang bisa saja terjadi pada orang yang masih berusia muda.

3. Osteoporosis Idiopatik

Osteoporosis juvenil idiopatik merupakan jenis osteoporosis yang penyebabnya tidak diketahui. Sering dihubungkan dengan keadaan hipogonadisme, penyalahgunaan tembakau, penyakit gastrointestinal, imobilisasi, penggunaan glukokortikoid kronis (lebih dari 5 mg / hari selama lebih dari tiga bulan), penyalahgunaan alkohol, dan hiperkalsemia. Hipogonadotropik hipogonadisme (HH) atau hipogonadisme sekunder didefinisikan sebagai sindrom klinis yang dihasilkan dari kegagalan gonad hasil kadar gonadotropin hipofisis yang abnormal. HH dapat dihasilkan dari sekresi GnRH hipotalamus hipotalamus yang tidak ada atau tidak memadai atau gagal sekresi gonadotropin hipofisis. Menyebabkan penurunan pada kadar FSH dan LH dalam tubuh. (Silviera, 2013)

2.2.3. Patogenesis Osteoporosis

Pada tulang yang normal, kecepatan pembentukan dan resorpsi tulang bersifat konstan pergantian segera disertai resorpsi, dan jumlah tulang yang digantikan sama dengan jumlah tulang yang diresorpsi.

Tulang terus dirombak sepanjang hidup kita sebagai respons terhadap microtrauma. Remodeling tulang selalu diikuti oleh pembentukan tulang, sebuah fenomena yang disebut sebagai koping.

Pada tulang yang normal, kecepatan pembentukan dan resorpsi tulang bersifat konstan pergantian segera disertai resorpsi, dan jumlah tulang yang digantikan sama dengan jumlah tulang yang diresorpsi.

Osteoklas, berasal dari prekursor hematopoietik, bertanggung jawab untuk resorpsi tulang, sedangkan osteoblas, dari sel mesenkim, bertanggung jawab untuk pembentukan tulang. Pada osteoporosis, mekanisme coupling antara osteoklas dan osteoblas diperkirakan tidak mampu menyeimbangkan mikrotrauma yang konstan terjadi pada tulang trabecular. (Raisz, 2005) Sel-sel yang menyebabkan pengikisan tulang (osteoklas) mulai membuat kanal dan lubang dalam tulang lebih cepat daripada kerja sel-sel pemicu pembentukan tulang (osteoblas) yang membuat tulang baru untuk mengisi lubang tersebut.

Osteoklas membutuhkan beberapa minggu untuk menyerap tulang, sedangkan osteoblas membutuhkan bulan untuk menghasilkan tulang baru. Oleh karena itu, setiap proses yang meningkatkan laju remodeling tulang menghasilkan keropos tulang bersih dari waktu ke waktu. (Alexander, 2010)

Selanjutnya, dalam periode terjadinya remodeling yang cepat (misalnya, setelah menopause), tulang berada pada peningkatan risiko fraktur karena tulang yang baru diproduksi kurang padat mineral, situs resorpsi yang tidak terisi sementara, dan isomerisasi dan maturasi kolagen terganggu. (Seeman, 2006)

2.2.4. Gejala Osteoporosis

Osteoporosis dapat muncul tanpa sengaja selama beberapa dekade karena osteoporosis tidak menyebabkan gejala hingga mereka jatuh, menabrak sesuatu,

atau terpelelet dan mengalami patah tulang. Selain itu, beberapa fraktur osteoporosis dapat lolos deteksi selama bertahun-tahun karena tidak memperlihatkan gejala. Gejala yang berhubungan dengan patah tulang osteoporosis biasanya adalah nyeri. Lokasi nyeri tergantung pada lokasi fraktur.

Akan tetapi, ada beberapa tanda yang harus diwaspadai, antara lain seperti:

1. Nyeri tulang dan sendi terutama jika nyeri dipunggung saat dibuat berdiri, berjalan beraktivitas dan disentuh. Sifat nyerinya tersebut tajam atau seperti terbakar bisa karena adanya fraktur.
2. Deformitas atau perubahan bentuk tulang seperti kifosis dan jari jari tangan dan kaki terlihat membengkok atau adanya perubahan abnormal.
3. Patah tulang (fraktur).
4. Kerangka tulang semakin memendek atau punggung semakin membungkuk (penurunan tinggi badan).
5. Nafsu makan menurun menjadikan berat badan menurun atau kurus.
6. Sesak nafas karena organ tubuh semakin berdekatan karena tulang tidak mampu menyangga lagi.

Oleh karena osteoporosis tidak menunjukkan tanda dan gejala yang jelas, maka untuk mendiagnosis osteoporosis dapat dilakukan dengan pemeriksaan Densitas Massa Tulang atau Bone Mass Density (BMD), dengan metode *Dual-Energy X-ray Absorptiometry (DEXA)* akan mendapatkan hasil terbaik.

(Alexander, 2010)

2.3. Estrogen

2.3.1. Definisi

Estrogen (juga disebut oestrogen) adalah senyawa steroid yang berfungsi sebagai hormon seks primer pada wanita. Pada manusia senyawa ini dibentuk

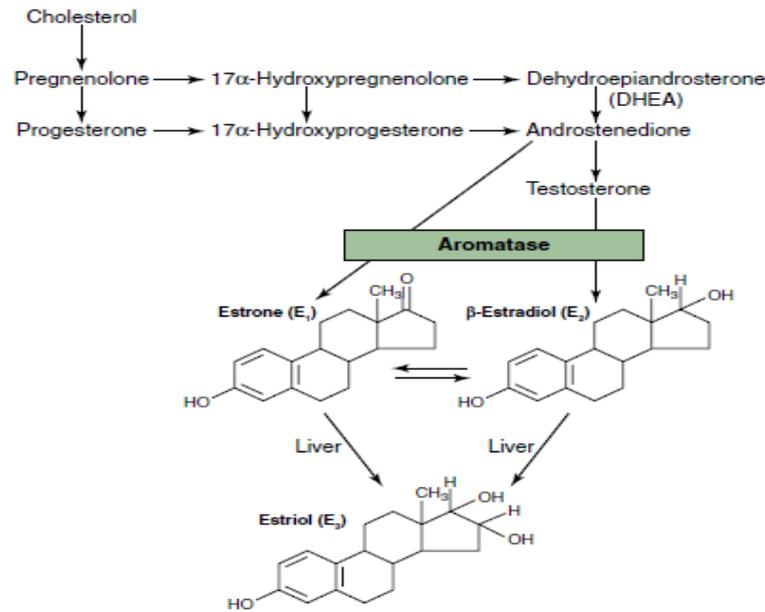
pada korteks adreanal dan gonad pada laki-laki maupun perempuan (Dorland, 2006).

Pada wanita, estrogen diproduksi terutama di ovarium. Ovarium adalah kelenjar berukuran besar yang terletak di rahim dan merupakan bagian dari sistem endokrin (Marie B., 2013). Estrogen juga diproduksi oleh sel-sel lemak dan kelenjar adrenal. Pada wanita hormon ini bertanggung jawab untuk pengembangan dan pengaturan sistem reproduksi dan karakteristik seks sekunder, seperti payudara, pinggul yang lebih lebar, rambut kemaluan dan rambut ketiak. Ada tiga jenis estrogen endogen utama pada wanita yang memiliki aktivitas hormon estrogenik: estrone, estradiol, dan estriol.

2.3.2. Sintesis, Transportasi, dan Metabolisme Estrogen

Estrogen diproduksi terutama oleh ovarium. Mereka dilepaskan oleh folikel pada ovarium dan juga disekresikan oleh korpus luteum setelah sel telur dilepaskan dari folikel dan dari plasenta.

Stimulasi untuk sekresi estrogen berasal dari hormon Luteinizing (LH) dari kelenjar pituitari anterior. Estrogen disintesis dalam sel teka interna di ovarium. Molekul utama yang mengawali sintesis estrogen adalah kolesterol. Ini membentuk androstenodione. Androstenedion adalah substansi aktivitas androgenik moderat. Senyawa ini melintasi membran basal ke dalam sel granulosa sekitarnya, di mana diubah menjadi estrone atau estradiol, baik segera atau melalui testosteron.



Gambar 2.1 Proses terjadinya biosintesis estrogen (Guyton and Hall, 2010)

Konversi testosteron menjadi estradiol, dan androstenedione menjadi estrone, dikatalisis oleh enzim aromatase. Androstenedion adalah substansi aktivitas androgenik lemah yang berfungsi terutama sebagai prekursor untuk androgen lebih kuat seperti testosteron serta estrogen. Senyawa ini melintasi membran basal ke dalam sel granulosa sekitarnya, di mana ia dikonversi baik langsung menjadi estrone, atau menjadi testosteron dan kemudian estradiol dalam langkah tambahan. Konversi androstenedione menjadi testosteron dikatalisis oleh 17β -hydroxysteroid dehydrogenase (17β -HSD), sedangkan konversi androstenedione dan testosteron menjadi estrone dan estradiol, masing-masing dikatalisis oleh aromatase, enzim yang keduanya diekspresikan dalam sel granulosa. Sebaliknya, sel granulosa kekurangan 17α -hydroxylase dan $17,20$ -lyase, sedangkan sel teka mengekspresikan enzim ini dan 17β -HSD tetapi tidak memiliki aromatase.

Oleh karena itu, baik granulosa dan sel teka sangat penting untuk produksi estrogen di ovarium. (Guyton and Hall, 2010)

2.3.3. Jenis Estrogen

Estrogen adalah hormone alami yang dihasilkan oleh ovarium, terdapat 3 jenis utama yang ditemukan dalam tubuh yaitu estrone (E1), estradiol 17 β -estradiol (E2), dan estriol (E3). Estradiol (E2) adalah bentuk yang paling umum ditemukan pada wanita tidak hamil (Katzung, 2010). Kadar estradiol bervariasi melalui siklus menstruasi, dengan tingkat tertinggi tepat sebelum ovulasi. Dari menarche hingga menopause, estrogen primer adalah 17 β -estradiol. Setelah usia reproduksi, ketika seorang wanita telah mencapai menopause, estrone atau E1 menjadi estrogen utama. Estrone lebih lemah dari estradiol. (Stephen, 2007).

Estriol (E3) akan signifikan di produksi pada masa kehamilan. Estriol banyak di sintesis pada plasenta, maka sangat sulit untuk mendeteksi kadar estriol pada wanita yang tidak hamil (Strauss, *et al*, 2013).

2.3.4. Fungsi Fisiologis Estrogen

Estrogen secara fisiologis utamanya berfungsi meningkatkan proliferasi dan pertumbuhan sel-sel spesifik dalam tubuh yang bertanggung jawab untuk pengembangan karakteristik seksual yang sekunder dari perempuan, seperti payudara, pinggul yang lebih lebar, rambut kemaluan dan rambut ketiak. (Guyton and Hall, 2010)

Estrogen juga memiliki fungsi fisiologis pada organ lainnya seperti untuk metabolisme pertumbuhan sintesa *growth hormone*, percepatan pertumbuhan tulang, metabolisme kulit, penambahan berat uterus, kontraksi fibriae menjelang ovulasi, kornifikasi sel epitel vagina, pertumbuhan saluran dalam kelenjar susu. Selain itu estrogen pada teca interna dalam folikel ovarium dapat mengumpan balik secara positif atau negatif dengan FSH dan LH pada hipofisa. (Guyton and Hall, 2010)

2.3.5. Reseptor Estrogen

Estrogen bekerja melalui ikatan dengan reseptor estrogen (ER). Reseptor estrogen (ER) adalah sekelompok protein yang ditemukan di dalam sel. Mereka adalah reseptor yang diaktifkan oleh hormon estrogen (*17 β -estradiol*). Reseptor estrogen terdiri dari 595 asam amino yang memiliki 6 jenis domain yaitu domain A, B, C, D, E, dan F, tiap domain memiliki fungsinya masing-masing. Dimana domain A dan B yang bertugas dalam transkripsi, Domain C sebagai pengikat DNA, Domain E berfungsi mengikat estrogen atau disebut *Ligand Binding Domain (LBD)* dan domain F berfungsi dalam ikatan agonist dan antagonis terhadap estrogen (Klinge, 2000).

Terdapat dua kelas ER yaitu reseptor estrogen nucleus ER α dan ER β , yang merupakan anggota famili reseptor intraseluler reseptor inti, dan reseptor estrogen membran (MER) (GPER (GPR30), ER-X, dan Gq-mER), yang kebanyakan reseptor G protein-coupled.

Dua reseptor estrogen ini mengandung *DNA-binding, hormone-binding*. Estrogen akan masuk ke dalam sel, tapi hanya sel yang mengandung reseptor estrogen yang akan merespon. Reseptor ini biasanya berlokasi di inti, tetapi dapat berpindah ke sitoplasma melalui proses yang disebut *nucleocytoplasmic shuttling*. Setelah estrogen mengikat reseptor, kemudian terjadi aktivasi transkripsi. Hal ini juga diketahui bahwa estradiol memiliki efek negatif-umpan balik pada sekresi *follicle stimulating hormone (FSH)*. Efek negatif-umpan balik ini adalah efek langsung dari estradiol digabungkan ke reseptor, menyebabkan represi FSH- β pada subunit transkripsi (Beshay, 2013).

Kedua ER secara luas diekspresikan dalam tipe jaringan yang berbeda, namun ada beberapa perbedaan penting dalam pola ekspresi mereka: ER α

ditemukan di endometrium, sel pembuluh darah, sel osteoklas, sel osteoblast, sel kanker payudara, sel stroma ovarium, dan hipotalamus. Pada laki-laki, protein ER α ditemukan di epitel duktus eferen; Ekspresi protein ER β telah didokumentasikan dalam sel granulosa ovarium, ginjal, otak, tulang, jantung, paru-paru, mukosa usus, prostat, dan sel-sel endotel (Couse *et al.*, 1997).

2.3.6. Mekanisme Kerja Estrogen

Ada dua jenis reseptor estrogen (ER) yaitu ER α dan ER β yang merupakan produk kedua gen yang berbeda. Setiap reseptor memiliki beberapa domain fungsional berbeda (Murray *et al.*, 2002). Ketika molekul estrogen berikatan dengan reseptornya maka akan terjadi disosiasi dari sitoplasmanya *protein receptor associated*. Kompleks *hormone-receptor* ini akan berpindah ke nukleus dan berikatan dengan DNA dan menginisiasikan transkripsi. Transkripsi dikatalisa oleh *RNA Polymerase II* dan membutuhkan berbagai macam protein, termasuk *TATA Box binding protein* (TBP). Karena teraktivasi, fosforilasi reseptor estrogen bereaksi pada beberapa protein seperti P160, CBP, yang berikatan melalui *DNA-binding domain* (DBD) untuk menstimulasi transkripsi (Gruber, *et al.*, 2002)

2.3.7. Mekanisme Estrogen pada Tulang

Estrogen memiliki peran penting dalam terjadinya *remodelling* pada tulang, dimana estrogen mempengaruhi kerja 2 sel utama pada tulang yaitu osteoblast dan osteoklas. Osteoblast sebagai sel yang membentuk matriks-matriks tulang dan osteoklas merupakan sel yang bertugas dalam menghancurkan dan mengabsorpsi tulang. Dan pada osteoblast dan osteoklas terdapat ER α dan ER β yang mana menunjukkan kerja mereka sangat dipengaruhi oleh kadar estrogen yang terdapat dalam tubuh (Khalid and Krum, 2016).

Estrogen sendiri memiliki efek proteksi terhadap tulang dengan beberapa mekanisme, yaitu:

1. Menurunkan sitokin pro-osteoklastogenesis atau sitokin yang menjadi prekursor pembentukan osteoklas seperti: IL-1, IL-6, IL-7, dan TNF- α (Khalid and Krum, 2016). Interleukin-6 dapat mempromosikan terjadinya hematopoiesis dan osteoklastogenesis, dimana produksi IL-6 di sumsum tulang padat ditekan oleh estradiol. Saat estrogen menurun maka menurun pula penekanan pada produksi IL-6, dan tidak terjadinya induksi untuk pembentukan osteoklast (Jilka, 1992). Penurunan sitokin ini bekerja lewat penghambatan jalur *the nuclear factor κ B* (NF κ B) (Khalid, A.B. and Krum, S.A., 2016).
2. Estrogen juga dapat menginduksi apoptosis pada osteoklas. Dimana E2 atau estradiol mengaktifasi reseptor estrogen alpha / ER α menginduksi transkripsi *Fas Ligand* (FasL) dalam osteoblast dan juga osteoklas. FasL dibelah dari permukaan sel oleh MMP3, dan FasL yang larut menginduksi apoptosis osteoklas. E2 melalui ER α berikatan dengan peningkat di dekat FasL dan menginduksi transkripsi FasL dalam osteoblast yang menghasilkan sinyal parakrin dan dalam osteoklas menghasilkan sinyal autokrin untuk menginduksi apoptosis osteoklas (Khalid dan Krum, 2016).

Estrogen yang berkerja pada osteoklas melalui reseptornya yaitu ER- α yang berada di permukaan osteoklas dan ER- β berada di inti dari osteoklas. Pada penelitian sebelumnya 17- β estradiol secara khusus meningkatkan regulasi ER- α dan fitoestrogen secara khusus meningkatkan regulasi ER- β (Rassi, et al, 2002). Juga pada penelitian yang dilakukan Kameda pada tahun 1997, menunjukkan pemberian 17- β

estradiol dalam 24 jam dapat menunjukkan karakteristik apoptosis pada osteoklas termasuk perubahan morfologi selular yang dilihat menggunakan mikroskop fluoresen.

3. Mekanisme ketiga dimana estrogen dapat menurunkan jumlah osteoklas lewat regulasi *Receptor Activator NfB Ligand* (RANKL) dan *Osteoprotegerin* (OPG). RANKL berfungsi dalam differensiasi osteoklas.

RANKL diproduksi oleh osteoblast dan akan teraktivasi bila bertemu dengan RANK yang terdapat pada osteoklas. Aktifitas RANK dan RANKL dapat dihambat dengan *Osteoprotegerin/OPG* yang dihasilkan oleh osteoblast, dimana dengan adanya OPG, RANKL akan terlokalisasi di permukaan sel osteoblas (Khalid and Krum, 2016).

2.4. Osteoklas

2.4.1. Definisi

Osteoklas berasal dari kata dari $\acute{\omicron}\sigma\tau\acute{\epsilon}\omicron\nu$ Yunani Kuno (osteon), yang berarti 'tulang', dan $\kappa\lambda\alpha\sigma\tau\acute{\omicron}\varsigma$ (clastos), yang berarti 'rusak') adalah jenis sel tulang yang memecah jaringan tulang.

Osteoklas merupakan satu-satunya sel yang mampu melakukan pendegradasian pada tulang, yang berasal dari proses hematopoietik. (Ross, F.P., 2011). Osteoklas berbentuk sel *giant* multinuklear yang bertanggung jawab untuk penghancuran dan penyerapan tulang. Tulang adalah jaringan dinamis yang terus dibongkar dan direstrukturisasi sebagai respons terhadap pengaruh seperti stres struktural dan kebutuhan tubuh akan kalsium. Osteoklas adalah mediator penghancuran terus menerus tulang. (Parvizi, 2010)

2.4.2. Morfologi

Osteoklas merupakan sel raksasa yang memiliki banyak nucleus (*multinucleated giant cells*) dan sitoplasma yang homogen. Osteoklas sangat terkait terletak pada permukaan tulang dan menggunakan struktur yang disebut "*ruffled border*" untuk mengikat protein adhesi matriks dan menghasilkan lubang-lubang resorpsi yang disebut "*Howship's lacunae*". Membran plasma osteoklas membentuk ikatan dengan tulang pada bagian bawah *Howship's lacunae* diasamkan, yang dapat melarutkan mineral dalam jaringan yang terossifikasi dengan enzim yang disekresikan dan dapat menghancurkan matriks. Osteoklas dapat dikarakterisasikan dengan sitoplasma yang homogenya dengan penampilan yang "*foamy*" atau berbusa, ini disebabkan oleh konsentrasi tinggi vesikula dan vakuola. Vakuola berisikan lisosom dengan asam fosfatase. Yang menyebabkan karakterisasi osteoklas dengan dibedakan secara histologis oleh *immunohistochemical stains* untuk *tartrate-resistant acid phosphatase* dan *cathepsin K*. (Parvizi, 2010)



Gambar 2.3 Gambaran sel osteoklas dilihat secara mikroskopis (Bethel, 2019)

2.4.3. Fungsi

Begitu diaktifkan, osteoklas berpindah ke area-area microfracture di dalam tulang dengan chemotaxis. Osteoklas terletak di rongga-rongga kecil yang disebut lacunae Howship, terbentuk dari proses *remodeling* tulang sebelumnya.

The sealing zone adalah tempat perlekatan membran plasma osteoklas ke tulang di bawahnya, yang dibatasi oleh ikatan dari struktur adhesi khusus yang disebut podosom. Keterikatan pada matriks tulang difasilitasi oleh reseptor integrin, seperti $\alpha\beta3$, melalui motif asam amino spesifik Arg-Gly-Asp dalam protein matriks tulang, seperti osteopontin. Osteoklas melepaskan ion hidrogen melalui aksi karbonat anhidrase ($\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) melalui *ruffled border* ke dalam rongga resorptif, mengasamkan dan membantu penghancuran matriks tulang yang termineralisasi menjadi Ca^{2+} , H_3PO_4 , H_2CO_3 , air dan zat lain.

Disfungsi dari anhidrase karbonik dapat menyebabkan osteopetrosis. Ion hidrogen dipompa terhadap gradien konsentrasi tinggi oleh pompa proton, khususnya ATPase vakuolar. Enzim ini telah ditargetkan dalam pencegahan osteoporosis. Selain itu, beberapa enzim hidrolitik, seperti anggota kelompok katepin dan matriks metalloprotease (MMP), dilepaskan untuk mencerna komponen organik dari matriks. Enzim-enzim ini dilepaskan ke kompartemen oleh lisosom. Dari enzim-enzim hidrolitik ini, cathepsin K adalah yang paling penting. Lingkungan asam di bawah the ruffled border melarutkan matriks tulang anorganik, sementara cathepsin K, dengan pH asam optimum, menurunkan kolagen tipe 1, protein utama dalam tulang. MMP terkait dengan lingkungan mikro tulang. Ini diekspresikan oleh osteoklas, dan diketahui diperlukan untuk migrasi osteoklas dan merupakan gelatinase yang kuat. Tikus transgenik yang kekurangan MMP-9 mengembangkan defek dalam perkembangan tulang,

angiogenesis intraosseous, dan perbaikan fraktur. MMP-13 diyakini terlibat dalam resorpsi tulang dan diferensiasi osteoklas. (Ross, 2011)

2.4.4. Regulasi

Osteoclasts diregulasi oleh beberapa hormon, termasuk hormon paratiroid (PTH) dari kelenjar paratiroid, kalsitonin dari kelenjar tiroid, dan faktor pertumbuhan interleukin 6 (IL-6). Hormon terakhir ini, IL-6, adalah salah satu faktor dalam penyakit osteoporosis, yang merupakan ketidakseimbangan antara resorpsi tulang dan pembentukan tulang. Aktivitas osteoklas juga dimediasi oleh interaksi dua molekul yang dihasilkan oleh osteoblas, yaitu osteoprotegerin dan RANKL.

RANKL diproduksi oleh osteoblas dan merupakan salah satu mungkin banyak molekul sinyal yang memfasilitasi cross-talk antara osteoblas dan osteoklas dan membantu mengkoordinasikan tulang renovasi. Osteoprotegerin, protein lain yang dilepaskan oleh osteoblas, juga dapat mengikat RANKL, bertindak sebagai umpan untuk mencegah RANK dan RANKL melakukan kontak. Keseimbangan RANKL dan osteoprotegerin mungkin sangat penting dalam osteoporosis. Bahkan, penelitian pada hewan menunjukkan bahwa peningkatan produksi osteoprotegerin menyebabkan peningkatan massa tulang, sementara hilangnya protein menyebabkan osteoporosis dan peningkatan fraktur. Inhibitor RANKL juga menunjukkan janji sebagai pengobatan potensial untuk osteoporosis pada manusia. (Ross, 2011)

Regulasi osteoklas juga di pengaruhi oleh kadar estrogen, dimana dimediasi melalui satu tipe sel spesifik terhadap reseptor dipermukaan yang disebut reseptor estrogen alpha (ER α), yang mengikat dan mengangkut hormon ke dalam nucleus dimana kompleks reseptor-hormon bertindak sebagai saklar untuk

mengaktifkan gen tertentu (Bonellye, 2005). Estrogen sendiri yang dapat langsung berikatan dengan ER α pada sel osteoklas menginduksi terjadinya apoptosis melalui transkripsi dari FasL (Khalid, A.B. and Krum, S.A., 2016.).

2.5. Albumin

2.5.1. Deskripsi

Albumin, protein serum utama, mengikat berbagai senyawa lipofilik termasuk steroid, hormon lipofilik lain dan fitokimia yang berikatan dengan reseptor hormon. Albumin memiliki afinitas rendah untuk senyawa lipofilik ini. Namun, karena konsentrasi tinggi albumin dalam serum, albumin adalah pembawa utama steroid dan hormon lipofilik dan pengatur akses mereka ke reseptor mereka.

Albumin merupakan protein plasma yang paling banyak dalam tubuh manusia, yaitu sekitar 55-60% dan serum protein kadar total serum normal adalah 3,8-5,0 g / dl. Albumin terdiri dari rantai tunggal polipeptida dengan berat molekul 66,4 kDa dan mengandung dari 585 asam amino. Pada molekul albumin ada 17 ikatan disulfida yang menghubungkan asam-asam amino yang mengandung sulfur. Albumin berbentuk elips tidak akan meningkatkan viskositas plasma dan larut sempurna. (Boldt, 2010)

Degradasi albumin total pada orang dewasa dengan berat 70 kg adalah sekitar 14 gram/hari atau 5% dan pertukaran protein seluruh tubuh per hari, albumin dipecah di otot dan kulit sebesar 40-60%, di hati 15%, ginjal sekitar 10%, dan 10% sisanya merembes ke dalam saluran cerna melalui dinding lambung. Produk degradasi akhir berupa asam amino bebas. Pada orang sehat kehilangan albumin adalah melalui urin dan biasanya minimal tidak melebihi dari 10-20 mg/hari karena hampir semua yang melewati membran glomerulus akan diserap kembali (Evans, 2002).

2.5.2. Hubungan Albumin dan Estrogen

Albumin mengikat berbagai macam ligan hidrofobik termasuk steroid, asam lemak, retinoid, hormon tiroid, prostaglandin, dan antibiotik.

Estrogen merupakan hormon seks steroid yang sangat penting yang bekerja pada beberapa fungsi fisiologis, dan bioavailabilitas estrogen terikat dengan albumin. Albumin-binding serta tingkat bioavailabilitas estradiol menurun dengan usia, dan penurunan mereka dikaitkan karena penurunan tingkat albumin daripada peningkatan *sex-hormone binding globulin (SHBG)* pada usia tua.

Kadar albumin memiliki peran penting untuk mempertahankan tingkat steroid seks biologis. Protein dalam darah penting dalam mengangkut hormon untuk menargetkan sel. Protein pembawa ini *sex hormone binding globulin (SHBG)*, yang mengikat *estradiol dan testosterone, corticosteroid binding globulin (CBG), thyroxine binding globulin (TBG) and retinol binding protein (RBP)*. Baik SHBG, CBG, TBG maupun RBP tidak homolog dengan albumin. (Baker, 2008)

Pada kondisi penurunan estrogen pada wanita pasca menopause dapat dikaitkan dengan keadaan *hipoalbuminemia*. Dimana pada keadaan hipoestrogen terjadi pula penurunan total protein pada serum dan kadar albumin menurun secara signifikan (Jagtap, *et al.*, 2017). Estrogen memodulasi sistem Renin Angiotensin-Aldosteron (RAAS), dimana pada penelitian sebelumnya, pada keadaan ovariectomi tikus mengalami penurunan jumlah *angiotensin converting enzyme (ACE)* dan menyebabkan *down regulation* transkripsi ACE dan konversi angiotensin I menjadi angiotensin II, yang akhirnya menyebabkan penurunan tekanan pada eferen arteriolar. Hal ini yang kemudian menyebabkan penurunan tekanan intraglomerular dan terjadinya albuminuria. Yang kemudian juga dapat terjadi pada wanita pasca menopause dimana terjadinya defisiensi estrogen

yang selanjutnya menyebabkan meningkatnya albumin pada urin dan keadaan hipoalbuminemia (Ahn *et al*, 2016).

Albumin dapat mengontrol akses phytochemical ke reseptor estrogen, mamalia mengakumulasi berbagai senyawa lipofilik dalam darah mereka ketika mereka mengonsumsi makanan. Beberapa senyawa seperti karotenoid dan asam linoleat adalah nutrisi penting. Senyawa lain mungkin memiliki efek toksik karena mengikat baik reseptor hormon atau enzim. Sebuah kelas phytochemical yang menarik khusus karena efek endokrin mereka adalah flavonoid, yang memiliki beberapa kesamaan struktural ke estrogen. Flavonoid berikatan dengan reseptor estrogen dan aromata yang mengubah testosteron menjadi estradiol. (Baker, 2008).

2.6. Terapi Menopause

2.6.1. Deskripsi Umum

Menopause tidak memerlukan perawatan medis, perawatan berfokus pada meredakan gejala dan tanda serta mencegah atau mengelola kondisi kronis yang mungkin terjadi seiring penuaan. Beberapa pengobatan yang dapat dilakukan termasuk:

1. Terapi hormon. Terapi estrogen adalah pilihan pengobatan paling efektif untuk menghilangkan hot flash menopause. Tergantung pada riwayat medis bila masih dalam keadaan memiliki rahim maka akan membutuhkan progestin selain estrogen. Estrogen juga membantu mencegah keropos tulang. Penggunaan jangka panjang dari terapi hormon mungkin memiliki beberapa risiko kanker kardiovaskular dan payudara, tetapi memulai hormon di sekitar waktu menopause telah menunjukkan manfaat bagi sebagian wanita.

2. Estrogen vaginadaapt digunakan untuk mengurangi kekeringan vagina, estrogen dapat diberikan langsung ke vagina menggunakan krim vagina, tablet atau cincin. Perawatan ini melepaskan hanya sejumlah kecil estrogen, yang diserap oleh jaringan vagina. Dapat membantu meringankan kekeringan vagina, ketidaknyamanan dengan hubungan seksual dan beberapa gejala kencing.
3. Antidepresan dosis rendah dimana antidepresan tertentu yang terkait dengan kelas obat yang disebut inhibitor reuptake serotonin selektif (SSRI) dapat menurunkan hot flash menopause. Antidepresan dosis rendah untuk manajemen hot flash mungkin berguna bagi wanita yang tidak dapat menggunakan estrogen untuk alasan kesehatan atau untuk wanita yang membutuhkan antidepresan untuk gangguan mood.
4. Gabapentin (Neurontin, Gralise, lainnya) disetujui untuk mengobati kejang, tetapi juga terbukti membantu mengurangi hot flushes. Obat ini berguna pada wanita yang tidak bisa menggunakan terapi estrogen dan pada mereka yang juga memiliki hot flash pada malam hari.
5. Clonidine (Catapres, Kapvay, lainnya) pil yang biasanya digunakan untuk mengobati tekanan darah tinggi, mungkin memberikan beberapa bantuan dari hot flashes. Obat-obatan untuk mencegah atau mengobati osteoporosis.
6. Beberapa obat tersedia yang membantu mengurangi keropos tulang dan risiko patah tulang seperti suplemen vitamin D untuk membantu memperkuat tulang.

2.6.2. Efek Samping

Terapi sulih hormon dapat meningkatkan risiko terjadinya kanker payudara khususnya pada pengguna terapi sulih hormon kombinasi lebih dari 5 tahun (Santen R, et al, 2014). Peningkatan risiko kanker payudara pada penggunaan terapi sulih hormon selama 5 tahun dinyatakan dalam number needed to harm sebesar 1100 untuk terapi estrogen saja dan 641 untuk kombinasi estrogen dan progesteron. Dengan kata lain, 1 dari 1100 orang yang diberikan terapi estrogen saja dan 1 dari 641 orang yang diberi terapi kombinasi akan mengalami kanker payudara.

Terapi estrogen tanpa adanya progesteron pada wanita menopause yang memiliki rahim yang utuh dapat meningkatkan risiko terjadinya kanker endometrium dan hiperplasia endometrium. Pemberian hormon estrogen secara oral dapat meningkatkan sintesis prokoagulan di hepar sehingga dapat meningkatkan risiko terjadinya tromboemboli vena. Selain itu, pemberian terapi estrogen saja atau kombinasi estrogen dan progesteron dapat meningkatkan risiko gangguan pada kandung empedu. (Stephen, 2000)

Terapi sulih hormon dikontraindikasikan pada wanita yang memiliki riwayat kanker payudara, memiliki risiko tinggi menderita kanker payudara menderita tromboembolisme vena atau memiliki risiko tinggi trombosis atau stroke. Secara umum, inisiasi pemberian terapi sulih hormon tidak direkomendasikan untuk wanita yang berusia lebih dari 60 tahun (Davis, et al., 2015).

2.6.3. Terapi Alternatif

Banyak pendekatan telah dipromosikan sebagai bantuan dalam mengelola gejala menopause. Beberapa perawatan komplementer dan alternatif yang telah atau sedang dipelajari meliputi:

1. Estrogen tanaman (fitoestrogen). Estrogen ini terjadi secara alami pada makanan tertentu. Ada dua jenis utama fitoestrogen - isoflavon dan lignan. Isoflavon ditemukan dalam kedelai, lentil, buncis dan kacang polong lainnya. Lignan terjadi pada biji rami, biji-bijian utuh, dan beberapa buah dan sayuran. Beberapa tanaman herbal dianggap mengandung senyawa dengan efek seperti estrogen, dan ada bukti yang baik bahwa itu dapat secara efektif mengelola gejala menopause.
2. Hormon bioidentik. Hormon-hormon ini berasal dari sumber tanaman. Dikatakan "bioidentical" karena hormon dalam produk secara kimia tubuh, ada beberapa hormon bioidentik yang tersedia secara komersial yang disetujui oleh *Food and Drug Administration (FDA)* Amerika, tapi dalam pencampuran dan berdasarkan apotek dan sesuai dengan resep dokter tidak diatur oleh FDA, sehingga kualitas dan risiko dapat berbeda. Juga tidak ada bukti ilmiah bahwa hormon bioidentik bekerja lebih baik daripada terapi hormon tradisional dalam mengurangi gejala menopause.
3. *Black cohosh*. *Black cohosh* telah populer di kalangan banyak wanita dengan gejala menopause. Tapi ada sedikit bukti bahwa *black cohosh* efektif, dan suplemen dapat berbahaya bagi hati dan mungkin tidak aman bagi wanita dengan riwayat kanker payudara.
4. Yoga walaupun tidak banyak bukti yang adekuat bahwa yoga dapat mengurangi resiko menopause, latihan keseimbangan seperti yoga atau tai chi dapat meningkatkan kekuatan dan koordinasi dan dapat membantu mencegah jatuh yang dapat menyebabkan patah tulang.
5. Akupunktur mungkin memiliki beberapa manfaat sementara dalam membantu mengurangi hot flash.

6. Hipnose. Hipnoterapi dapat menurunkan kejadian hot flashes untuk beberapa wanita menopause, menurut penelitian dari *National Center for Complementary and Integrative Health*. Hipnoterapi juga membantu meningkatkan tidur dan mengurangi gangguan dalam kehidupan sehari-hari.

2.7. Fito Estrogen

2.7.1. Definisi

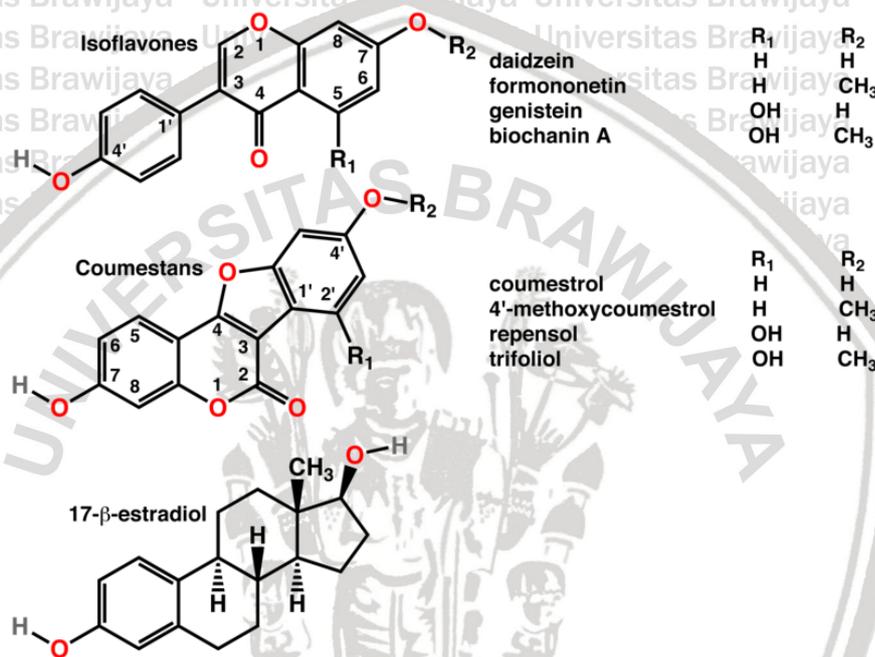
Fitoestrogen adalah xenoestrogen (estrogen) yang dihasilkan oleh tanaman yang tidak dihasilkan dalam sistem endokrin, tetapi disatukan dengan konsumsi makanan atau tumbuhan fitoestrogenik. Fitoestrogen adalah kelompok beragam senyawa tanaman nonsteroid yang terjadi secara alami yang, karena kesamaan strukturalnya dengan estradiol ($17\text{-}\beta\text{-estradiol}$), memiliki kemampuan untuk menyebabkan efek estrogenik dan atau antiestrogenik. Phytoestrogens bukanlah nutrisi penting karena ketidakhadiran mereka dari diet tidak menyebabkan penyakit, juga tidak diketahui untuk berpartisipasi dalam fungsi biologis normal.

Fitoestrogen merupakan zat yang berasal dari tumbuh-tumbuhan yang memiliki struktur kimia mirip dengan estrogen, tetapi efek estrogennya sangat lemah. Banyak dijumpai pada kedelai, kulit bengkuang, lidah buaya, kacang tunggak, sayur –sayuran, biji padian, serta rempah-rempah. Terdapat beberapa jenis seperti Ligan (enterolakton, enterodiol), Isoflavon (genistein, daidzein, formononetin, equol), Coumestan (coumestrol), Lakton (zerealenon) dan Sterol (Sitosterol) (Baziad, 2003)

Struktur kimia fitoestrogen yang paling khas adalah adanya cincin fenolik yang menjadi prasyarat ikatan pada reseptor estrogen (Murkies et al., 1998).

Cincin fenolik inilah yang menjadikan fitoestrogen dapat bekerja seperti estrogen

di dalam tubuh. Fitoestrogen bersifat paradoxal, artinya mempunyai efek estrogenik dan antiestrogenik (antagonis dengan estrogen) tergantung dari kadar estrogen dalam tubuh. Kadar estrogen yang tinggi akan menyebabkan fitoestrogen mempunyai efek antiestrogenik dengan cara mengikat reseptor dan mengadakan blocking terhadap molekul estrogen (Whitten dan Pattisaul, 2001).



Gambar 2.4 Struktur Kimia pada fitoestrogen

2.7.2. Mekanisme Kerja Fitoestrogen

Fitoestrogen mengerahkan efeknya terutama melalui pengikatan dengan reseptor estrogen (ER) (Marquez et al, 2015). Ada dua varian dari reseptor estrogen, alpha (ER-α) dan beta (ER-β) dan banyak phytoestrogen menampilkan afinitas yang agak lebih tinggi untuk ER-β dibandingkan dengan ER-α.

Unsur-unsur struktural utama yang memungkinkan fitoestrogen untuk berikatan dengan afinitas yang tinggi terhadap reseptor estrogen dan menampilkan efek seperti estradiol adalah: Cincin fenolik yang sangat diperlukan untuk mengikat reseptor estrogen; Cincin isoflavan yang meniru cincin estrogen di tempat

pengikatan reseptor; Berat molekul rendah mirip dengan estrogen (MW = 272);

Jarak antara dua gugus hidroksil pada inti isoflavon serupa dengan yang terjadi pada estradiol; Pola hidroksilasi optimal. Selain interaksi dengan ERs, fitoestrogen juga dapat memodulasi konsentrasi estrogen endogen dengan mengikat atau menonaktifkan beberapa enzim, dan dapat mempengaruhi bioavailabilitas hormon seks dengan menekan atau merangsang sintesis globulin pengikat hormon seks (SHBG). (Marquez et al, 2015)

2.7.3. Efek Fisiologis Fitoestrogen

Isoflavon, khususnya genistein dapat terikat dengan reseptor estrogen (ER).

Walaupun dengan ikatan lemah, tapi ER- β memiliki ikatan yang sama dengan estrogen. Senyawa isoflavon terbukti juga mempunyai efek hormonal, khususnya *estrogenic*. Ini terkait dengan pengkorvesian menjadi senyawa equol yang memiliki struktur fenolitik mirip dengan hormone estrogen. Dimana seperti yang sudah dibahas sebelumnya bahwa hormone estrogen berpengaruh pada keadaan klasifikasi maka isiflavon ini berpotensi untuk melindungi proses osteoporosis pada tulang. (Pradana, 2008)

Banyak fitoestrogen dikenal sebagai endocrine disruptor compounds (EDCs) (Patisaul et al., 2010). EDC adalah senyawa alami atau sintesis yang dapat mengubah fungsi hormonal dengan beberapa mekanisme: 1) stimulasi atau hambatan langsung sistem endokrin; 2) menyerupai atau memblok respon tubuh pada hormone steroid endogen; atau 3) mengubah biosintesis, sekresi, transportasi, ikatan, aksi, degradasi, atau eliminasi dari hormone endogen yang mampu untuk mempertahankan homeostasis, reproduksi, perkembangan dan/atau perilaku (Dickerson and Gore, 2007)

2.8. Ciplukan (*Physalis angulata* L.)



Gambar 2.5 Tumbuhan *Physalis angulata* L.

Gambar 2.6 Daun tumbuhan *Physalis angulata* L.

2.8.1. Taksonomi Tanaman

Klasifikasi ciplukan (*Physalis angulata* L.) dalam sistem taksonomi tumbuhan adalah (Cab International, 2018):

- Domain** : *Eukaryota*
- Kingdom** : *Plantae*
- Phylum** : *Spermatophyta*
- Subphylum** : *Angiospermae*
- Class** : *Dicotyledonae*
- Order** : *Solanales*
- Family** : *Solanaceae*
- Genus** : *Physalis*
- Species** : *Physalis angulata* L.

2.8.2. Deskripsi, Distribusi, dan Morfologi Tanaman

P. angulata adalah tanaman tahunan herba asal Amerika yang telah diperkenalkan secara luas di banyak daerah beriklim tropis, subtropis dan wilayah dengan temperatur lebih hangat. (Raju et al., 2007).



Nama *Physalis* dalam bahasa Yunani untuk referensi '*bladder*' pada kelopak yang kembang. Genus *Physalis* adalah anggota dari *family Nightshade, Solanaceae*. *Physalis* adalah tumbuhan tahunan atau annual atau perennial, tegak atau dekumbent, kadang-kadang *rhizomatous, glabrous* atau puber, dan dengan berbagai daun bergigi atau dengan daun berlobus. *Physalis* dikembangkan dengan biji. Daunnya berwarna hijau gelap dan kasar lonjong, seringkali dengan bentuk gigi di sekitar tepi. Bunganya berwarna kuning pucat dan dengan 5 kelopak. Buah berwarna kuning-oranye tumbuh di dalam kelopak seperti balon (*balloon-like calyx*). Tumbuhan asli amerika ini telah tersebar luas dan dinaturalisasi di daerah tropis dan subtropis di seluruh dunia. (Mahalakhsmi, et al, 2014)

Penggunaan tanaman ini sangat luas dan unik untuk mengobati berbagai penyakit pada manusia, namun, mereka belum begitu dikenal. Ada sejumlah produk alami yang digunakan dalam sistem kedokteran atau pengobatan tradisional di banyak negara sebagai alternatif dalam mengobati berbagai penyakit. Salah satu tanaman ini, *Physalis angulata*, dikenal di Indonesia sebagai "ciplukan" atau "ceplukan". Ekstrak air ataupun dalam bentuk infusnya telah digunakan di banyak negara sebagai obat populer untuk perawatan berbagai macam penyakit seperti malaria, asma, hepatitis, dermatitis dan rematik. (Kusumaningtyas, et al, 2015)

2.8.3. Kandungan Kimia

Tanaman ceplukan bersifat analgetik (penghilang nyeri), detoksikan (penetrat racun) serta pengaktif fungsi kelenjar-kelenjar tubuh. Saponin yang terkandung dalam ceplukan memberikan rasa pahit dan berkhasiat sebagai anti tumor dan menghambat pertumbuhan kanker. Flavonoid dan polifenol berkhasiat sebagai

antioksidan. *P. angulata* L. mengandung karbohidrat, lipid, mineral, vitamin, dan pitosterol. Ini juga memiliki kontributor utama dari struktur tipe-butanol Daun ceplukan mengandung 13,14-seco-16,24-cyclosteroid yang disebut physalin.

Physalin terdiri dari beberapa senyawa seperti *physalin A*, *physalin C*, *physalin D*, *5 β -6 β epoxyphystalin*, *dihydroxypysalin B*, *whitaphysalin A*, *whitaphysalin B*, dan *whitaphysalin C*. Selain physalin, *Physalis* juga mengandung *withanolides*, molekul yang juga memiliki estrogenik. (Lestari B, et al, 2016)

Withanolides secara klasik didefinisikan sebagai kelompok steroid tipe erggnane C28 dengan kelompok C-22, 26 δ -laktone Ini juga memiliki physalins B, E, F, G, H dan I dan *Withangulatin A*. *Withaferin A*, senyawa yang secara struktural terkait dengan *Withangulatin A*. Ini juga mengandung flavonol glikosida bernama sebagai *myricetin 3-O-neohesperidoside*. Physalin merupakan seko-steroid yang berefek imunomodulator. Physalin B, F, atau G dapat mereduksi produksi nitrit oksid karena makrofag terstimulasi oleh lipopolisakarida dan interferon (IFN)- γ . Physalin B juga dapat membantu menghasilkan jumlah tumor nekrosis factor (TNF)- α , interleukin-6 dan interleukin-12 lebih sedikit. (Soares, 2003)

2.8.4. Penggunaan di Masyarakat

Dalam beberapa penelitian mengungkapkan kemungkinan ekstrak *P. angulata* digunakan sebagai bahan makanan fungsional dan efektivitas ekstraksi.

Genus *Physalis* mengandung beberapa spesies yang ditanam untuk buah hias atau dimakan, baik dimakan mentah atau dimasak. Spesies yang paling dibudidayakan di Amerika Utara adalah tomatillo (*P. philadelphica*), yang sering dibudidayakan untuk makanan yaitu salsa verde, spesies lain, seperti gooseberry Cape (*P. peruviana* L.) dan muyaca di Amerika Selatan (*P. pubescens* L.) telah

dibudidayakan dan dimakan. Tanaman lentera Cina (*P. alkenkengi*) adalah spesies hias yang dibudidayakan untuk mengambil kulitnya yang berwarna cerah. (Mahalakshmi et al, 2014)

Bagian daunnya kadang-kadang digunakan untuk melawan radang kandung kemih, limpa dan hati. Seluruh tanaman yang dimasak direkomendasikan meredakan proses peradangan, seperti rematik. Di lembah Amazon, jusnya digunakan sebagai obat penenang, depuratif, anti-rematik, dan untuk menghilangkan sakit telinga. Di Taiwan, itu digunakan sebagai persiapan obat tradisional untuk diabetes, hepatitis, asma dan malaria. Di Afrika Barat ramuan ini digunakan sebagai obat tradisional untuk pengobatan kanker. Hal ini juga dianggap sebagai beberapa ekstraknya menunjukkan antipiretik, analgesik / antinociceptive, antidiuretik, anti-inflamasi, dan antirematik; dan untuk mengobati hepatitis, sakit tenggorokan, sakit perut dan servitis. Beberapa bukti mengatakan bahwa tanaman ini secara tradisional digunakan untuk pengobatan penyakit malaria, asma, ginjal dan kandung kemih, penyakit kuning, asam urat dan demam. Buah dan bagian udara lainnya digunakan dalam pengobatan bisul, luka atau luka, sembelit dan masalah pencernaan. Penduduk pedesaan di Peruvian Amazon menggunakan daun untuk masalah hati, malaria, dan hepatitis. (Mahalakshmi et al, 2014)

2.8.5. Ekstrak Air Daun Ciplukan Sebagai Fitoestrogen

Tanaman *Physalis angulate L.* secara *in vitro* pada kultur sel endotel menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun *Physalis* mempunyai kerja yang menyerupai estrogen yaitu dapat meningkatkan ekspresi seluler estrogen *receptor* dan *endothelial nitric oxide* dan meningkatkan produksi *nitric oxide* pada HUVECs (Permatasari et al., 2010).

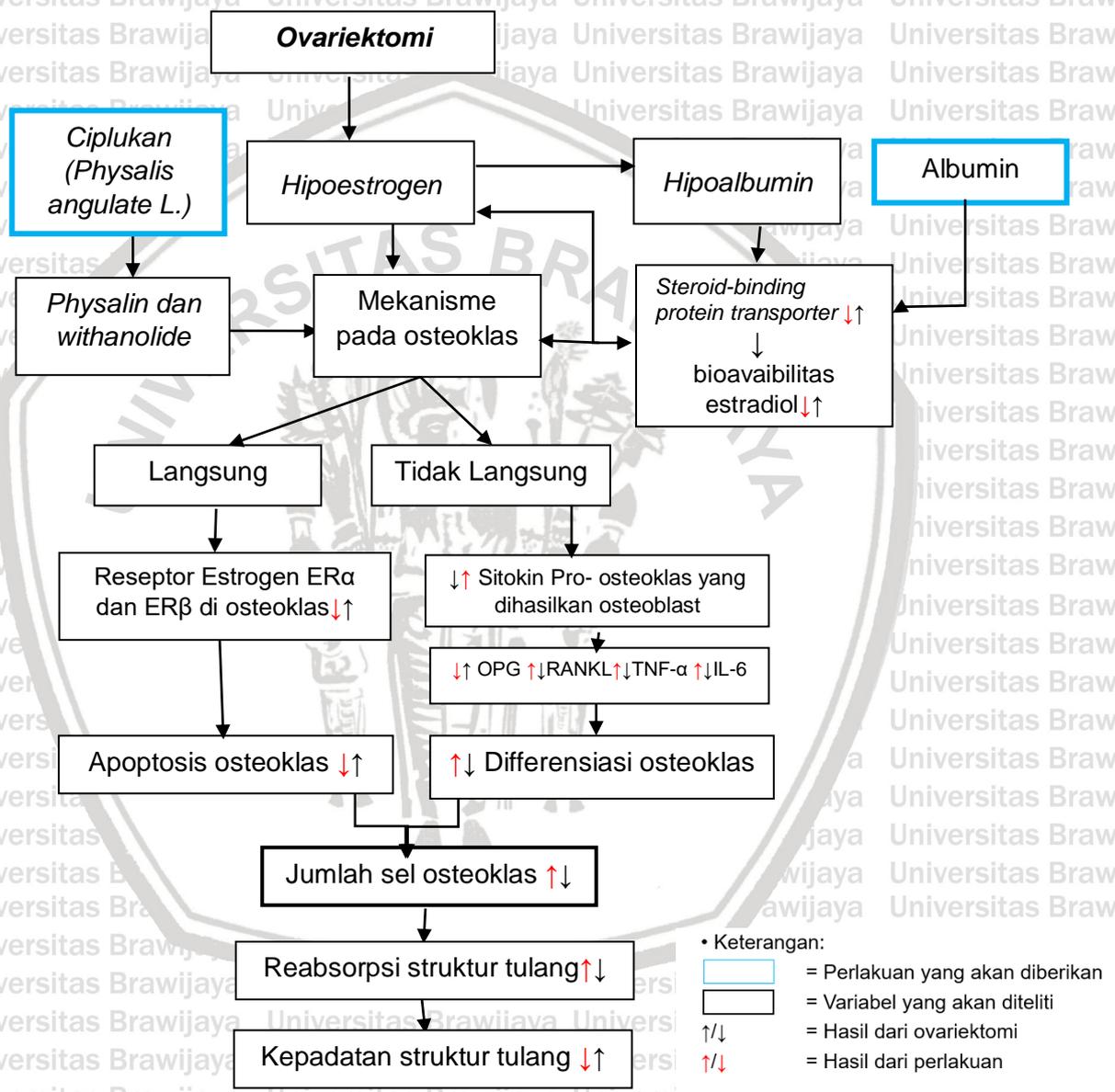
Selanjutnya pada penelitian *in vivo* menggunakan hewan model menopause menunjukkan bahwa ekstrak metanol atau ekstrak air daun *Physalis* dapat secara signifikan memperbaiki beberapa *postmenopausal syndrome* yaitu tekanan darah, respons dilatasi pembuluh darah, volume air mata, dan derajat depresi (Permatasari et al., 2013), derajat kecemasan (Fitria et al., 2015) serta fibrosis jantung (Lestari et al., 2016).

Pada penelitian secara *in vitro* pada kultur sel endotel pembuluh darah (HUVECs) didapatkan bahwa pemberian ekstrak daun *Physalis* 0.0025%, 0.005% dan 0.05% dapat: menstimulasi sinyal transduksi Ca^{2+} dan meningkatkan pelepasan NO secara signifikan ($p < 0.001$). Pada penelitian selanjutnya, pemberian physalin yang diduga merupakan senyawa aktif yang bertanggung jawab pada timbulnya efek tersebut menunjukkan bahwa pada HUVECs yang diinkubasi physalin menginduksi meningkatkan ekspresi eNOS (Permatasari et al., 2010). Untuk menguatkan dugaan bahwa *Physalis minima* bekerja seperti estrogen maka dibuktikan adanya *nuclear colocalization* antara eNOS dan ER (estrogen receptor) pada sel endotel (Graselli et al., 2008). Berdasarkan hal tersebut diduga kuat ekstrak *Physalis* mempunyai mekanisme kerja seperti estrogen, yaitu bekerja pada reseptor estrogen tetapi physalin bukan yang bertanggung jawab atas efek tersebut (Permatasari et al., 2009). Pada penelitian terdahulu ekstrak daun *Physalis* juga mengandung withanolides (Permatasari et al., 2013). Withanolide merupakan sumber dari fitoestrogen (Dongaonkar, et al., 2005). Dengan demikian diduga bahwa efek farmakologis ekstrak daun *Physalis* yang ada terkait dengan efek estrogenik withanolides (Permatasari et al., 2013).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Skema Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konsep



Tikus ovariektomi merupakan model hewan coba model menopause pada wanita. Pada keadaan menopause terjadinya penurunan kadar estrogen dikarenakan tidak adanya aktivitas pematangan ovum pada ovarium (Guyton, 2010). Kondisi hipoestrogen ini juga menyebabkan menurunkan kadar albumin dalam darah yang berfungsi sebagai transporter estrogen ke seluruh jaringan termasuk ke tulang (Jagtap, *et al.*, 2016).

Ciplukan (*Physalis angulate L.*) mengandung senyawa kimia withanolides dan physalin yang mana berpotensi memiliki sifat estrogenik dan dapat berikatan pada reseptor estrogen (Lestari *et al.*, 2016). Dimana keadaan hipoestrogen berkurangnya secara signifikan kadar estrogen yang diterima oleh ER α pada sel osteoklas akan menghambat terjadinya apoptosis pada sel osteoklas (Khalid and Krum, 2016), juga akan terdapat peningkatan produksi sitokin pro-osteoklas TNF- α , IL-1, IL-6, dan IL-12 (Soares *et al.*, 2006), juga terjadinya ketidak seimbangan Antara OPG dan RANKL yang diproduksi oleh osteoblast dalam berikatan dengan osteoklas. Dimana apabila terjadinya ikatan RANK dan RANKL akan memicu differensiasi sel osteoklas, dan OPG dapat menghambat terjadinya ikatan tersebut (Khalid, A.B. and Krum, S.A., 2016). Lewat kedua mekanisme tersebut, ciplukan dapat menghibisi terjadinya differensiasi dan menginisiasi apoptosis pada osteoklas. Dan juga ciplukan sebagai fitoestrogen dapat meningkatkan ekspresi seluler *estrogen receptor* dan *endothelial nitric oxide* dan meningkatkan produksi *nitric oxide* pada HUVECs (Permatasari *et al.*, 2010).

Sehingga menghibisi produksi osteoklas yang berlebihan pada wanita menopause. Dengan penurunan apoptosis dan differensiasi pada sel osteoklas maka jumlah sel osteoklas akan semakin menurun, dan menurunkan kondisi reabsorpsi tulang yang berlebihan. Keadaan ini akan meningkatkan densitas

tulang yang dapat mencegah terjadinya osteoporosis pada keadaan *post menopausal syndrome*.

Adanya albumin sebagai protein utama dalam tubuh juga berperan, dimana penurunan jumlah albumin dalam darah menjadi factor risiko dalam terjadinya menopause karena berkurangnya *steroid-binding protein* sebagai transporter estrogen dalam tubuh. Afshinnia *et al.*, (2016) menemukan bahwa kadar albumin kurang dari 3 g/dL meningkatkan kemungkinan terjadinya osteoporosis tiga kali lipat pada manusia, dan menyarankan adanya hubungan independen antara osteoporosis dan hipoalbumin. Penambahan Albumin dapat diharapkan membantu kondisi hipoalbuminemia yang terjadi pada tikus ovariektomi model menopause. Selain itu, albumin juga dapat meningkatkan bioavailabilitas obat sehingga bisa bertahan lebih lama dan lebih baik terserap pada target organ (Perkin, 2012).

3.2. Hipotesis Penelitian

Pemberian kombinasi ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dan albumin dapat menurunkan jumlah osteoklas pada tulang tibia tikus putih (*rattus norvegicus*) strain wistar pasca ovariektomi.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* di laboratorium dan dengan menggunakan desain penelitian *randomized posttest only controlled group design*. Dimana pada dari tulang tikus tibia yang akan dibuatkan hasil slide histopatologi. Data yang diperoleh akan dijelaskan secara deskripif dan hasil perhitungan rata-rata jumlah sel dianalisis dengan menggunakan uji statistik ANOVA dan uji kolerasi *dose-response relationship* yang akan menggambarkan jumlah osteoklas pada tikus menopause pasca ovariektomi (Lingga A.2017).

4.2. Sampel Penelitian

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar sesuai definisi operasional dimana terdapat kriteria inklusi yaitu berjenis kelamin betina, usia 12 minggu, berat badan ± 200 gram, sehat secara fisik ditandai dengan mata yang jernih, bulu putih mengkilat dan tidak rontok, dan feses tidak lembek. Dan kriteria eksklusi adalah hewan coba yang mati selama proses perawatan sampai sebelum di bedah pada minggu ke-

9.

Jumlah pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan rumus Federer (1977) sebagai berikut:

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

Keterangan:

n = jumlah sampel tiap perlakuan

t = jumlah kelompok perlakuan

jika terdapat 7 kelompok perlakuan yaitu 2 kelompok kontrol positif, 1 kelompok kontrol negative, dan 4 kelompok perlakuan, sehingga didapatkan jumlah sampel yang dibutuhkan adalah:

$$(n - 1)(7 - 1) \geq 15$$

$$(n - 1)(6) \geq 15$$

$$n \geq 3.5$$

Maka didapatkan jumlah minimal terdapat 4 hewan coba per kelompok.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis ekstrak air daun ciplukan dan dosis albumin yang akan diberikan kepada tikus yang diberi perlakuan.

4.3.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah sel osteoklas pada tulang tibia bagian kanan tikus yang kemudia di buatkan preparat histologi dengan pengecatan HE, kemudian dilihat dan dihitung jumlah sel osteoklas menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x.

4.4. Tempat dan Waktu Penelitian

Perlakuan perawatan, pemeliharaan, dan pemberian perlakuan tikus pada penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Lama FKUB. Dan pembedahan dan pengambilan tulang tibia pada hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi di Gedung Pendidikan Baru lantai 5, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembuatan sediaan histo PA dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi di Gedung Pendidikan Baru lantai 5. Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Juni 2018 hingga September 2018.

4.5. Instrumen Penelitian

4.5.1. Alat Penelitian

4.5.1.1. Alat Pembuatan Ekstrak Air Daun *Physalis* (EAP) dan Albumin

Dalam membentuk EAP, diperlukan alat sebagai berikut : 1. Oven, 2.

Timbangan neraca analitik, 3. Kertas Filter, 4. Gelas elenmeyer ukuran 1 Liter.

4.5.1.2. Alat Pemeliharaan Pemeliharaan Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar dipelihara di kandang plastic berukuran 30 cm x 45 cm x 15 cm, Tutup kandang yang terbuat dar anyaman kawat, botol minum tikus, rak tempat menaruh tikus, timbangan neraca digital merk Sartorius Melter (ketelitian 0,1 kg) untuk mengevaluasi berat tikus, dan wadah plastic serbaguna untuk alat bantu untuk penimbangan berat tikus.

4.5.1.3. Alat Ovariektomi Tikus

Untuk melakukan ovariektomi dibutuhkan: 1. Gunting bedah, 2. Tali kur, 3.

Spuit 3cc, 4. Jarum pentul, 5. Silet, 6. 12. Papan Bedah, 7. Pinset anatomis.

4.5.1.4. Alat Pemberian Perlakuan

Dalam pemberian perlakuan digunakan spuit 10cc yang dimodifikasi dan dipasangkan sonde yang bisa dimasukan sepanjang mulut hingga lambung tikus.

4.5.1.5. Alat Pembedahan Tikus Pasca Ovariektomi dan Pengambilan

Sampel Dibutuhkan : 1. Gunting bedah, 2. Tali kur, 3. Spuit 3cc, 4. Jarum pentul, 5. Silet, 6. 12. Papan Bedah, 7. Pinset anatomis, 8. Wadah plastic untuk tempat sampel, 9. Label kertas, 10. Cawan pantri, 11. Spidol.

4.5.1.6. Alat Pembuatan Preparat Jaringan

Dalam membuat preparat jaringan dibutuhkan alat-alat seperti: 1. Alat bedah minor, 2. *Microtome*, 3. Gelas objek, 4. *Cover glass/ deckglass*. 5. Saringan, 6. *Tissue cassette*, 7. Mesin processor otomatis, 8. Pisau *microtome*,

9. *Water bath* 30 °C, 10. *Rotary microtome Spencer*, 11. Rak khusus untuk pewarnaan.

4.5.1.7. Alat Pemeriksaan Histologi Sel Osteoklas

Pemeriksaan dilakukan dengan pengamatan dibawah mikroskop yang dilengkapi dengan kamera *Olympus* menggunakan software *dotSlide*

4.5.2. Bahan Penelitian

4.5.2.1. Bahan Pembuatan Ekstrak Air Daun *Physalis* (EAP) dan Albumin

Dalam pembuatan ekstrak air daun *physalis* (EAP) dan albumin dibutuhkan: 1. Bahan simplisia (bubuk kering) dari bibit tanaman UB dan berumur 3 bulan, 2. Air mendidih 50 ml, 3. Albumin bubuk PT Ismut Makassar

4.5.2.2. Bahan Pemeliharaan Pemeliharaan Hewan Coba

Dalam pemeliharaan dibutuhkan: 1. Air minum tikus 60ml/ekor 2. Bahan makanan pellet (Bahan makanan tikus yang digunakan adalah : kode pakan tikus BR1 dan Aquades) 40gram/ekor, 3. Sekam.

4.5.2.3. Bahan Ovariektomi Tikus

Untuk melakukan ovariektomi dibutuhkan: 1. Ketamine dosis 40 mg/kg BB, 2. Betadine, 3. Alcohol 70%, 4. Gentamisin intramuscular 2mL dosis 60-80 mg/kg BB, 5. Kassa steril, 6. Plester, 7. Kapas 500g, 8. *Catgut plain* dan *needle* 9. Nebacentine powder

4.5.2.4. Bahan Pemberian Perlakuan

Diberikan perlakuan tergantung pada kelompok hewan coba, dimana D1 berupa ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg + Albumin 3,3mg/kgBB, D2 berupa ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg + Albumin 6,7mg/kgBB, D3 berupa ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg + Albumin 10mg/kgBB, dan C berupa ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg.

4.5.2.5. Bahan Pembedahan Tikus Pasca Ovariectomi dan Pengambilan

Sampel

Bahan yang dibutuhkan: 1. Ketamine dosis 40 mg/kg BB, 2. Alcohol 70%, 3. Kapas 500g, 4. Aquades, 5. *Buffer Neutral Formalin* (BNF) 10%.

4.5.2.6. Bahan Pembuatan Preparat Jaringan

Bahan yang digunakan untuk pembuatan preparat jaringan adalah: 1. Sampel tulang tibia kanan tikus, 2. *Buffer Neutral Formalin* (BNF) 10%, 2. Air, 3. alkohol (konsentrasi 70%, 80%, 90%, absolut), 4. Xylol, 5. Parafin, 6. Larutan *Mayer's Hematoxyllin*, 7. Larutan *Lithium Carbonate*, 8. Larutan Eosin, 9. Perekat etelan atau *Canada balsam*.

4.6. Definisi Operasional

1. Ekstrak air daun ciplukan (*Physalis angulate L.*) adalah hasil ekstraksi cair daun ciplukan (*Physalis angulate L.*), dimana daun ciplukan di dapatkan dari bibit tanaman UB yang berumur 3 bulan yang daunnya di ekstraksi dengan cara dikeringkan menggunakan oven, ditimbang (5g), ditambah air mendidih sebanyak 5mL kemudian difilter dan sisa ekstraksinya di ekstraksi kembali sebanyak 2 kali.

Physalis angulata yang digunakan pada penelitian ini di uji determinasi di fakultas SITH Institut Teknologi Bandung. Dosis ekstrak dinyatakan dalam mg/kgBB

2. Albumin: Albumin tablet yang digunakan pada penelitian ini disediakan oleh pihak perusahaan mitra dalam bentuk tablet ekstrak dari ikan yang dibelah setengah serta ditumbuk menjadi bubuk. Dosis albumi dinyatakan dalam g/kgBB

3. Osteoklas adalah sel multinuklear besar yang pada preparat histologi dengan pewarnaan HE berada di sisi tulang yang mengalami reabsorpsi, terdapat gambaran sel besar dengan sitoplasma berbusa dan sedikit asidofilik. Yang akan dilihat dan dihitung dengan mikroskop perbesaran 400x dan dilakukan pengulangan 20x lapang pandang. Hasil akhir akan dihitung dari rerata pengulangan hitung osteoklas tiap preparat.

4. Ovariectomi prosedur operasi pembedahan yang bertujuan mengangky ovarium, oviduk, dan ujung dari cornu uteri secara bilateral. menyebabkan penurunan hormon estrogen.

5. Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang digunakan berjenis kelamin betina, berusia 12 minggu, dengan berat ± 200 mg, sehat secara fisik ditandai dengan mata jernih, rambut putih mengkilap dan tidak rontok, bergerak aktif, dan feses tidak lembek.

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Prosedur Persiapan

4.7.1.1. Persiapan Hewan Coba

Sebelum perlakuan, tikus dibiarkan beradaptasi dengan kondisi laboratorium selama 7 hari untuk meminimalisir stress. Untuk pemeliharannya, tikus diletakkan dalam kandang plastic 45 cm x 30 cm x 15 cm yang sudah diberi label sesuai kelompok perlakuan dan control, dan juga dilakukan pelabelan pada ekor tikus. Kandang ditutup dengan anyaman kawat berongga yang ditimpa batu berukuran dengan kisaran dimensi 8 cm x 5 cm x cm untuk mencegah tikus keluar dari kandang. Tiap kandang berisi 5 tikus. Kandang diletakkan pada suhu ruang ($20^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$) dan siklus gelap 12 jam dan terang 12 jam. Alas berupa sekam yang diganti 2 kali seminggu. Dan diberi makan berupa pellet dengan

kebutuhan harian 40gram/ekor. Minum tikus diletakkan pada botol minum dengan kebutuhan harian 60 ml/ekor dan diberikan 2 botol minum tikus per kandang. Dilakukan juga penimbangan berat awal dengan timbangan untuk selanjutnya di monitoring berat tiap tikus setiap minggu.

4.7.1.2. Pengelompokan Hewan Coba

Hewan coba akan dikelompokan berdasarkan Terdapat 7 kelompok dimana pembagian kelompok dilakukan sebagai berikut:

1. Kelompok kontrol negative (K1) : tikus normal
2. Kelompok kontrol positif (K2): OVX 5 (tikus ovariektomi tanpa terapi, yang akan di bedah minggu ke-5)
3. Kelompok kontrol positif (K3): OVX 9 (tikus ovariektomi tanpa terapi, yang akan di bedah minggu ke-9)
4. Kelompok D1 (P1): tikus ovariektomi dan diterapi ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg + albumin 3,3g/kg
5. Kelompok D2 (P2): tikus ovariektomi dan diterapi ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg + albumin 6,7g/kg
6. Kelompok D3 (P3): tikus ovariektomi dan diterapi ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg + albumin 10g/kg
7. Kelompok Ciplukan (P4): tikus ovariektomi dan diterapi ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg

Semua tikus akan dilakukan pembedahan untuk pengambilan sampel saat minggu ke-9 kecuali untuk kelompok kontrol positif OVX5.

4.7.1.3. Pembuatan Ekstrak Air Daun Ciplukan dan Penyediaan Albumin

Bahan simplisia daun (bubuk kering) didapat dari bibit tanaman UB yang berumur 3 bulan dan dikeringkan menggunakan oven. Simplisia kemudian

ditimbang (5 g) kemudian ditambah air mendidih (100°) sebanyak 5 ml, ditunggu selama 1 jam kemudian disaring. Sisa ekstraksi kembali di ekstraksi dengan proses yang sama sebanyak 2 kali. Hasil saringan dicampur dan disimpan pada suhu 4°C (Wu *et al.*, 2016)

Albumin yang digunakan adalah albumin tablet yang dibelah setengah dan dijadikan bubuk. Pemberian untuk dosis 1,2, dan 3 secara berturut-turut adalah 3,3 g/kgBB, 6,7 g/kgBB, dan 10 g/kgBB, yang kemudian dikombinasi dengan ekstrak air daun *Physalis* dengan dosis 1500 mg/kgBB.

4.7.2. Prosedur Perlakuan Pada Hewan Coba

4.7.2.1. Pembuatan Tikus Ovariektomi

Alat dan bahan yang telah disterilkan disusun diatas meja kerja. Berat badan tikus ditimbang. Mempersiapkan papan alas bedah, lalu tikus difiksasi dalam posisi supinasi dengan diikatkan dengan talikur ke jarum pentul diujung-ujung papan. Ambil spuit dan lakukan anestesi dengan ketamine dengan dosis 40mg/kgBB yang diinjeksikan secara intramuscular bagian sekitar paha. Tunggu sekitar 5 menit, setelah tikus tampak tidak sadar, cukur bulu abdomen kira-kira 1 cm diatas garis kedua ovarium kemudian dilakukan sterilisasi menggunakan alcohol 70% dan betadine solution. Setelah itu tutup dengan duk steril. Dilakukan insisi transabdominal kira-kira diatas uterus sepanjang 1,5-2 cm selapis demi selapis sampai menembus dinding peritoneum, luka insisi ditarik ke lateral kanan dan kiri menggunakan hak. Uterus dicari dengan menelusuri kornu uterus-oviduct-ovarium. Oviduct dan ovarium dibebaskan dari jaringan lemak dan jaringan ikat sekitarnya. Selanjutnya oviduct bagian distal dan ovarium diligasi.

Kemudian oviduct dan ovarium diangkat, luka potongan diberi basitrasin serbuk (Nebacetin). Prosedur yang sama dilakukan untuk ovarium kanan. Luka insisi

ditutup atau dijahit lapis demi lapis dengan benang, dimana untuk bagian dalam dengan 1 simpul dan bagian kulit sebanyak 2 simpul. Kemudian luka diolesi dengan betadine dan diberi Nebacetin, ditutup dengan kasa steril. Kemudian diberikan Gentamycin i.m dengan dosis 60-80 mg/kgBB 1 kali perhari selama 3 hari, dan Novalgin i.m dengan dosis 0,3 ml selama 1 hari. Tikus yang telah diovariektomi dipindah ke dalam kandang pemulihan. Tiap kandang berisi 1 ekor.

Tikus diamati terus sampai sadar. Selama pemeliharaan, tikus diberi makan dan minum yang cukup, cahaya terang atau gelap bergantian selama 12 jam dan dalam suhu kamar. (Permatasari, et al., 2017) Keberhasilan ovariektomi dilihat dari penurunan kadar estradiol plasma dan penurunan kadar FSH yang terjadi 5 minggu setelah ovariektomi (Arsana, et al., 2012). Lalu tikus diamati hingga 5 minggu dan dimonitoring perkembangan berat badan tiap minggunya.

4.7.2.2. Pemberian Ekstrak Air Daun Ciplukan

Pemberian perlakuan ekstrak air daun ciplukan (*Physalis angulate L.*) dilakukan pada minggu ke-5 sesuai dengan kelompok masing-masing, dimana dilakukan dengan cara:

1. Dimasukan dengan spuit secara oral ke tikus sesuai dengan kelompok perlakuan selama 4 minggu.
2. Metode pemberian oral menggunakan spuit yang jarumnya sudah dimodifikasi menjadi sonde sehingga memudahkan untuk memasukan ekstrak air daun ciplukan langsung ke lambung tikus.

4.7.3. Prosedur Pembuatan Preparat Histologi

4.7.3.1. Pengambilan Sampel dari Hewan Coba

1. Disiapkan alat dan bahan dan botol-botol tertutup beserta label untuk tempat organ tikus.

2. Tikus dibius dengan cara diinjeksikan *ketamine*, kemudian ditunggu 5 menit sampai terbius (tidak bergerak.)

3. Tikus yang terbius diletakkan di atas alas papan dengan posisi supinasi. Tikus difiksasi dengan menggunakan jarum pentul yang ditancapkan pada keempat telapak kaki.

4. Ekstremitas posterior tikus dipisahkan dari badan dengan memotong otot, ligamen dan tendon yang menghubungkan femur dan pelvis tikus di bagian proksimal femur.

5. Kemudian memisahkan tulang tulang femur dan tibia ekstremitas posterior tikus, dan memasukkan tulang tibia dextra setiap tikus ke dalam botol tertutup yang berisi formalin 10% sampai terendam seluruhnya untuk mengawetkan sel-sel sehingga struktur sel tidak berubah.

6. Pastikan setiap organ berada pada label yang tepat.

4.7.3.2. Pembuatan Preparat Histologi

Proses pembuatan sediaan histopatologi dan pewarnaan *Hematoxylin-*

Eosin:

1. Fiksasi

Jaringan yang akan dibuat sediaan histopatologi difiksasi dalam larutan Buffer Neutral Formalin (BNF) 10% minimal 48 jam hingga mengeras (matang). Sampel organ yang terfiksasi dengan sempurna ditrimming setebal $\pm 0,5$ cm. Potongan kemudian dimasukkan dalam *tissue cassette* untuk dimasukkan dalam *automatic tissue processor*.

2. Dehidrasi

Proses dehidrasi dimaksudkan untuk menarik air dari jaringan dan mencegah terjadinya pengerutan sampel yang diuji. Dehidrasi dilakukan

dengan cara merendaman sampel dalam larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat (70%, 80%, 95%, absolut). Proses perendaman pada masing-masing konsentrasi alkohol dilakukan selama 1 jam. Proses dehidrasi dilakukan dengan menggunakan mesin otomatis yaitu *Automatic Tissue Processor* (Sakura).

3. Clearing

Proses *clearing* atau penjernihan dan menarik kadar alkohol dilakukan 2 tahap dengan menggunakan xylol I dan xylol II masing-masing dilakukan selama 1 jam.

4. Infiltrasi

Infiltrasi atau impregnasi adalah proses pengisian parafin ke dalam pori-pori jaringan dalam suhu 55°C. Pengisian pori-pori ini dimaksudkan untuk mengeraskan jaringan agar mudah dipotong dengan pisau mikrotom. Parafin yang digunakan adalah parafin histoplast.

5. Embedding dan Blocking

Embedding atau blocking adalah proses penanaman jaringan dalam blok parafin. Dibiarkan mengeras dan di freezer 2 jam.

6. Sectioning

Sectioning adalah proses pemotongan jaringan dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4 – 5 µm. Pemotongan dilakukan dengan alat *rotary microtome Spencer*. Ambil sayatan yang berbentuk pita dengan kuas kecil, kemudian taruh pada *water bath* 30°C, dan sediaan yang sudah merentang diambil dengan gelas objek dan didiamkan selama 24 jam.

7. Pewarnaan Hematoxyllin-Eosin

Sebelum melakukan pewarnaan, preparat histopatologi dideparafinisasi dengan larutan xylol (I dan II) selama dua menit. Kemudian dilakukan proses rehidrasi dengan cara mencelupkan sediaan ke dalam alkohol bertingkat (Alkohol absolut, alkohol 95%, alkohol 80%). Perendaman dalam alkohol 95% dan 80% dilakukan selama 1 menit. Kemudian sediaan dicuci dengan air yang mengalir (air kran) selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna Mayer's Hematoxyllin dengan tahapan sebagai berikut :

- a. Preparat direndam dalam larutan Mayer's Hematoxyllin selama 15 menit
- b. Dicuci dengan air mengalir (air kran) selama 2-3 menit;
- c. Dichelupkan ke alkohol asam 1x
- d. Dicuci dengan air mengalir (air kran) selama 2-3 menit;
- e. Dichelupkan ke dalam larutan larutan Lithium Carbonat selama 10-20 detik;
- f. Dicuci dengan air mengalir (air kran) selama 2 menit;
- g. Preparat direndam dalam larutan Eosin selama 2 - 3 menit;
- h. Preparat dicelupkan ke dalam larutan alkohol 95% dan alkohol absolut sebanyak 10 kali celupan, absolut II selama dua menit, xylol I selama satu menit dan xylol II selama dua menit.

8. Mounting

Setelah tahapan pewarnaan, sediaan ditetesi perekat Entelan atau Canada Balsem dan ditutup dengan *cover glass/deckglass*.

4.7.3.3. Pemeriksaan Histologi Untuk Menghitung Jumlah Osteoklas

1. Slide tulang hasil pewarnaan Hematoksilin Eosin diperiksa menggunakan Mikroskop Olympus Photo Slide CX3-1.

2. Menghitung jumlah sel osteoklas dengan ciri-ciri ditemukan di permukaan tulang yang telah berdekalsifikasi dan umumnya berjumlah 1-2 sel pada tiap trabecular yang berbentuk khas yaitu sel besar dengan bentuk tidak beraturan dan multinuclear sampai 20 inti di bawah Mikroskop Komputer Olympus CX3-1 dengan perbesaran 400x pada tiap jaringan /slide dari masing-masing tikus sebanyak 20 lapang pandang kemudian dirata-rata.

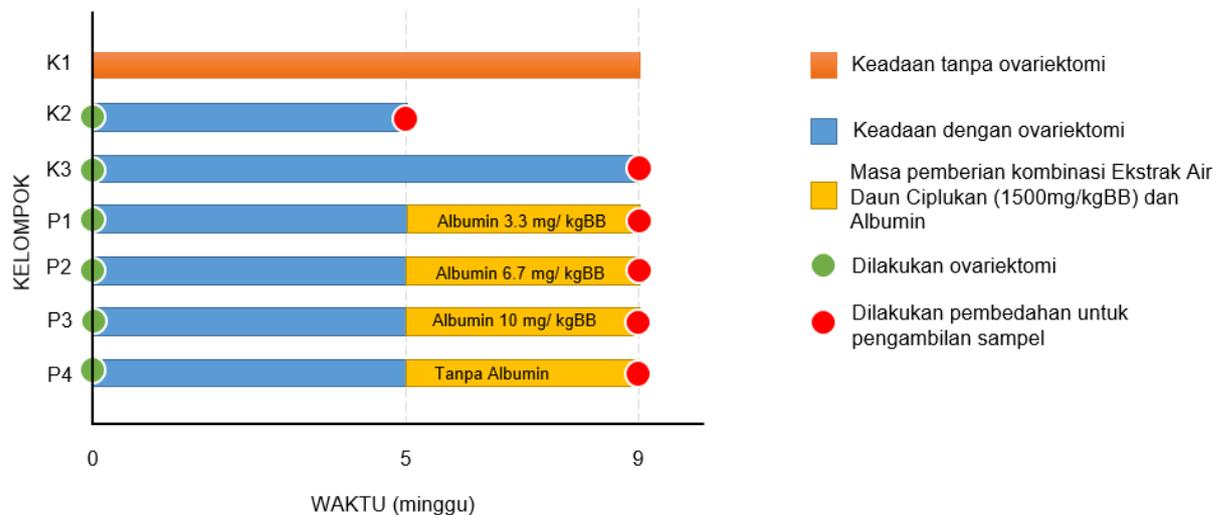
4.8. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif. Hasil perhitungan rata-rata jumlah sel dianalisis secara statistic dengan menggunakan program *SPSS 23.0 for Windows 10* tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Metode analisis menggunakan

- Uji Normalitas Data: bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak. Karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung dari normal tidaknya distribusi data. Untuk data yang terdistribusi normal maka digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Bila tidak terdistribusi normal digunakan median dan minimum-maksimum sebagai ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis akan digunakan uji parametric bila sebaran normal dan uji non-parametrik bagi yang tidak.
- Uji Homogenitas varian: bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian homogen. Jika di dapat varian homogenya, maka akan diuji dengan Uji ANOVA

- Uji *One-way ANOVA*: bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal adadau kelompok yang berbeda signifikan.
- uji *Post hoc Tukey* : bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Uji post hoc yang digunakan adalah Uji *Tukey* dengan tingkat signikan 95% ($p < 0.05$)
- Uji korelasi *Pearson*: untuk mengetahui besarnya perbedaan secara kualitatif kelompok yang berbeda secara signifikan.

4.9. Jadwal Penelitian

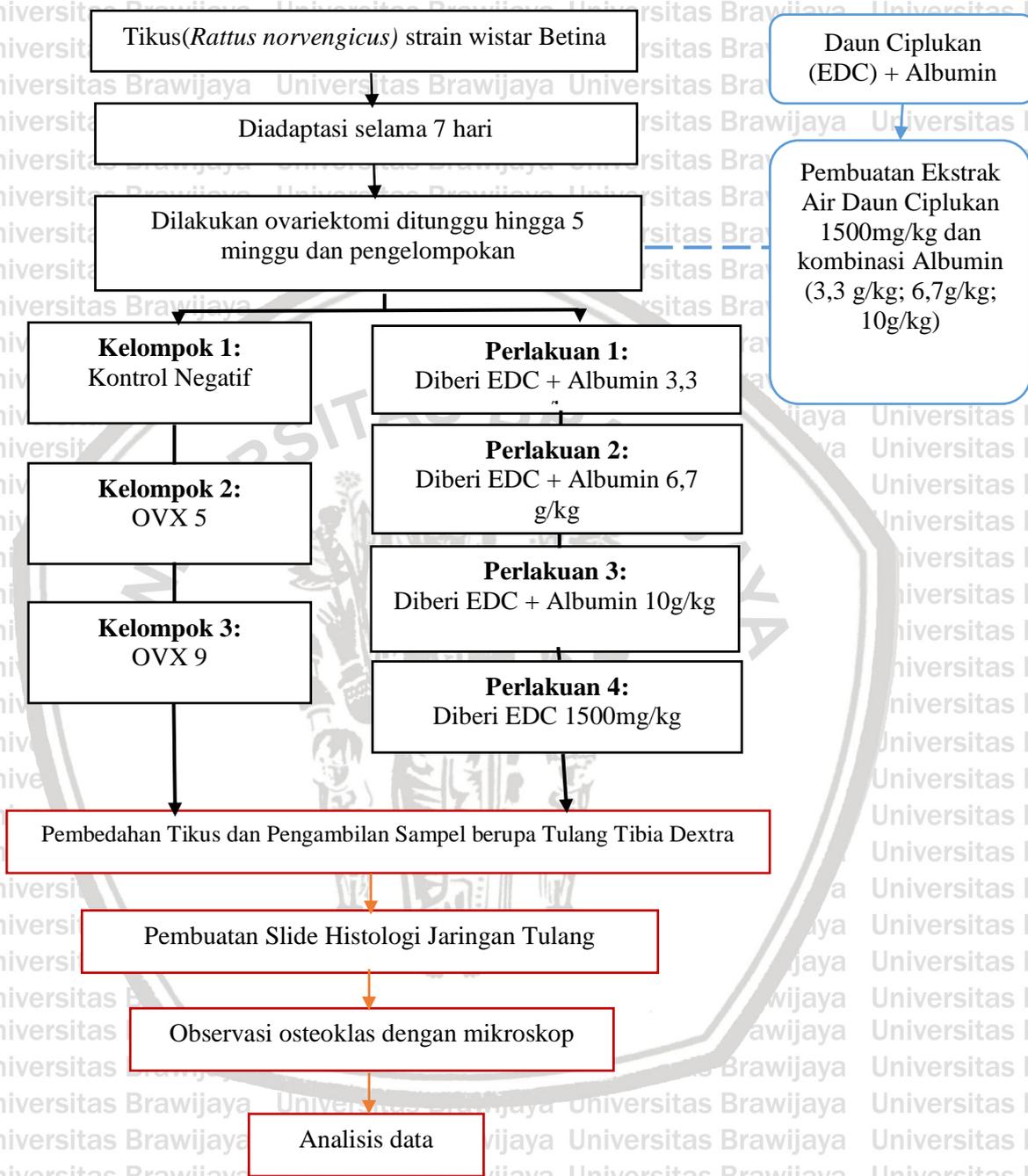


Gambar 4.1 Waktu perlakuan dan pengambilan sampel.

Tabel 4.1 Jadwal Penelitian

Perlakuan	2018								2019								
	Mei	Jun	Jul	Agt	Sep	Okt	Nov	Des	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Jun	Jul	Aug	Sep
Persiapan Hewan Coba	■	■															
Pengelompokan Hewan Coba	■	■	■														
Pembuatan Ekstrak Daun Ciplukan																	
Pembuatan Tikus Ovariectomi																	
Pemberian Ekstrak air Daun Ciplukan																	
Pengambilan Sampel Hewan Coba																	
Pembuatan Preparat Histologi																	
Pemeriksaan Histolog untuk menghitung jumlah osteoclast																	
Analisis Data																	

4.10. Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur kerja penelitian ekstrak air daun ciplukan dan albumin terhadap jumlah osteoklas pada tulang tibia tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar pasca ovariektomi



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1. Hasil Penelitian

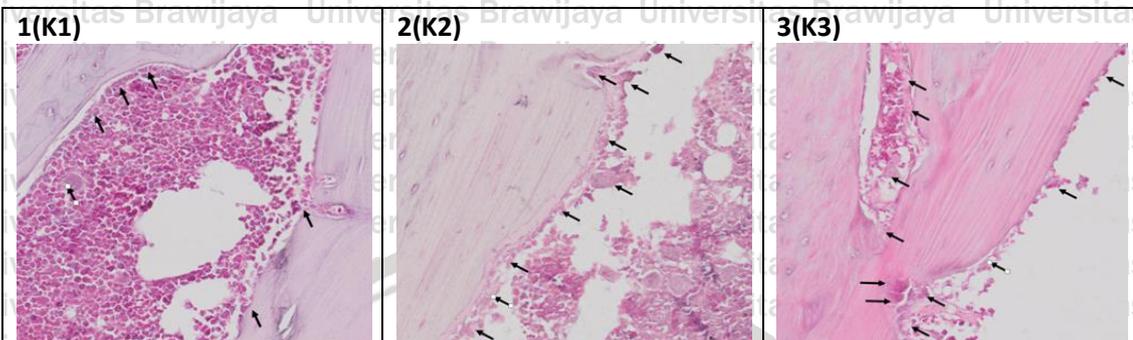
Pada penelitian ini hewan coba di bagi menjadi 7 kelompok yang diberi perlakuan ovariektomi, kecuali pada tikus kelompok pertama kontrol negatif.

Pada 4 kelompok perlakuan diberikan ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg dan albumin dalam berbagai dosis, yaitu 3,3g/kg; 6,7g/kg; 10g/kg; dan tanpa albumin.

Pengambilan data dilakukan dengan pengambilan tulang tibia kanan tikus jenis wistar yang direndam dalam larutan formalin 10% selama 1 bulan. Kemudian, dibuat menjadi preparat histologi dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin*. Lalu dilakukan pengambilan data secara manual dengan menghitung jumlah sel osteoklas pada preparat histologis dengan pemeriksaan mikroskop perbesaran 400x sebanyak 20 kali percobaan disetiap preparatnya yang di scan menggunakan *software dotSlide* mikroskop pencahayaan Olympus XC di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Dari hasil 20 kali percobaan tersebut dilakukan penentuan rata-rata sel osteoklas tiap preparatnya dan juga dari tiap kelompok.

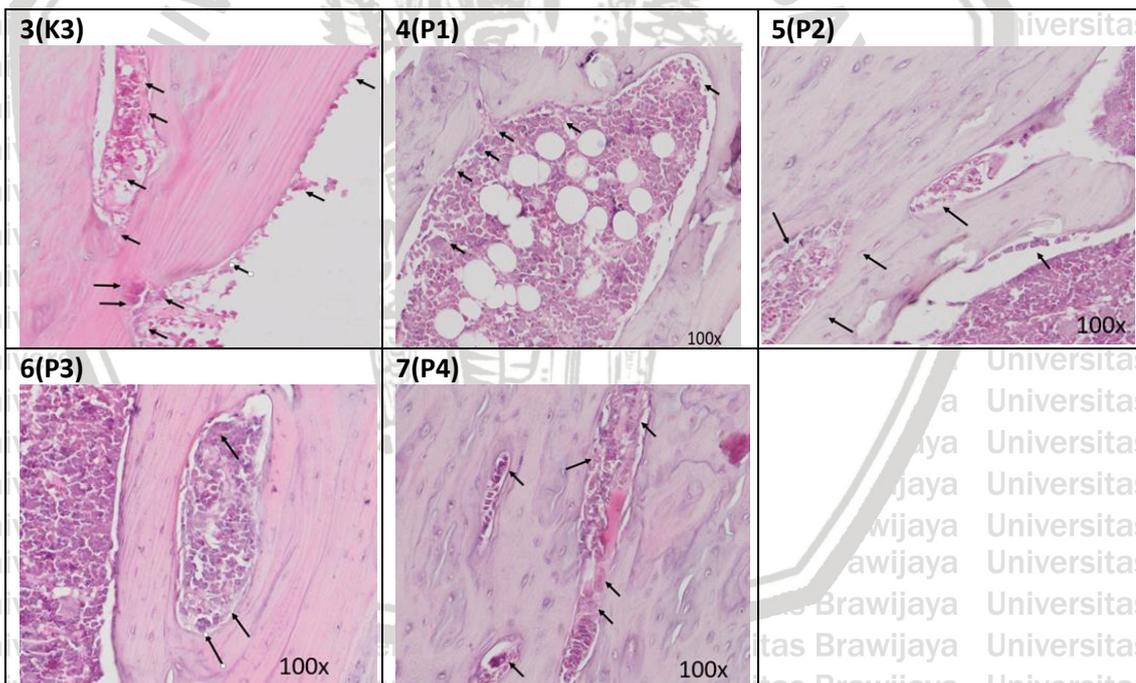
5.1.1. Gambaran Histologis Osteoklas

Gambaran perbandingan hasil pengamatan osteoklas disajikan sebagai berikut:



Gambar 5.1. Gambaran Jumlah Osteoklas Tikus *Rattus norvegicus* Pasca Diberikan Perlakuan Ovariectomi (pada pembesaran 100x)

Gambaran osteoklas dengan pewarnaan HE di bawah mikroskop perbesaran 100x. **Keterangan:** 1(K1) = Kelompok kontrol negative/ normal; 2 (K2) = Kelompok tikus ovariectomi tanpa terapi, yang akan di bedah minggu ke-5; 3 (K3) = Kelompok tikus ovariectomi tanpa terapi, yang akan di bedah minggu ke-9.; → (tanda panah) = menunjukkan sel osteoklas.



Gambar 5.2. Jumlah Osteoklas Tikus *Rattus norvegicus* Pasca Ovariectomi Kontrol Positif dan Perlakuan Pemberian Ciplukan Dosis Tunggal dan Kombinasi (pada pembesaran 100x)

Gambaran osteoklas dengan pewarnaan HE di bawah mikroskop perbesaran 100x. **Keterangan:** 3 (K3) = Kelompok tikus ovariectomi tanpa terapi, yang akan di bedah minggu ke-9; 4 (P1) = Kelompok tikus ovariectomi dan diterapi ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg + albumin 3,3g/kg; 5 (P2) = Kelompok tikus ovariectomi dan diterapi ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg + albumin 6,7g/kg; 6 (P3) = Kelompok tikus ovariectomi dan diterapi ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg + albumin 10g/kg; 7 (P4) = Kelompok tikus ovariectomi dan diterapi ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg.; → (tanda panah) = menunjukkan sel osteoklas.

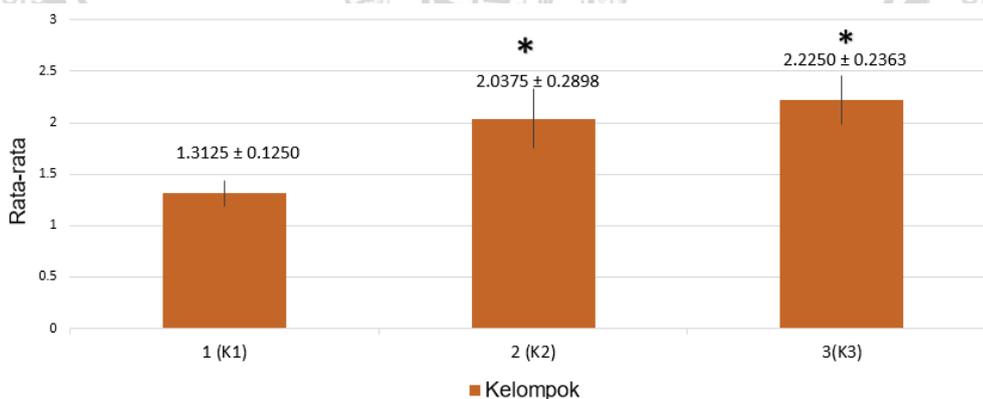
5.1.2. Hasil Perhitungan Osteoklas

Penghitungan jumlah sel osteoklas pada preparat tikus kontrol dan perlakuan menggunakan perbesaran 400x sebanyak 20 kali percobaan dalam masing-masing kelompok perlakuan dapat dilihat pada lampiran 2. Data rerata pada setiap kolompok disajikan sebagai berikut:

Tabel 5.1. Rerata Jumlah Osteoklas Tikus *Rattus norvegicus* pasca Ovariektomi

Kelompok	Rata-rata ± Standar deviasi
1 (K1)	1.3125 ± 0.1250
2 (K2)	2.0375 ± 0.2898
3 (K3)	2.2250 ± 0.2363
4 (P1)	1.2375 ± 0.1109
5 (P2)	1.1375 ± 0.0479
6 (P3)	1.0750 ± 0.0645
7 (P4)	1.3625 ± 0.2496

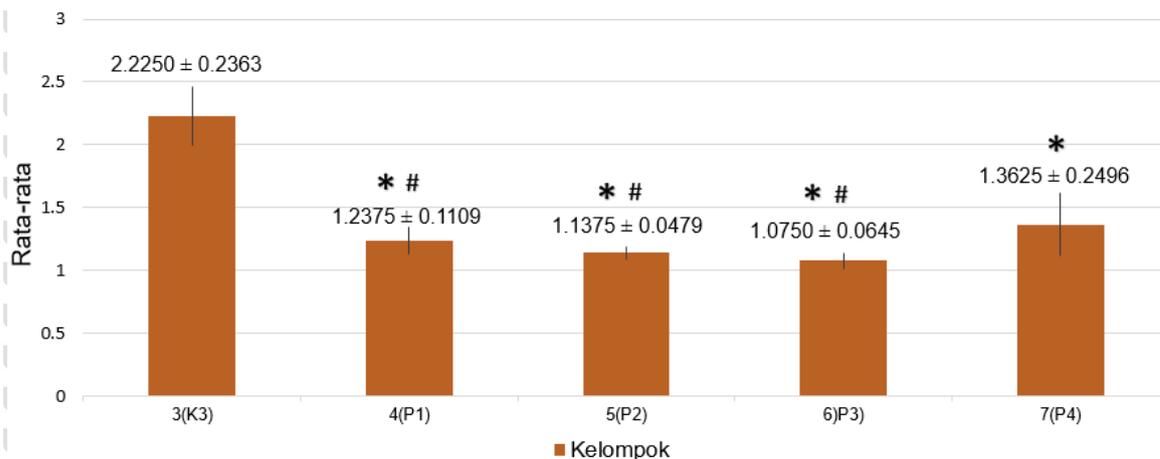
Selanjutnya data hasil perhitungan akan dibuat dalam format mean ± standar deviasi dalam histogram sebagai berikut:



Gambar 5.3. Jumlah Osteoklas Tikus *Rattus norvegicus* Pasca Diberikan Ovariektomi

Diagram batang menggambarkan rerata ± SD jumlah osteoklas. Kelompok: **1(K1)** = Kelompok kontrol negatif; **2 (K2)** = Kelompok tikus ovariektomi tanpa terapi, yang akan di bedah minggu ke-5; **3 (K3)** = Kelompok tikus ovariektomi tanpa terapi, yang akan di bedah minggu ke-9. ***p<0.05** dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.





Gambar 5.4. Jumlah Osteoklas Tikus *Rattus norvegicus* Pasca Ovariektomi Kontrol Positif dan Perlakuan Pemberian Ciplukan Dosis Tunggal dan Kombinasi

Diagram batang menggambarkan rerata ± SD jumlah osteoklas. **3 (K3)** = Kelompok tikus ovariektomi tanpa terapi, yang akan di bedah minggu ke-9; **4 (P1)** = Kelompok tikus ovariektomi dan diterapi ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg + **albumin 3,3g/kg**; **5 (P2)** = Kelompok tikus ovariektomi dan diterapi ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg + **albumin 6,7g/kg**; **6 (P3)** = Kelompok tikus ovariektomi dan diterapi ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg + **albumin 10g/kg**; **7 (P4)** = Kelompok tikus ovariektomi dan diterapi ekstrak air daun ciplukan 1500mg/kg. *p<0.05 dibandingkan kelompok Kontrol Positif K3 OVX9 (signifikan); # p>0.05 dibandingkan kelompok tanpa albumin P4 (tidak signifikan).

5.2. Analisis Data

Data mengenai pengaruh ekstrak air daun *Physalis* dan albumin terhadap jumlah sel osteoklas tikus pasca ovariektomi dianalisis dengan menggunakan

SPSS versi 23.0 untuk *windows 10* dengan metode Uji statistika *One-Way*

ANOVA. Dimana H0 bisa diterima bila nilai signifikansi yang diperoleh > dari

0.05, dan ditolak bila nilai signifikansi < 0.05. Dimana H0 pada penelitian ini

adalah tidak terdapatnya perbedaan jumlah sel osteoklas antar kelompok.

Sedangkan H1, bahwa terdapat perbedaan nilai jumlah sel osteoklas antar kelompok.

Sebelum melakukan analisa data dengan ANOVA, maka perlu terpenuhinya syarat dalam melakukan uji *one-way ANOVA*, yaitu populasi yang akan diuji

memiliki distribusi normal yang akan dicek dengan uji normalitas, varian dari populasi-populasi tersebut adalah sama (homogen) yang akan dicek dengan uji homogenitas.

5.2.1. Uji Normalitas Data

Uji statistik pertama adalah untuk menentukan normalitas data dengan menggunakan Uji *Shapiro-Wilk* (Lihat Lampiran 4) dikarenakan jumlah data kurang dari 50, dimana suatu data dikatakan memiliki sebaran yang normal jika nilai $p > 0.05$. Hasil uji normalitas pada penelitian ini didapatkan nilai $p = 0.179$, sehingga dapat disimpulkan bahwa data terdistribusi secara normal.

5.2.2. Uji Homogenitas

Setelah distribusi normal, selanjutnya diperlukan uji untuk menentukan apakah data jumlah sel osteoklas memiliki varian yang berbeda atau tidak dengan uji homogenitas *Levene*. Dimana disini dilakukan dua uji homogenitas sesuai dengan dua kelompok pengujian ANOVA yang akan dilakukan yang dapat dilihat pada Lampiran 5. Pada uji homogenitas dikatakan data memiliki varian yang normal bila signifikansi $p > 0.05$. Dimana pada kelompok uji pertama yaitu antara kelompok kontrol negatif dan kedua kelompok kontrol positif didapatkan nilai $p = 0.517$ dan pada kelompok uji kedua antara kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan didapatkan nilai $p = 0.653$. Dengan demikian maka analisa data dapat dilakukan dengan menggunakan Uji *One-way ANOVA*.

5.2.3. Uji *Oneway ANOVA*

Berdasarkan uji statistik ini dapat diketahui apakah terdapat perbedaan jumlah sel osteoklas yang signifikan, dimana rata-rata sel osteoklas dianggap signifikan jika nilai $p < 0.05$ atau dengan kata lain hipotesis *null* ditolak.

Dimana pada kelompok uji pertama dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan jumlah osteoklas yang bermakna antara perlakuan pada kelompok tikus kontrol negatif dan kontrol positif (OVX 5 dan OVX 9). Hasil uji *Oneway ANOVA* menunjukkan nilai signifikansi $p = 0.001$ (Lihat pada lampiran 6), sehingga dapat disimpulkan adanya perbedaan jumlah sel osteoklas yang signifikan antara kelompok.

Pada kelompok uji kedua dimaksudkan untuk mengetahui adanya perbedaan jumlah osteoklas antara perlakuan pada kelompok tikus OVX 9 (kontrol positif), P1, P2, P3, dan P4 terhadap kadar osteoklas tikus. Hasil uji *oneway ANOVA* menunjukkan nilai signifikansi $p = 0.000$ (Lihat pada lampiran 6), sehingga dapat disimpulkan adanya perbedaan jumlah sel osteoklas yang signifikan antara kelompok.

5.2.4. Uji *Post Hoc Tukey Multiple Comparison*

Uji Post Hoc pada penelitian ini dilakukan dengan metode Tukey dimana uji ini dilakukan dua kali sesuai dengan kelompok uji statistik pada ANOVA. Uji ini dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan jumlah osteoklas yang bermakna dari setiap kelompok jika dibandingkan dengan kelompok lainnya (lihat pada lampiran 7). Pada uji ini dikatakan signifikan apabila nilai $p < 0.05$. Berdasarkan output uji tersebut didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 5.2. Nilai Signifikansi (p) dari Uji *Post Hoc Tukey* antara kelompok Kontrol Negatif (N), Kontrol Positif (OVX5), dan Kontrol Positif (OVX9)

	K1 (Kontrol Negatif)	K2 (OVX 5)	K3 (OVX 9)
K1 (K. Neg)	-	0.004	0.001
K2 (OVX 5)	0.004	-	0.501
K3 (OVX 9)	0.001	0.501	-

Tabel 5.3. Nilai Signifikansi (p) dari Uji *Post Hoc* Tukey Kelompok Kontrol Positif (OVX9) dan Kelompok Perlakuan (P1,P2,P3,P4)

	K3 (OVX 9)	P1 (D1)	P2 (D2)	P3 (D3)	P4 (Ciplukan)
K3 (OVX 9)	-	0.000	0.000	0.000	0.000
P1	0.000	-	0.909	0.643	0.851
P2	0.000	0.909	-	0.982	0.347
P3	0.000	0.643	0.982	-	0.153
P4	0.000	0.851	0.347	0.153	-

■ Nilai p < 0.05 = terdapat perbedaan bermakna antara kedua grup

Dari tabel diatas dapat disimpulkan bahwa:

1. Terdapat perbedaan yang bermakna, yaitu peningkatan jumlah sel osteoklas pada kelompok tikus yang diberi perlakuan ovariektomi minggu ke-5 ataupun minggu ke-9 dari kelompok tikus kontrol negatif atau tikus normal tanpa perlakuan.
2. Tidak terdapatnya peningkatan jumlah sel osteoklas yang bermakna pada tikus yang di ovariektomi minggu ke-5 dan minggu ke-9
3. Terdapat perbedaan yang bermakna pada penurunan jumlah sel osteoklas pada kelompok tikus ovariektomi yang diberikan ekstrak air daun ciplukan dan albumin berbagai dosis dengan kelompok tikus yang di ovariektomi minggu ke-9 tanpa diberi pengobatan.
4. Tidak terdapatnya penurunan jumlah sel osteoklas yang bermakna pada kelompok tikus yang diberikan campuran ekstrak air daun ciplukan 1500 mg/KgBB baik dengan dosis albumin 3,3 mg/kg, 6,7 mg/kg, 10mg/kg, ataupun tanpa campuran albumin.

5.2.5. Uji Korelasi *Pearson*

Uji Korelasi *pearson* ditujukan untuk mengukur kekuatan hubungan dua



variable atau lebih, dalam penelitian ini uji korelasi pearson digunakan untuk membuktikan korelasi antara peningkatan dosis albumin terhadap jumlah sel osteoklas.

Terdapat kategori untuk mengetahui kuat lemahnya sebuah korelasi, dimana:

- Nilai korelasi 0 = tidak adanya korelasi antara variable
- Nilai korelasi $>0 - 0.25$ = sangat lemah
- Nilai korelasi $>0.25 - 0.5$ = cukup
- Nilai korelasi $> 0.5 - 0.75$ = kuat
- Nilai korelasi $>0.75 - 0.99$ = sangat kuat
- Nilai korelasi 1 = sempurna

Korelasi yang terjadi bisa positif dan negatif, korelasi positif bermakna adanya hubungan yang searah antara dua variable, sedangkan untuk korelasi yang negatif artinya terdapat hubungan yang bertolakbelakang antara variable.

Signifikansi kedua variable dapat dianalisis dengan melihat nilai signifikansinya, dimana dikatakan bermakna bila nilai signifikansi $p < 0.05$. Untuk hasil perhitungan korelasi *pearson* terhadap data penelitian (lampiran 8) didapatkan beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Terdapat koefisien korelasi sebesar -0.659 dimana menunjukkan korelasi yang kuat antara penambahan albumin berbagai dosis pada jumlah sel osteoklas pada tikus.
2. Nilai koefisien negatif artinya semakin tinggi dosis albumin maka terjadi penurunan jumlah sel osteoklas pada tikus.
3. Didapatkan nilai signifikansi $p = 0.002$, dimana nilai $p < 0.05$ maka nilai korelasi dapat disimpulkan bermakna atau signifikan.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1. Jumlah Osteoklas *Tikus Rattus novergicus* Strain Wistar pada Kontrol Negatif dan Kontrol Positif OVX 5 dan OVX 9

Jumlah osteoklas pada kelompok yang dilakukan ovariektomi mengalami peningkatan secara signifikan dibandingkan tikus normal, dan juga terdapat peningkatan jumlah osteoklas pada kelompok tikus OVX 9 jika dibandingkan dengan OVX 5 (Gambar 5.1). Hal ini membuktikan bahwa jumlah osteoklas tikus yang diovariektomi lebih tinggi daripada tikus normal, dan jika keadaan hipoestrogen ini tidak diterapi dalam waktu lama, jumlah osteoklas akan terus meningkat. Hal ini selaras dengan penelitian Devitaningtyas *et al* (2018) yang membuktikan bahwa jumlah osteoklas meningkat pada tikus pasca ovariektomi.

Peningkatan jumlah osteoklas pada tikus yang diovariektomi terjadi dikarenakan keadaan hipoestrogen yang menyebabkan beberapa mekanisme peningkatan osteoklastogenesis. Menurut Khalid dan Krum (2016) terjadi peningkatan sitokin pro-osteoklastogenesis atau sitokin yang menjadi prekursor pembentukan osteoklas seperti: IL-1, IL-6, IL-7, dan TNF- α . Interleukin-6 dapat mempromosikan terjadinya hematopoiesis dan osteoklastogenesis. Osteoklastogenesis juga diregulasi oleh dua sitokin utama yang diproduksi oleh sel stromal dan osteoblast yaitu RANKL dan M-CSF (*Macrophage colony stimulating factor*), saat RANKL teraktivasi dengan pertemuan dengan RANK diikuti aktivasi M-CSF maka akan terjadi ekspansi diferensiasi osteoklas (Lerner U.H, 2006), pada kondisi defisiensi estrogen terjadi *upregulation* pada RANKL

dan penurunan pada stimulasi produksi OPG yang merupakan antagonis RANKL, sehingga terjadinya penyerapan pada tulang (Sipos, *et al.*, 2009). Keadaan hipoestrogen juga menghambat pada induksi apoptosis pada sel osteoklas secara langsung. Estrogen yang berkerja dalam meningkatkan apoptosis pada osteoklas melalui reseptornya yaitu ER- α yang berada di permukaan osteoklas dan ER- β berada di inti dari osteoklas. Pada penelitian sebelumnya 17- β estradiol secara khusus meningkatkan regulasi ER- α dan fitoestrogen secara khusus meningkatkan regulasi ER- β (Rassi, *et al.*, 2002).

Maka pemberian perlakuan ovariectomi pada tikus dapat menggambarkan kondisi *menopausen* dengan keadaan hipoestrogen jumlah osteoklas akan semakin meningkat diikuti dengan meningkatkan aktivitas penyerapan tulang.

6.2. Osteoklas Tikus *Rattus norvegicus* Strain Wistar pada Kontrol Positif OVX9, Kelompok Perlakuan Ciplukan Dosis Tunggal dan Kombinasi.

Hasil penelitian pada kelompok perlakuan menunjukkan penurunan jumlah sel osteoklas yang signifikan pada tikus yang diberi ekstrak daun *Physalis* dengan kombinasi albumin dan *Physalis* saja jika dibandingkan dengan kelompok tikus pasca ovariectomi 9 minggu yang tidak diterapi. Ditunjukkan pada hasil uji statistik *post hoc tukey* nilai $p < 0.05$ pada perbandingan umlah sel osteoklas OVX9 dengan *physalis* dosis tunggal maupun kombinasi. Selain itu, terjadi penurunan terhadap jumlah osteoklas tikus yang diberi kombinasi ekstrak *Physalis* dan albumin jika dibandingkan dengan jumlah osteoklas tikus pasca ovariectomi yang diberikan ekstrak *Physalis* dosis tunggal, walaupun tidak signifikan secara statistik. Akan tetapi memiliki korelasi *dose-response* signifikan dan kuat. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak air daun *Physalis* dapat

menurunkan jumlah osteoklas secara signifikan, dan pemberian albumin yang dikombinasikan dapat menurunkan jumlah sel osteoklas walaupun tidak signifikan secara statistik.

Hal ini berkaitan dengan peranan estrogen dalam hal mencegah dan memperbaiki osteoporosis dengan cara menurunkan aktifitas osteoklas sehingga terjadi keseimbangan proses pembentukan dan penghancuran tulang. Pada penelitian sebelumnya didapatkan tanaman *Physalis minimal L.* atau ciplukan terdapat suatu kandungan *estrogen like substance* atau fitoestrogen di dalamnya yaitu Physalin (Permatasari, et al., 2007) dan juga withanolides (Lestari B., et al., 2016). Pada penelitian Permatasari, et al. (2013) pemberian estrogen dosis 1500 mg/kgBB mampu meningkatkan kadar estradiol tikus wistar (*Rattus novergicus*) secara signifikan, dan dapat membuktikan Physalis dengan dosis tunggal 1500mg/kgBB memiliki kandungan fitoestrogen dosis tinggi yang mampu bekerja pada reseptor estrogen.

Hal ini selaras dengan penelitian Darmadi, et al. (2013) tentang fitoestrogen pada kacang tunggak. Pada pemberian senyawa fitoestrogen dapat menurunkan jumlah osteoklas dimana fito estrogen dapat melewati membrane sel dan berinteraksi dengan reseptor estrogen salah satunya di tulang. Fitoestrogen dapat berikatan berikatan langsung dengan reseptor estrogen baik dengan ER- α maupun dengan ER- β . Selanjutnya fitoestrogen dapat bekerja langsung di osteoklas meningkatkan apoptosis dan akan merangsang aktivitas osteoblast dalam memproduksi OPG sebagai antagonis RANKL dalam proses osteoklastogenesis dan menghambat terjadinya pengeroposan tulang. Pada fitoestrogen ekspresi ER- β meningkat selama mineralisasi tulang dan dengan afinitas yang tinggi dapat membuat efisiensi dalam level fisiologis.

Pada penelitian ini, terdapat penambahan albumin pada ekstrak *Physalis* yang dapat meningkatkan efektivitas ekstrak *Physalis* dan menurunkan jumlah osteoklas pada tulang tibia tikus wistar. Dimana menurut penelitian sebelumnya peningkatan pelepasan estrogen dari nanopartikel PLGA pada penambahan albumin sebesar 3 g/dL. Tanpa albumin, estrogen tidak ditranspor melewati membran, sehingga *total release* estrogen tidak signifikan. Sementara itu, dengan albumin, 95% *free estrogen* ditranspor melewati membran pada 3 hari pertama. Hal ini dapat menjelaskan kemampuan albumin untuk mentranspor komponen hidrofobik (dalam hal ini estrogen) melewati membran semipermeabel (Gil *et al.*, 2017). Dapat disimpulkan, kombinasi ekstrak *Physalis* dengan albumin dapat mentranspor fitoestrogen dalam *Physalis* melewati membrane lebih baik, sehingga kombinasi tersebut lebih efektif dalam menurunkan jumlah osteoklas daripada pemberian *Physalis* saja.

Pada penelitian *observational* yang dilakukan Afshinnia, et al. (2016) menemukan bahwa kadar albumin 3 g/dL atau kurang dapat meningkatkan kemungkinan terkena osteoporosis pada manusia. Pada penelitian tersebut didapatkan nilai BMD terendah didapatkan pada kelompok dengan kadar serum albumin terendah. Mekanisme kerja yang mendasari hubungan antara albumin dan osteoporosis masi belum jelas, diduga albumin dapat bekerja secara langsung dengan NF- κ B yang diketahui merupakan aktivator osteoklas dan menekan osteogenesis atau sebagai reaktan fase akut yang secara tidak langsung terkait dengan NF- κ B melalui hubungannya dengan sitokin inflamasi seperti aktivator reseptor ligan NF- κ B, TNF α , limfotoksin, endotoksin bakteri, CD40L, IL-1, atau *oxygen radicals*. Disimpulkan adanya hubungan independen

antara osteoporosis dan hypoalbuminemia, dan albumin serum dan kadar protein total cenderung menurun pada wanita osteoporosis pascamenopause.

Berdasarkan uji korelasi Pearson hubungan antara dosis albumin dan jumlah osteoklas tikus kuat ($r = -0.659$) dan bernilai negatif yang mana semakin tinggi dosis albumin maka semakin kecil pula rerata osteoklas pada tikus. Tinggi nya korelasi antara dosis albumin dan rerata jumlah sel osteoklas secara statistik disebabkan oleh afinitas albumin yang tinggi terhadap steroid yang bersirkulasi ketika konsentrasi meningkat, Estrogen terkonjugasi memiliki afinitas yang tinggi terhadap albumin (Gruber, 2002). Dalam penelitian ini albumin sebagai transporter dari fitoestrogen yang mengandung zat aktif isoflavon withanolides pada ekstrak air daun *Physalis angulate L* dan juga dapat meningkatkan bioavailabilitas dari obat sehingga bisa bertahan lebih lama dan lebih baik terserap pada target organ (Perkin, 2012)

6.3. Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan penelitian ini adalah tidak adanya pengukuran albumin pada tikus sebelum diovariectomi dan sebelum diberikan perlakuan sehingga tidak adanya nilai normal sebagai pembandingan.

Keterbatasan lainnya juga dimana adanya subjektifitas pada pembacaan dan penghitungan sel osteoklas pada hasil Histo PA.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan mengenai potens ekstrak air daun *Physalis* dan albumin terhadap jumlah sel osteoklas tikus wistar pasca ovariektomi, maka dapat disimpulkan bahwa:

- a. Ekstrak air daun ciplukan dan albumin dapat menurunkan jumlah osteoklas pada tulang tibia tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar pasca ovariektomi
- b. Terdapat peningkatan jumlah sel osteoklas tulang tibia pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang lebih tinggi secara signifikan 4 minggu pasca ovariektomi dan 9 minggu pasca ovariektomi.
- c. Jumlah sel osteoklas setelah pemberian ekstrak air daun ciplukan (*Physalis angulate L.*) tanpa albumin dan dengan albumin lebih rendah signifikan jika dibandingkan dengan pasca ovariektomi 9 minggu. Dosis ekstrak air daun ciplukan (*Physalis angulate L.*) dan albumin yang dapat menurunkan paling tinggi jumlah sel osteoklas tikus wistar (*Rattus norvegicus*) pasca ovariektomi adalah pemberian ekstrak air daun ciplukan dosis 1500mg/kgBB dan albumin 10g/kg.
- d. Terdapat hubungan *dose-response* pemberian kombinasi dosis albumin dan ekstrak air daun ciplukan (*Physalis angulate L.*) dengan penurunan jumlah sel osteoklas tulang tibia tikus wistar (*Rattus norvegicus*) pasca ovariektomi, dengan arah korelasi negatif, yang berarti semakin besar

dosis albumin yang dikombinasikan maka semakin kecil jumlah sel osteoklas.

7.2 Saran

Guna pengembangan keilmuan dapat, saran-saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya:

- a. Perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut tentang kandungan senyawa lain yang berpotensi memiliki efek estrogenik sebagai fitoestrogen pada *Physalis*.
- b. Perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme nonselular sehubungan dengan ciplukan pada inhibisi osteoklas.
- c. Saran untuk masyarakat umum: agar dapat mencegah terjadinya osteoporosis dengan melakukan aktivitas fisik yang rutin sedini mungkin, memeriksakan diri ke pelayanan kesehatan untuk mencegah komplikasi dari osteoporosis. Masyarakat juga diharapkan bisa aktif mencari informasi, pencegahan dan pengobatan untuk osteoporosis, salah satunya dengan memanfaatkan bahan-bahan dari alam yang mengandung fitoestrogen seperti ciplukan.

DAFTAR PUSTAKA

Afshinnia, F. and Pennathur, S., 2016. Association of hypoalbuminemia with osteoporosis: analysis of the National Health and Nutrition Examination Survey. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(6), pp.2468-2474.

Afshinnia, F., Wong, K. K., Sundaram, B., Ackermann, R. J., & Pennathur, S. (2016). *Hypoalbuminemia and Osteoporosis: Reappraisal of a Controversy*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(1), 167–175.

Ahn, H. J., Moon, D. S., Kang, D. Y., Lee, J. I., Kim, D. Y., Kim, J. H., ... Bae, H. Y. (2016). *Urinary Albumin Excretion Reflects Cardiovascular Risk in Postmenopausal Women without Diabetes: The 2011 to 2013 Korean National Health and Nutrition Examination Survey*. *Endocrinology and Metabolism*, 31(4), 537

Baker, M.E., 1998. Albumin's role in steroid hormone action and the origins of vertebrates: is albumin an essential protein?. *Febs Letters*, 439(1-2), pp.9-12.

CABI Invasive Species Compendium online data sheet. *Physalis angulata* (cutleaf groundcherry). CABI Publishing 2011. www.cabi.org/ISC. diakses pada Desember 2018

Damu, A.G., Kuo, P.C., Su, C.R., Kuo, T.H., Chen, T.H., Bastow, K.F., Lee, K.H. and Wu, T.S., 2007. Isolation, structures, and structure– cytotoxic activity relationships of withanolides and physalins from *Physalis angulata*. *Journal of Natural Products*, 70(7), pp.1146-1152.

- Devitaningtyas, N., Permatasari, N. and Sidharta, R., 2018. PENGARUH PEMBERIAN LIMBAH CAIR TAHU SEBAGAI ISOFLAVON TERHADAP JUMLAH SEL OSTEOKLAS PADA TULANG MANDIBULAR TIKUS WISTAR (RATTUS NORVEGICUS) PASCA OVARIEKTOMI. *E-Prodenta Journal of Dentistry*, 2(2), pp.155-162.
- Drake, M.T., Clarke, B.L. and Lewiecki, E.M., 2015. The pathophysiology and treatment of osteoporosis. *Clinical therapeutics*, 37(8), pp.1837-1850.
- D'Erasmus, E., Pisani, D., Ragno, A., Raejntroph, N., Letizia, C., & Acca, M. (1999). *Relationship Between Serum Albumin and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women and in Patients with Hypoalbuminemia. Hormone and Metabolic Research*, 31(06), 385–388. doi:10.1055/s-2007-978760
- Gil, D., Frank-Kamenetskii, A., Barry, J., Reukov, V., Xiang, Y., Das, A., Varma, A.K., Kindy, M.S., Banik, N.L. and Vertegel, A., 2018. Albumin-Assisted Method Allows Assessment of Release of Hydrophobic Drugs From Nanocarriers. *Biotechnology journal*, 13(1), p.1700337.
- Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., & Huber, J. C. (2002). *Production and Actions of Estrogens. New England Journal of Medicine*, 346(5), 340–352. doi:10.1056/nejmra000471
- Hayashi, T. and Yamada, T., 2008. Association of bioavailable estradiol levels and testosterone levels with serum albumin levels in elderly men. *The Aging Male*, 11(2), pp.63-70.
- Jagtap, M.V.R., 2017. Serum Total Proteins, Albumin and Magnesium Levels in Pre and Post Antiresorptive Therapy in Postmenopausal Osteoporosis. Can Magnesium Play a Key Role in Osteoporosis?. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 13(1), pp.23-29.

Khalid, A.B. and Krum, S.A., 2016. Estrogen receptors alpha and beta in bone.

Bone, 87, pp.130-135.

Kusumaningtyas, R., Laily, N. and Limandha, P., 2015. Potential of ciplukan

(*Physalis angulata* L.) as source of functional ingredient. *Procedia*

Chemistry, 14, pp.367-372.

Lerner, U.H., 2006. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *Journal*

of dental research, 85(7), pp.584-595

Lestari, B., Permatasari, N. and Rohman, M.S., 2016. *Methanolic Extract of*

Ceplukan Leaf (Physalis minima L.) Attenuates Ventricular Fibrosis through

Inhibition of TNF- α in Ovariectomized Rats. Advances in pharmacological

sciences, 2016.

Levin, E.R., 2009. Plasma membrane estrogen receptors. *Trends in*

Endocrinology & Metabolism, 20(10), pp.477-482.

Mahalakshmi, A.M. and Nidavani, R.B., 2014. *Physalis angulata* L.: An

ethanopharmacological review. Indo American Journal of Pharmaceutical

Research.

Miyauchi, Y., Sato, Y., Kobayashi, T., Yoshida, S., Mori, T., Kanagawa, H.,

Katsuyama, E., Fujie, A., Hao, W., Miyamoto, K. and Tando, T., 2013.

HIF1 α is required for osteoclast activation by estrogen deficiency in

postmenopausal osteoporosis. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences, p.201308755.

Nugrahenny, D., Permatasari, N. and Rohman, M.S., 2018. *Physalis minima*

Leaves Extract Induces Re-Endothelialization in Deoxycorticosterone

Acetate-Salt-Induced Endothelial Dysfunction in Rats. Research Journal of

Life Science, 4(3), pp.199-208.

Pacific Island Ecosystems at Risk (PIER). *Physalis angulata* L., Solanaceae:

plant threats to Pacific ecosystems.

www.hear.org/pier/species/physalis_angulata.htm. Institute of Pacific

Islands Forestry, Hawaii, USA. Diakses pada Desember 2018.

Permatasari, N., Kumala, Y.R. and Sulakso, T., 2017. Efek Ekstrak Daun

Ciplukan (*Physalis minima* L.) terhadap Kadar Malondialdehid Tulang

Mandibula Tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar Pasca Ovariektomi.

PRODENTA JOURNAL OF DENTISTRY, 1(1), pp.35-46.

Rachner, T.D., Khosla, S. and Hofbauer, L.C., 2011. Osteoporosis: now and the

future. *The Lancet*, 377(9773), pp.1276-1287.

Ross, F.P., 2011. Osteoclasts. In *Vitamin D (Third Edition)*, pp. 335-347.

Sandhu, S.K. and Hampson, G., 2011. The pathogenesis, diagnosis,

investigation and management of osteoporosis. *Journal of clinical*

pathology, 64(12), pp.1042-1050.

Sipos, W., Pietschmann, P., Rauner, M., Kersch-Schindl, K. and Patsch, J.,

2009. Pathophysiology of osteoporosis. *Wiener Medizinische*

Wochenschrift, 159(9-10), pp.230-234.

Soares, M.B.P., Brustolim, D., Santos, L.A., Bellintani, M.C., Paiva, F.P., Ribeiro,

Y.M., Tomassini, T.C.B. and Dos Santos, R.R., 2006. Physalins B, F and

G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte

function and allogeneic transplant rejection. *International*

Immunopharmacology, 6(3), pp.408-414.

Soeharto, S., Nugrahenny, D., Permatasari, N. and Mayangsari, E., 2018.

Subchronic Toxicity of the *Physalis minima* Leaves. *Research Journal of*

Life Science, 5(1), pp.77-82.

Ts, D.D., Nurdiana, N. and Norahmawati, E., 2013. Efek Ekstrak Kacang T
unggak terhadap Osteoblas dan Osteoklas pada Tikus dengan Ovarektomi.

Jurnal Kedokteran Brawijaya, 26(3), pp.151-155.

Usui, T., 2006. Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. *Endocrine journal*,
53(1), pp.7-20

Wiyasa, I.W.A., Norahmawati, E. and Soehartono, S., 2011. Effect of isoflavones
genistein and daidzein tokbi extract (*Pueraria lobata*) Kangean strain
against the number of osteoblasts and osteoclasts *Rattus Wistar overgicus*
hipoestrogenik. *Indonesian Journal of Obstetrics and Gynecology*, 32(3),
pp.148-152.

Yildiz, F., 2005. *Phytoestrogens in Functional Foods*. Taylor & Francis Ltd, pp 3–
5, 210–211. ISBN 978-1-57444-508-4.

