

Ekstrak Batang Sipatah-Patah Meningkatkan Proliferasi dan Diferensiasi Sel Punca Mesenkimal Sumsum Tulang

(*CISSUS QUADRANGULA SALISB STEM EXTRACT INCREASED PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF RATS BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELL*)

Ria Ceriana¹, Ita Djuwita², Tutik Wresdiyati^{3*}

¹Program Studi Anatomi dan Perkembangan Hewan,

²Laboratorium Embriologi. ³Laboratorium Histologi,

Bagian Anatomi, Histologi dan Embriologi,

Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan,

Institut Pertanian Bogor, Jln Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor, 16680.

Email: tutikwr@gmail.com, Telp. (0251) 8626064

*Corresponding author

Abstrak

Masyarakat Aceh secara tradisional menggunakan batang Sipatah-patah (*Cissus quadrangula* Salisb.) untuk penyembuhan berbagai penyakit tulang. Sel punca mesenkimal terdapat pada sumsum tulang dan dapat didiferensiasikan menjadi berbagai tipe sel seperti osteoblas, adiposit dan kondrosit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi dan dosis optimal *C. quadrangula* (CQ) dalam meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel punca mesenkimal sumsum tulang tikus menjadi osteosit. Sel punca mesenkimal diisolasi dari tulang femur dan tibia tikus. Pada penelitian ini terdapat lima kelompok perlakuan dan setiap perlakuan terdiri dari empat ulangan. Semua kelompok perlakuan menggunakan medium *modified Dulbecco's modified eagles's medium* (mDMEM). Pada kelompok perlakuan kontrol tidak ditambahkan ekstrak batang Sipatah-patah, sedangkan pada kelompok perlakuan diberikan ekstrak batang Sipatah-patah sebanyak 0,1 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,6 mg/mL, dan 0,9 mg/mL. Tingkat proliferasi sel diukur menggunakan teknik *population doubling time* (PDT). Diferensiasi sel diukur dengan penghitungan jumlah dan diameter osteoblas dan osteosit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan ekstrak CQ dapat menurunkan nilai PDT secara sangat nyata ($P < 0,01$) dibandingkan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak batang Sipatah-patah dapat meningkatkan proliferasi sel punca mesenkimal sumsum tulang. Jumlah osteoblas pada kelompok perlakuan kontrol paling rendah secara sangat nyata ($P < 0,01$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak batang Sipatah-patah. Jumlah osteosit pada kelompok 0,3 mg/mL paling tinggi secara sangat nyata ($P < 0,01$) dibandingkan kelompok perlakuan lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak batang Sipatah-patah dapat meningkatkan diferensiasi sel. Simpulan yang dapat ditarik bahwa ekstrak batang Sipatah-patah dapat meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel punca mesenkimal sumsum tulang tikus menjadi osteoblas dan osteosit. Dosis optimal ekstrak batang Sipatah-patah tersebut adalah 0,3 mg/mL.

Kata-kata kunci : *Cissus quadrangula* Salisb., Sipatah-patah, sel punca mesenkimal, proliferasi, diferensiasi.

ABSTRACT

Acehnese people uses *Cissus quadrangula* (CQ) Salisb stem traditionally for treatment of various bone disease. can differentiate into many different cell types such as osteoblast, adipocyte and chondrocytes. A study was conducted to determine the potential uses and the optimal dosage of *C. quadrangula* (CQ) extract in increasing the proliferation and differentiation of Mesenchymal stem cells derived from bone marrow of rat osteocytes. Mesenchymal stem cells were isolated from femoral and tibial rat bone marrow. The cells were cultured according to the experimental group consisting of five the treatment groups each of which has 4 replication. The cells were cultured in *modified Dulbecco's modified eagles's medium* (mDMEM). Control were cultured in medium without *Cissus quadrangula* Salisb stem extract whereas the treatment group were cultured in medium with k 0,1 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,6 mg/mL, dan 0,9 mg/mL *Cissus quadrangula* Salisb stem extract. The level of the cell proliferation was determined by *population doubling time* (PDT)

method. Cell differentiation was determined by counting cells and determining the diameter of osteoblast dan osteocytes. The result showed that CQ stem extract reduced PDT values significantly ($P < 0,01$) as compared to those of control group. This showed that CQ stem extract increased the rat bone marrow stem cells. The number of h osteoblast in control group were significantly lower than those in CQ stem extract treatment groups. The highest osteocyte population was observed in 0,3 mg/mL CQ extract treatment group. The CQ stem extract can increase differentiation and proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into osteoblast and osteocytes with the optimal dose of 0,3 mg/mL.

Keyword : *Cissus quadrangula* Salisb., stem cells, rat, bone marrow mesenkimal, proliferasi, diferensiasi.

PENDAHULUAN

Masyarakat sudah lama menggunakan obat-obatan tradisional yang berasal dari tumbuh-tumbuhan. Salah satu tanaman yang digunakan oleh masyarakat Indonesia khususnya di Aceh adalah tanaman Sipatah-patah (*Cissus quadrangula* Salisb.). Masyarakat memanfaatkan tanaman Sipatah-patah sebagai obat penyembuh penyakit seperti rematik dan patah tulang. Pengobatan rematik dilakukan dengan meminum rebusan daun tumbuhan tersebut dan ditambahkan dengan unsur-unsur yang lain. Pengobatan patah tulang dilakukan dengan cara meminum air rebusan dan plester eksternal (Sabri *et al.*, 2009). Menurut Senthamari *et al.*, (2013) ekstrak CQ memiliki aktivitas antiartritik yang dapat mengurangi peradangan pada rematik. Sendi yang semula terlihat kemerahan, bengkak dan sendi yang imobilitas semakin membaik setelah diberikan perlakuan ekstrak CQ. Menurut Deka *et al.*, (1994), CQ dapat mempercepat proses penyembuhan tulang radius ulna pada anjing dan dibuktikan dengan menggunakan radiograf. Tanaman ini berpotensi dapat menangani inflamasi dan perbaikan jaringan tulang yang rusak.

Menurut Sabri *et al.*, (2009), ekstrak batang Sipatah-patah mengandung kalsium yang lebih tinggi dibandingkan dengan jenis *C. quadrangularis* Linn yang terdapat di India. Selain itu, batang Sipatah-patah mengandung fitoestrogen yang termasuk golongan steroid. Kandungan kalsium pada tanaman ini bermanfaat dalam membantu pemenuhan kalsium dalam proses osteogenesis sedangkan fitoestrogen dapat menggantikan fungsi estrogen pada wanita. Djuwita *et al.*, (2012), melaporkan bahwa ekstrak batang Sipatah-patah dapat membantu proses osteogenesis dengan terjadinya proliferasi dan diferensiasi sel tulang menjadi osteoblas. Jadi, ekstrak batang Sipatah-patah berpotensi sebagai bahan suplemen atau obat untuk membantu proses osteogenesis dan

perbaikan kerusakan tulang.

Proses osteogenesis pada tulang dapat bersumber dari sel osteoprogenitor yang selanjutnya menjadi preosteoblas (Mescher, 2010) dan sel punca mesenkimal (*mesenchymal stem cell*) (Baron, 2008). *Mesenchymal stem cell* (MSC) dapat didefinisikan sebagai sel yang mampu berkembang (berdiferensiasi) menjadi berbagai tipe sel mesenkim seperti fibroblas, kondrosit, osteoblas, mioblas, dan adiposit (Halim *et al.*, 2010). Jaringan MSC pertama kali diidentifikasi dalam sumsum tulang manusia sebagai sel yang mampu berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi jaringan ikat seperti tulang dan kartilago (Lanza *et al.*, 2006). Sel ini dapat ditemukan dalam berbagai jaringan dewasa seperti lemak (Zuk *et al.*, 2001), sumsum tulang tibia dan femur (Murphy *et al.*, 2002), dan bagian jaringan fetus seperti plasenta (Miao *et al.*, 2004) dan darah tali pusat (Secco *et al.*, 2008). Jaringan MSC mampu berdiferensiasi menjadi osteosit, kondrosit, adiposit dan berbagai jenis sel penyusun jaringan ikat (Vaananen, 2005). Selain itu, MSC dapat mengalami transdiferensiasi (yang menyebabkan perubahan alur diferensiasi) menjadi sel saraf (Halim *et al.*, 2010).

Mesenchymal stem cell dapat digunakan untuk pengobatan berbagai penyakit degeneratif di antaranya osteoporosis melalui terapi penggantian sel (Bongso dan Richards, 2004). Ekstrak batang Sipatah-patah (Sabri *et al.*, 2009) dan *C. quadrangularis* (Potu *et al.*, 2010), dapat meningkatkan kualitas tulang pada tikus ovariektomi dengan adanya peningkatan ketebalan kortikal dan trabekula tulang. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak batang Sipatah-patah dapat membantu proses osteogenesis dan perbaikan jaringan tulang. Ekstrak *C. quadrangularis* dapat meningkatkan ketebalan kortikal dan trabekula pada tulang femur fetus tikus (Rao *et al.*, 2007). Sabri *et al.*, (2011) melaporkan bahwa pemberian CQ dapat meningkatkan kualitas tulang fetus yaitu adanya pertambahan panjang

tulang femur dan membuat rangka tubuh semakin besar pada masa pertumbuhan. Djuwita *et al.*, (2012) melaporkan bahwa terjadi peningkatan proliferasi sel tulang akibat pemberian ekstrak CQ secara *in vitro*. Ekstrak CQ dapat membantu pertumbuhan tulang. Namun demikian, potensi ekstrak batang Sipatah-patah dalam meningkatkan proliferasi dan diferensiasi MSC pada sumsum tulang untuk menjadi osteoblas dan osteosit belum diketahui. Penelitian ini penting dilakukan untuk mengetahui kemampuan induksi dari ekstrak batang Sipatah-patah pada MSC sumsum tulang untuk menjadi osteoblas dan osteosit.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi dan dosis optimal ekstrak batang Sipatah-patah dalam memproliferasi dan mendiferensiasi sel punca mesenkimal (MSC) pada sumsum tulang tikus menjadi osteoblas dan osteosit. Informasi ilmiah tersebut diharapkan dapat bermanfaat dalam upaya pencegahan dan pengobatan berbagai kerusakan tulang.

METODE PENELITIAN

Ekstrak Batang Sipatah-patah.

Simplisia batang Sipatah-patah diperoleh dari Sabri *et al.*, (2009) dan diproses dengan menggunakan metode maserasi etanol di Laboratorium Farmasi FKH IPB untuk menghasilkan ekstrak.

Hewan Coba

Hewan yang dipakai dalam penelitian ini adalah empat ekor tikus jantan (*Sprague Dawley*) berumur dua bulan. Tikus diperoleh dari kandang pemeliharaan tikus di FKH IPB. Kandang tikus terbuat dari bak plastik dengan ukuran 35 cm x 22 cm x 9 cm dengan bagian atasnya ditutup kawat ayam dan bagian dasarnya dialasi dengan sekam. Hewan coba diberi pakan berupa pelet jenis 789-S dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

Persiapan Kultur Sel Punca Mesenkimal Sumsum Tulang

Pada penelitian ini terdapat lima kelompok perlakuan yang terdiri dari kontrol yang tanpa perlakuan ekstrak, kelompok ekstrak CQ dengan dosis masing-masing 0,1 mg/mL (CQ 0,1 mg/mL), 0,3 mg/mL (CQ 0,3 mg/mL) berdasarkan Potu *et al.*, (2009), 0,6 mg/mL (CQ

0,6 mg/mL) berdasarkan Djuwita *et al.*, (2012) dan 0,9 mg/mL (CQ 0,9 mg/mL). Cawan petri berdiameter 35 mm x 10 mm yang digunakan untuk kultur sel dilapisi terlebih dahulu dengan 1 mL gelatin 0,1% dan didiamkan selama satu jam pada suhu kamar. Setelah itu, gelatin dibuang, dicuci dengan *modified Phosphate Buffer Saline* (mPBS) dan didiamkan selama lima menit. Selanjutnya cawan petri diisi dengan medium *modified Dulbecco's modified eagle medium* (mDMEM) sebanyak 2 mL kemudian diinkubasi minimal selama satu jam dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C untuk mengkondisikan medium pada suhu 37°C. Setiap kelompok perlakuan memiliki ulangan sebanyak empat kali. Setiap ulangan digunakan dua cawan petri masing-masing untuk evaluasi proliferasi dan diferensiasi.

Isolasi dan Kultur Primer *Mesenchymal Stem Cell* Sumsum Tulang

Tikus dikorbankan nyawanya/dieutanasia, baru kemudian diambil tulang femur dan tulang tibia. Tulang dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi mPBS steril dan selanjutnya pekerjaan dilakukan dalam kondisi steril. Tulang dipotong bagian ujungnya dan dibilas dengan mPBS. Suspensi sel sumsum tulang yang didapatkan selanjutnya dipipet berulang, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Pencucian dilakukan dengan mPBS sebanyak empat kali dan dengan mDMEM sebanyak satu kali. Suspensi sel sumsum tulang dengan konsentrasi 1×10^6 dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi medium mDMEM sebanyak 2 mL. Setelah satu hari, medium diganti untuk membuang sel selain sel punca mesenkimal. Pada hari kedua medium diganti dengan medium yang baru dan medium pada kelompok kontrol tidak ditambahkan ekstrak CQ, sedangkan kelompok perlakuan lainnya ditambahkan ekstrak CQ berturut-turut sebanyak 0,1 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,6 mg/mL, dan 0,9 mg/mL. Selanjutnya sel tersebut diinkubasi di dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C. Medium mDMEM diganti setiap dua hari sekali dan dilakukan selama 10 hari.

Tingkat Proliferasi Berdasarkan *Population Doubling Time* (PDT)

Tingkat proliferasi MSC sumsum tulang dihitung jumlah selnya menggunakan hemositometer *Improved Neubauer*. Penghitungan dilakukan pada saat akan diinkubasi, hari pertama dan setelah kultur

sepuluh hari. Jumlah sel pada saat akan diinkubasi harus sama pada semua kelompok perlakuan. Jumlah sel pada saat akan diinkubasi menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Total sel (sel/mL)} = \text{rata-rata jumlah sel pada lima kotak} \times \text{faktor pengenceran} \times 10^4$$

Perhitungan PDT (Davis, 2011) adalah sebagai berikut:

$$\text{PDT} = \frac{1}{\frac{(\log \text{ jumlah sel akhir} - \log \text{ jumlah sel awal}) \times 3,32}{\text{waktu}}}$$

Identifikasi Diferensiasi Osteoblas dan Osteosit Melalui Morfologi Sel dengan Pewarnaan Alizarin Red

Identifikasi diferensiasi sel diamati pada hari kesepuluh kultur, sel difiksasi dengan glutaraldehid 2,5% selama 48 jam. Selanjutnya sel dicuci dengan PBS pH 4,2 dan diwarnai dengan larutan *Alizarin red*. Sel diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam lalu dicuci dengan PBS sebanyak dua kali. Sel selanjutnya dapat diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 10 untuk dihitung jumlah osteoblas dan osteosit. Penghitungan dilakukan pada 16 lapang pandang kemudian dipersentasekan dengan total sel. Penghitungan sel dilakukan sebanyak tiga kali ulangan dan dicari rataannya. Diameter sel dihitung dengan menggunakan mikrometer *eyepiece* dan diamati dengan mikroskop pada pembesaran 40 x 10. Penghitungan diameter dilakukan pada 20 osteoblas dan osteosit pada setiap perlakuan. Perhitungan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan dan kemudian dicari rataannya.

Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan pada penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL). Pada penelitian ini terdapat lima kelompok perlakuan. Semua kelompok perlakuan menggunakan medium mDMEM. Kelompok perlakuan kontrol tidak ditambahkan ekstrak batang Sipatah-patah, sedangkan pada kelompok perlakuan diberikan ekstrak batang Sipatah-patah sebanyak 0,1 mg/mL (CQ 0,1 mg/mL), 0,3 mg/mL (CQ 0,3 mg/mL), diikuti 0,6 mg/mL (CQ 0,6 mg/mL) dan 0,9 mg/mL (CQ 0,9 mg/mL).

Pada masing-masing perlakuan diulang sebanyak empat kali. Parameter yang diamati yaitu PDT, jumlah dan diameter osteoblas dan osteosit. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji sidik ragam dan jika antar perlakuan ada yang berbeda nyata dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tingkat Proliferasi Sel Berdasarkan PDT

Hasil PDT sel sumsum tulang yang diberi perlakuan ekstrak batang sipatah-patah disajikan pada Tabel 1. Populasi sel yang menjadi dua kali dari jumlah semula dapat dilihat kecepatan waktunya melalui penghitungan PDT. Nilai PDT yang lebih kecil menunjukkan terjadi peningkatan proliferasi sel punca mesenkimal sumsum tulang dan osteoblas yang lebih cepat. Pada Tabel 1 disajikan bahwa perlakuan ekstrak CQ dapat menurunkan nilai PDT secara sangat nyata ($P < 0,01$) dibandingkan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak batang Sipatah-patah (CQ) dapat meningkatkan proliferasi sel punca mesenkimal sumsum tulang. Perlakuan ekstrak CQ 0,1 mg/mL dapat menurunkan nilai PDT, tetapi tidak sebaik pada kelompok CQ 0,3 mg/mL, CQ 0,6 mg/mL, dan CQ 0,9 mg/mL. Tanaman yang sejenis tapi berbeda spesies yaitu *quadrangularis* Linn juga dapat meningkatkan proliferasi sel punca mesenkimal Potu *et al.*, (2009) dan *Sarcoma osteogenic-2* (SaOS)-2 pada manusia Muthusami *et al.*, (2011).

Tabel 1. *Proliferation Doubling Time* (PDT) sel mesenkimal sumsum tulang yang diberi ekstrak batang Sipatah-patah (*Cissus quadrangula* Salisb.).

| Perlakuan | PDT (hari) |
|--------------|--------------------------|
| Kontrol | 2,17 ± 0,20 ^a |
| CQ 0,1 mg/mL | 1,72 ± 0,33 ^b |
| CQ 0,3 mg/mL | 1,01 ± 0,02 ^c |
| CQ 0,6 mg/mL | 1,03 ± 0,12 ^c |
| CQ 0,9 mg/mL | 1,04 ± 0,19 ^c |

Ket: Huruf superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan sangat nyata ($P < 0,01$). Kontrol (mDMEM); ekstrak batang Sipatah-patah (*Cissus quadrangula* Salisb. atau CQ) CQ 0,1 (mDMEM + 0,1 mg/mL); CQ 0,3 (mDMEM + 0,3 mg/mL); CQ 0,6 (mDMEM + 0,6 mg/mL); CQ 0,9 (mDMEM + 0,9 mg/mL).

Morfologi Osteoblas dan Osteosit dengan Pewarnaan Alizarin Red

Morfologi sel osteoblas dan osteosit sebelum diwarnai dengan *Alizarin red* disajikan pada Gambar 1. Identifikasi morfologi sel osteoblas dan osteosit lebih mudah dilakukan dengan pewarnaan *Alizarin red*. Pewarnaan ini mendeteksi deposit kalsium yang dihasilkan oleh osteosit. Gambar 2 menunjukkan morfologi osteoblas dan osteosit yang telah diwarnai *Alizarin red*.

Preosteoblas biasanya berada di dekat osteoblas dan mengekspresikan *alkalin phosphatase*. Osteoblas yang aktif mensintesis matriks tulang memiliki inti yang besar, aparatus Golgi dan retikulum endoplasma yang banyak. Osteoblas mengeluarkan kolagen tipe I dan protein matriks lainnya. Osteoblas berubah menjadi kuboid yang besar setelah preosteoblas berhenti mengalami proliferasi. Osteoid osteosit merupakan proses transisi dari osteoblas menjadi osteosit. Sel ini bertanggung jawab dalam proses mineralisasi (Dallas *et al.*, 2013). Osteosit yang mengalami mineralisasi, selanjutnya berdiferensiasi menjadi osteosit, dan mengalami penurunan volume sel mencapai 70% (Palumbo 1986). Osteosit sudah mulai terlihat merah pada (Gambar 2D) dan semakin merah pada Gambar 2E dan 2F. Hal ini menunjukkan bahwa deposit kalsium pada osteosit seperti yang disajikan pada Gambar 2E dan 2F lebih banyak, dibandingkan osteosit pada Gambar 2D. Konsentrasi kalsium dapat memengaruhi morfologi sel punca menjadi osteoblas melalui interaksi matriks sel ke sel atau antar sel (Nakamura *et al.*, 2010). Kalsium bereaksi dan berikatan dengan *Alizarin red* sehingga sel berwarna merah.

Osteosit yang semakin tua, mengalami penurunan jumlah retikulum endoplasma dan aparatus Golgi sehingga ukurannya semakin mengecil. Osteosit memiliki dendritik yang disebut juga kanalikuli. Sejumlah dendritik ini dapat menghubungkan satu osteosit dengan osteosit lainnya dan osteoblas (Dallas *et al.*, 2013).

Rataan dan Diameter Sel

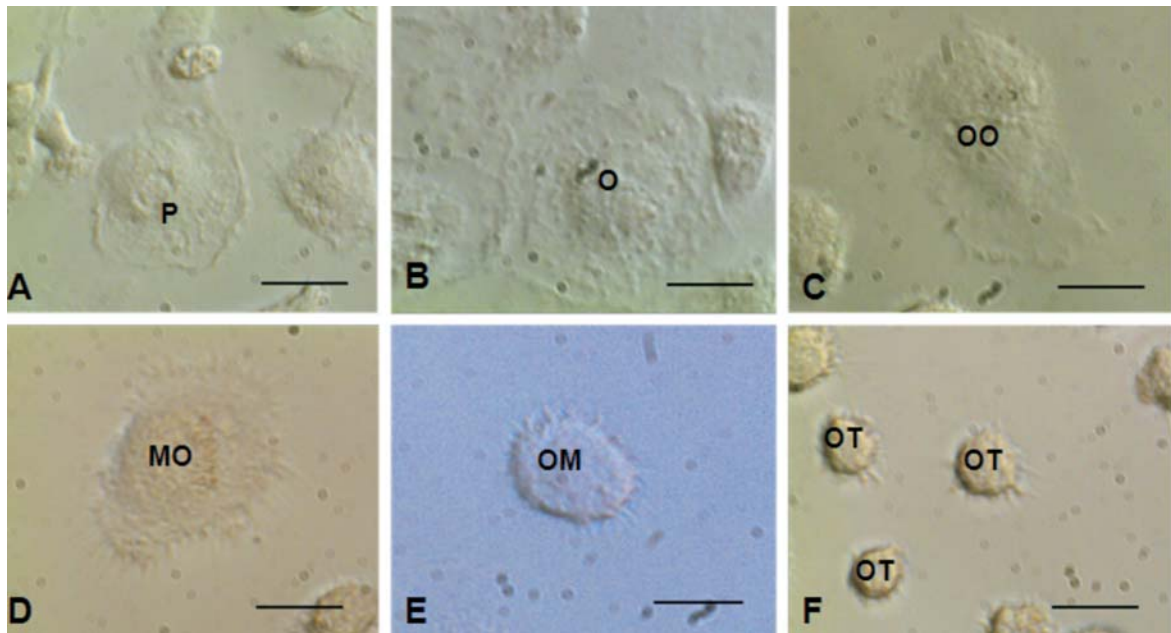
Diferensiasi menggambarkan struktur dan fungsi sel serta jaringan yang berkembang menjadi karakteristik sel yang lebih khusus. Rataan jumlah dan diameter sel dapat menggambarkan terjadinya diferensiasi sel. Tabel 2 menyajikan rata-rata jumlah dan diameter osteoblas dan osteosit yang diberi perlakuan ekstrak batang Sipatah-patah.

Rataan jumlah osteoblas pada kelompok perlakuan kontrol paling rendah secara sangat nyata ($P < 0,01$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan ekstrak batang Sipatah-patah. Perlakuan ekstrak batang Sipatah-patah dapat meningkatkan rata-rata jumlah osteoblas secara sangat nyata ($P < 0,01$), berturut-turut mulai dari dosis 0,1 mg/mL, 0,9 mg/mL, diikuti 0,3 mg/mL serta yang paling tinggi pada 0,6 mg/mL. Rataan jumlah osteosit paling rendah pada kelompok perlakuan kontrol dan tidak berbeda secara nyata ($P > 0,05$) dengan kelompok perlakuan 0,6 mg/mL. Rataan jumlah osteosit pada kelompok perlakuan 0,1 mg/mL lebih tinggi secara sangat nyata ($P < 0,01$) dibandingkan kelompok kontrol, namun tidak berbeda nyata dengan kelompok 0,9 mg/mL. Rataan jumlah osteosit pada kelompok 0,3 mg/mL paling tinggi secara sangat nyata ($P < 0,01$) dibandingkan kelompok perlakuan lainnya.

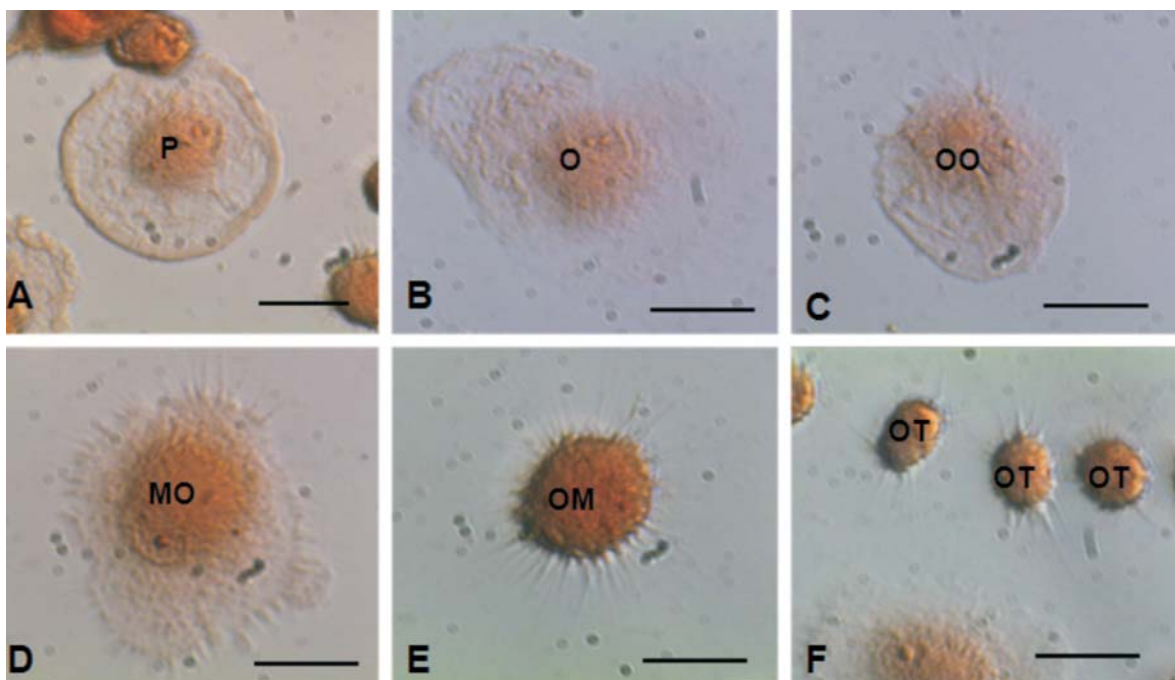
Tabel 2. Rataan jumlah dan diameter osteoblas dan osteosit dalam medium DMEM yang diberi ekstrak batang Sipatah-patah (*Cissus quadrangula* Salisb.).

| Perlakuan | Rataan jumlah Osteoblas | Rataan diameter Osteoblas | Rataan jumlah Osteosit | Rataan diameter Osteosit |
|--------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Kontrol | 12,08 ± 1,83 ^a | 29 ± 3,29 ^a | 84,31 ± 36,63 ^a | 12,62 ± 1,65 ^a |
| CQ 0,1 mg/mL | 59,67 ± 21,74 ^b | 39,62 ± 4,90 ^a | 189,31 ± 32,44 ^b | 13,88 ± 3,20 ^a |
| CQ 0,3 mg/mL | 122,50 ± 16,68 ^d | 38,38 ± 0,10 ^a | 336,28 ± 27,62 ^c | 14,50 ± 1,23 ^a |
| CQ 0,6 mg/mL | 240,92 ± 8,31 ^e | 39 ± 4,18 ^a | 83,76 ± 26,85 ^a | 15,12 ± 2,84 ^a |
| CQ 0,9 mg/mL | 90,36 ± 18,248 ^c | 34,25 ± 13,56 ^a | 179,62 ± 36,38 ^b | 14,12 ± 1,55 ^a |

Keterangan : Huruf superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$). DMEM: *Dulbecco's modified eagle's medium*, CQ: *Cissus quadrangula*



Gambar 1. Morfologi osteoblas dan osteosit dalam medium kultur. (A) Preosteoblas, (B) Osteoblas, (C) Osteoid osteosit, (D) Osteosit yang mengalami mineralisasi, (E) Osteosit muda, (F) osteosit tua. (P: Preosteoblas, O: Osteoblas, OO: Osteoid osteosit, MO: Mineralisasi pada Osteosit, OM: Osteosit muda, OT: Osteosit tua). Bar: 20 μ m, Mikroskop 400 x.



Gambar 2. Morfologi osteoblas dan osteosit dalam medium kultur. (A) Preosteoblas, (B) Osteoblas, (C) Osteoid osteosit, (D) Osteosit yang mengalami mineralisasi, (E) Osteosit muda, (F) osteosit tua. (P: Preosteoblas, O: Osteoblas, OO: Osteoid osteosit, MO: Mineralisasi pada Osteosit, OM: Osteosit muda, OT: Osteosit tua). Bar: 20 μ m, mikroskop 400 x

Rataan diameter osteoblas tidak berbeda secara nyata ($P>0,05$) pada semua kelompok perlakuan. Demikian juga rata-rata diameter osteosit tidak berbeda secara nyata ($P>0,05$) pada semua perlakuan. Osteoblas memiliki diameter antara 20-30 μm (Kierszenbaum 2002), sedangkan osteosit memiliki ukuran sekitar 9-20 μm (Kogianni dan Noble, 2007). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak batang Sipatah-patah tidak berpengaruh secara nyata terhadap diameter osteoblas maupun diameter osteosit.

Simplisia Sipatah-patah sebanyak 1 gram mengandung kalsium sebesar 4,33%, fosfor sebesar 0,37%, alkaloid, flavonoid, tannin (polifenolat), dan triterpenoid. Selain itu, ekstrak Sipatah-patah juga mengandung 33 senyawa fitokimia yang dapat dikelompokkan menjadi lima yaitu steroid, triterpenoid, asam karboksilat, hidrokarbon, dan kelompok ester. Senyawa fitokimia yang paling dominan adalah golongan steroid yaitu sebesar 74,52%, sedangkan untuk asam karboksilat, triterpenoid, hidrokarbon, dan ester berturut-turut sebesar 9,81%, 8,49%, 1,82%, dan 3,98%. Tujuh senyawa fitoestrogen terdapat di dalam kandungan steroid tersebut antara lain *A-noncholestan-3-one-5-ethynyl* (22,67%), *Stigmast-5-en-3-ol* (15,52%), *Stigmast-4-en-3-one* (8,53%), *Lup-20(29)-en-3-ol (3.beta)* (7,49%), *Ergost-22-en-3-ol* (5,74%), *Stigmast-5,23-dien-3.beta-ol* (2,55%) dan *Methyl (25RS)-3 α -hydroxyl-5 cholesten* (2,36%) (Sabri *et al.*, 2009).

Diferensiasi osteoblas menjadi osteosit merupakan proses kerja sama antara proliferasi osteoblas yang terhenti, terjadi proses perkembangan dan adanya penyaluran kalsium yang aktif. Penyaluran kalsium penting dalam proses *mechanosensing* dan mekanisme transduksi sinyal (Mikuni-Takagaki *et al.*, 2002). Salah satu kandungan ekstrak CQ yang penting dalam proses diferensiasi adalah kalsium dan fosfor. Menurut Muller *et al.*, (2008), suplemen kalsium fosfat dapat memengaruhi diferensiasi sel punca mesenkimal sumsum tulang pada manusia menjadi osteoblas. Peranan kalsium lebih utama daripada fosfor dalam proses osteogenik. Hal ini berdasarkan laporan Villa dan Sorribas, (2011) bahwa penambahan konsentrasi fosfat yang tinggi dan kalsium yang rendah tidak meningkatkan ekspresi gen osteogenik. Sebaliknya, penambahan konsentrasi kalsium yang tinggi dan fosfat yang rendah dapat menginduksi pembentukan kristal kalsium fosfat dan meningkatkan ekspresi gen osteogenik. Fosfor

juga dapat memengaruhi mineralisasi matriks tulang, osifikasi, pematangan dan diferensiasi osteoblas (Zhang *et al.*, 2011). Kandungan lain yang diketahui dapat memicu diferensiasi adalah flavonoid, seperti yang dilaporkan oleh Zhang *et al.*, (2008) yang memicu diferensiasi osteoblas menjadi osteosit.

Genistein yang merupakan komponen dalam fitoestrogen dapat menstimulasi diferensiasi sel punca sumsum tulang menjadi osteoblas. Diferensiasi tersebut terjadi karena adanya peningkatan *cbfa-1* (Ducy, 2000) dan *Transforming Growth Factor beta-1* (TGF β -1) (Heim *et al.*, 2004). Senyawa *Cbfa-1* adalah faktor transkripsi pada sel progenitor menjadi osteoblas dan *Cbfa-1* berperan dalam mengontrol proses perkembangan, diferensiasi dan pematangan fungsi osteoblas (Ducy, 2000). Senyawa TGF β mengatur gen transkripsi pada sel melalui sinyal reseptor (Roberts *et al.*, 1990). *Genistein* menghambat proliferasi dengan cara menginduksi TGF β 1 (Kim *et al.*, 1998) dan meningkatkan ekspresi TGF β 1 pada proses osteogenesis (Heim *et al.*, 2004). *Genistein* dan *daidzein* yang juga merupakan komponen dalam fitoestrogen, dapat meningkatkan proliferasi osteoblas (Ogita *et al.*, 2008) melalui sintesis protein (Sugimoto dan Yamaguchi, 2000) dengan mengatur sintesis *cbfa1* dan *Bone Morphogenetic Protein-2* (BMP-2) (Federici *et al.*, 2004). Senyawa *BMP-2* dapat mengatur diferensiasi sel (Ogita *et al.*, 2008).

Fitoestrogen dapat menginduksi osteoblas dan osteosit melalui reseptor estrogen. Menurut penelitian Ohashi *et al.*, (1991), reseptor estrogen terdapat pada sel osteogenik dan bertindak langsung pada proses osteogenesis. Dosis estrogen yang tinggi akan semakin meningkatkan fisiologi osteogenesis melalui reseptor estrogen (Samuels *et al.*, 2000). Aktivitas reseptor estrogen mengalami peningkatan pada proses mineralisasi tulang (Filipovic dan Jurjevic, 2013). Fitoestrogen dapat terikat pada reseptor estrogen dan menstimulasi proliferasi (Yamaguchi, 2002).

Genistein dapat meningkatkan produksi *Nitric Oxide* (NO), aktivitas *NO synthase* (NOS) dan produksi *cyclic Guanosine Monophosphate* (cGMP) dalam medium kultur melalui reseptor estrogen. Senyawa NO dapat menstimulasi dan mengatur ekspresi gen *Runt-related transcription factor-2* (Runx2)/*cbfa1* (Pan *et al.*, 2005). Senyawa cGMP akan mengaktifasi enzim tirosin kinase (Chen *et al.*, 1999) yang merupakan enzim penting dalam pertumbuhan

dan diferensiasi sel (Massague, 1998). Perkembangan dan pematangan osteoblas dipengaruhi oleh sejumlah parakrin, autokrin dan endokrin yakni *bone morphogenetic proteins* (BMPs), faktor pertumbuhan seperti *Fibroblast Growth Factor* (FGF) dan *Insulin Growth Factor* (IGF), dan hormon seperti *Parathyroid Hormone* (PTH) (Qin *et al.*, 2003). Aktivasi PTH dan BMPs melalui jalur *Wnt Signaling* (Westendorf *et al.*, 2004). Jalur *Wnt signaling* adalah jalur utama dalam proses diferensiasi melalui pengikatan pada reseptor. Jalur *Wnt signaling* dapat dipacu oleh Runx dan osterix (Bodine *et al.*, 2006).

Ekstrak batang Sipatah-patah dapat mencegah dan memperbaiki jaringan tulang baik pada tikus yang diovariectomi (Sabri *et al.*, 2009) maupun pada masa pertumbuhan (Sabri *et al.*, 2011). TANAMAN *C. quadrangularis* Linn yang berasal dari India juga banyak dilaporkan dapat memperbaiki jaringan tulang dan antiosteoporesis. Rao *et al.*, (2007) melaporkan bahwa *C. quadrangularis* Linn dapat meningkatkan ketebalan kortikal dan trabekula pada tulang femur fetus tikus. Fanti *et al.*, (1998) melaporkan bahwa terjadi peningkatan *bone mineral density* (BMD) pada tibia tikus ovariektomi yang diberi fitoestrogen. Kandungan beberapa komponen bahan aktif dalam ekstrak batang Sipatah-patah dapat meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel punca mesenkimal menjadi osteoblas dan osteosit pada penelitian ini.

SIMPULAN

Ekstrak batang Sipatah-patah dapat meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel punca mesenkimal sumsum tulang tikus menjadi osteoblas dan osteosit. Dosis optimal ekstrak batang Sipatah-patah tersebut adalah 0,3 mg/mL.

SARAN

Penelitian selanjutnya perlu dilakukan untuk melengkapi informasi ilmiah tentang toksisitas tanaman ekstrak batang Sipatah-patah (*quadrangula* Salisb.) secara *in vivo*, serta mekanisme seluler dalam meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel punca mesenkimal sumsum tulang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih ucapkan kepada mereka yang telah membantu penelitian ini dengan sepenuh hati. Terima kasih juga disampaikan kepada Laboratorium yang telah membantu dalam menyediakan berbagai bahan dan alat dalam penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Bodine PV, Komm BS. 2006. Wnt Signaling and Osteoblastogenesis. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorder* 7: 33-9.
- Baron R. 2008. *Anatomy and Ultrastructure of Bone-Histogenesis, Growth and Remodeling*. Boston: Longwood Avenue. Pp: 4.
- Bongso A, Richards M. 2004. History and Perspective of Stem Cell Research. *Best Practical and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 18(6): 827-42.
- Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. 2013. The Osteocyte: An Endocrine Cell and More. *Endocrine Reviews* 34(5): 658-690.
- Davis JM. 2011. Basic Technique and Media, the Maintenance of Cell Lines and Safety. John MD Ed. In *Animal Cell Culture Essential Methods*. UK. John Wiley and Sons Ltd.
- Deka DK, Lahon LC, Saikia J, Mukit A. 1994. Effect of *Cissus quadrangularis* in Accelerating Healing Process of Experimentally Fractured Radius-Ulna of Dog: A Preliminary Study. *Indian Journal of Pharmacology* 26: 44-45.
- Djuwita I, Irma AP, Adi W, Mustafa S. 2012. Proliferasi dan Diferensiasi Sel Tulang Tikus dalam Medium Kultur In Vitro yang Mengandung Ekstrak Batang *Cissus quadrangula* Salisb. (Sipatah-patah). *Jurnal Kedokteran Hewan Unsyiah*. 6(2): 75-80.
- Ducy P. 2000. CBFA1: A Molecular Switch on Osteoblast Biology. *Developmental Dynamics* 219(4): 461-471.
- Fanti P, Monier-Faugere M, Geng Z. 1998. The Phytoestrogen Genistein Reduces Bone Loss in Short-Term Ovariectomised Rats. *Osteoporosis International* 8(3): 274-281.
- Federici E, Garrett R, Quintin A. 2004. Soybean Extract and Its Isoflavones, Genistein and Daidzein, Stimulate BMP-2 Expression and Bone Formation by Inhibiting the Mevalonate Pathway in Osteoblast Cells. *Bone* 34: 54-54.

- Filipovic B, Jurjevic. 2013. *The Phytoestrogens, Calcitonin and Thyroid Hormones: Effects of Bone Tissue*. Serbia: University of Belgrade. Pp: 736.
- Heim M, Frank O, Kampmann G, Sochocky N, Pennimpede T, Fuchs P, Hunziker W, Weber P, Martin I, Bendik I. 2004. The Phytoestrogen Genistein Enhances Osteogenesis and Repress Adipogenic Differentiation of Human Primary Bone Marrow Stromal Cells. *Endocrinology* 145(2): 848-859.
- Halim D, Murti H, Sandra F, Boediono A, Djuwantono T, Setiawan B. 2010. *Stem Cell: Dasar Teori dan Aplikasi Klinis*. Jakarta. Erlangga. Hal: 11-12.
- Kim H, Peterson TG, Barnes S. 1998. Mechanism of Action of the Soy Isoflavone Genistein: Emerging Role for Its Effects Via Transforming Growth Factor α Signaling Pathways. *The American Journal of Clinical Nutrition* 68(suppl): 1418-25.
- Kierszenbaum AL. 2002. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. St Louis. Mosby Inc. An Affiliate of Elsevier.
- Kogianni G, Noble BS. 2007. The Biology of Osteocytes. *Current Medicine Group LLC* 5: 81-86.
- Lanza R, Gearhart J, Thomas ED, Melton D, Pedersen R, Thomson J, Hogan B, West M. 2006. *Essential of Stem Cell Biology*. Burlington, USA: Elsevier-Academic Press. Pp: 205.
- Mescher AL. 2010. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. China. McGraw-Hill Companies. Pp: 138-152.
- Miao D, Murant S, Scutt N, Genever P, Scutt A. 2004. Megakaryocyte-bone Marrow Stromal Cell Agregates Demonstrate Increased Colony Formation and Alkaline Phosphatase Expression In Vitro. *Tissue Engineering* 10: 147-154.
- Mikuni-Takagaki Y, Naruse K, Azuma Y, Miyauchi A. 2002. The Role of Calcium Channels in Osteocyte Function. *Journal Musculoskel Neuron Interact* 2(3): 252-255.
- Muller P, Bulnheim U, Diener A, Luthen F, Teller M, Klinkenberg EO, Neumann HG, Nebe B, Lieborld A, Steinhoff G, Rychly J. 2008. Calcium Phosphate Surfaces Promote Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12(1): 281-91.
- Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A dan Barry F. 2002. Reduced Chondrogenic and Adipogenic Activity of Mesenchymal Stem Cells from Patients with Advanced Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatism* 46: 704-713.
- Muthusami S, Senthilkumar K, Vignesh C, Ilangovan R, Stanley J, Selvamurugan N, Srinivasan N. 2011. Effects of *Cissus quadrangularis* on the Proliferation, Differentiation and Matrix Mineralization of Human Osteoblast Like SaOS-2 Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 112(4): 1035-1045.
- Nakamura S, Matsumoto T, Sasaki J, Egusa H, Lee KY, Nakano T, Sohmura T, Nakahira A. 2010. Effect of Calcium Ion Concentrations on Osteogenic Differentiation and Hematopoietic Stem Cell Niche-Related Protein Expression in Osteoblast. *Tissue Engineering Part A* 16(8): 2467-73.
- Ohashi T, Kusuhara S, Ishida K. 1991. Estrogen Target Cells during the Early Stage of Medullary Bone Osteogenesis: Immunohistochemical Detection of Estrogen Receptors in Osteogenic Cells of Estrogen-Treated Male Japanese Quail. *Calcified Tissue International* 49: 124-127.
- Ogita M, Rached MT, Dworakowski E, Bilezikian P dan Kousteni S. 2008. Differentiation and Proliferation of Periosteal Osteoblast Progenitors Are Differentially Regulated by Estrogens and Intermittent Parathyroid Hormone Administration. *Endocrinology* 149 (11): 5713-5723.
- Palumbo C. 1986. A Three-Dimensional Ultrastructural Study of Osteoid-Osteocytes in Tibia of Chick Embryos. *Cell Tissue Research* 246(1): 125-131.
- Pan W, Quarles D, Song L, Yu Y, Jiao C, Tang H, Jiang C, Deng H, Li Y, Zhou H, Xiao Z. 2005. Genistein Stimulates the Osteoblastic Differentiation via NO/cGMP in Bone Marrow Culture. *Journal of Cellular Biochemistry* 94: 307-316.
- Potu BK, Bhat KMR, Rao MS, Nampurath GK, Chamallamudi MR, Nayak SR, Muttigi MS. 2009. Petroleum Ether Extract of *Cissus Quadrangularis* (Linn.) Enhances Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Facilitates Osteoblastogenesis. *Journal of Clinical Science* 64(10): 993-8.

- Potu BK, Rao M, Nampurath GK, Chamallamudi MR, Nayak SR, Thomas H. 2010. Anti-osteoporotic Activity of the Petroleum Ether Extract of *Cissus quadrangularis* Linn. in Ovariectomized Wistar Rats. *Chang Gung Medicine Journal* 33: 252-7.
- Rao MS, Kumar B, Swamy V.B N, Kutty NG. 2007. *Cissus quadrangularis* Plant Extract Enhances the Development of Cortical Bone and Trabecular in the Fetal Femur. *Pharmacologyonline* 3: 190-202.
- Roberts AB, Flanders KC, Heine UI, Jakowle S, Kondaiah P, Kim SJ, Sporn MB. 1990. Transforming Growth Factor- β : Multifunctional Regulator of Differentiation and Development. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London* 327: 145-154.
- Sabri M, Nurhidayat, Sigit K, Priosoeryanto BP, Manalu W. 2009. Analysis of phytochemical and Mineral Content of Sipatah-patah Plant (*Cissus quadrangularis*) from Aceh as Osteoporosis Premedication. *Jurnal Rona Lingkungan* 1(2): 109-117.
- Sabri M, Nurhidayat, Sigit K, Priosoeryanto BP, Manalu W. 2011. Kualitas Tulang Tikus Betina Normal yang Diberi Ekstrak Sipatah-patah pada Masa Pertumbuhan. *Jurnal Veteriner* 12(2): 113-119.
- Samuels A, Perry MJ, Goodship AE, Fraser WD, Tobias. 2000. Is High-Dose Estrogen-Induced Osteogenesis in the Mouse Mediated by an Estrogen Receptor. *Bone* 27(1): 41-46.
- Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaca LLQ, Cerqueira A, Carvalho MDF, Jazedje T, Okamoto OK, Moutri AR, Zatz M. 2008. Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord: Do not Discard the Cord. *Neuromuscular* 18: 17-18.
- Senthamari R, Akilandeswari S, Valarmathi. 2013. Anti Arthritic Activity of *Cissus quadrangularis* I and *Justicia tranquebariensis* in the Treatment of Rheumatism. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences* 2(3): 1435-40.
- Sugimoto E, Yamaguchi M. 2000. Anabolic Effect of Genistein in Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. *International journal of Molecular Medicine* 5: 515-520.
- Vaananen HK. 2005. Mesenchymal Stem Cells. *Annals of Medicine* 37: 469-79.
- Villa R, Sorribas V. 2011. On the Osteogenic Expression Induced by Calcium/Phosphate Deposition. *Kidney International* 79: 921.
- Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. 2004. Wnt Signaling in Osteoblasts and Bone Diseases. *Gene* 341: 19-39.
- Zhang DW, Cheng Y, Wang NL, Zhang JC, Yang MS, Yao XS. 2008. Effects of Total Flavonoids and Flavonol Glycosides from *Epimedium koreanum* Nakai on the Proliferation and Differentiation of Primary Osteoblasts. *Phytomedicine* 15(2): 55-61.
- Zhang R, Lu Y, Ye L, Yuan B, Yu S, Qin C, Xie Y, Gao T, Drezner MK, Bonewald LF, Feng JQ. 2011. Unique Roles of Phosphorus in Endochondral Bone Formation and Osteocyte Maturation. *Journal of Bone and Mineral Research* 26(5): 1047-1056.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. 2001. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering* 7: 211-28.