

Ekspresi *Tartrate-Resistant Acid Phosphatase-5b* pada Epifisis Tulang Femur Tikus Ovariectomi yang Mengonsumsi *Calcitriol* dan *Raloxifene*

**(*TARTRATE-RESISTANT ACID PHOSPHATASE-5b*
EXPRESSION OF EPIPHYSYS DISTALIS FEMUR OVARIECTOMIZED
RATS CONSUMING CALCITRIOL AND RALOXIFENE SUPPLEMENT)**

Hartiningsih, Devita Anggraeni

Bagian Ilmu Bedah dan Radiologi, Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna No 2, Karangmalang, Jogjakarta 55281.
Telp. : 0274-9062205, Fax : 0274-563083; E-mail: hartiningsih56@yahoo.com

Abstrak

Tartrate-resistant acid phosphatase-5b (TRAP5b) disekresikan oleh osteoklas selama proses diferensiasi dan resorpsi tulang. Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengkaji ekspresi TRAP5b pada tulang femur tikus ovariectomi yang mengonsumsi kombinasi *raloxifene* dan *calcitriol*. Sebanyak 25 tikus Wistar betina umur delapan minggu, dibagi lima kelompok: kontrol normal (NK); kontrol ovariectomi (OVK); ovariectomi dan *calcitriol* (OVD); ovariectomi dan *raloxifene* (OVR); dan ovariectomi dengan pemberian kombinasi *calcitriol* dengan *raloxifene* (OVDR), masing-masing lima tikus. Pada akhir perlakuan, dilakukan pengambilan darah melalui pleksus retroorbitalis untuk pemeriksaan estradiol, selanjutnya semua tikus dikorbankan nyawanya dengan cara dieutanasi. Uterus diambil dan ditimbang. Femur kiri diambil untuk pemeriksaan histopatologi dengan parameter trabekula dan jaringan adiposit, dan pemeriksaan immunohistokimia TRAP5b menggunakan antibodi monoklonal anti-TRAP5b dan dideteksi dengan streptavidin-biotin. Hasil analisis menunjukkan tikus OVK mempunyai estradiol lebih rendah dibanding tikus NK, sedangkan tikus OVDR mempunyai estradiol lebih rendah dibanding tikus NK dan OVK. Pada pemeriksaan histopatologi epifisis tulang femur distalis tikus NK terlihat mempunyai struktur normal, sedangkan pada tikus OVK menunjukkan terjadi osteoporosis yang ditandai dengan abnormalitas seperti penurunan spikulum trabekula dan dominasi jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang. Histopatologis epifisis tulang femur distalis tikus OVDR terlihat peningkatan spikulum trabekula dan dominasi jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang. Pemeriksaan immunohistokimia epifisis tulang femur distalis tikus OVDR menunjukkan peningkatan ekspresi TRAP5b pada tulang trabekula baik yang terdapat di dalam rongga sumsum tulang maupun pada permukaan tulang trabekula. Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa suplementasi kombinasi *calcitriol* dengan *raloxifene* selama delapan minggu pada tikus ovariectomi meningkatkan ekspresi TRAP5b sebagai penanda meningkatnya aktivitas osteoklas meresorpsi tulang.

Kata-kata kunci: *calcitriol*, ovariectomi, *raloxifene*

Abstract

Tartrate resistant alkaline phosphatase 5b (TRACP5b) is secreted by osteoclasts during bone differentiation and resorption. The objective of the research was to study TRAP5b expression in ovariectomized Wistar rat consuming the combinations of *calcitriol* and *raloxifene* supplementation for eight weeks. Twenty five female *Wistar* rats aged eight weeks were randomly divided into five groups: normal control (NK), ovariectomy control (OVK), ovariectomy+*calcitriol* supplementation (OVD), ovariectomy+*raloxifene* supplementation (OVR), and ovariectomy+*calcitriol*+*raloxifene* supplementation (OVDR). At the end of the treatment, blood samples were taken from plexus orbitalis medialis for estrogen analysis. All rats were euthanized, the uteri were taken and weighed. Left femur was taken for histopathological examination and immunohistochemistry TRAP5b using monoclonal antibody anti TRAP5b which was detected with streptavidin-biotin. The results showed that estrogen levels of the rats in OVK group were significantly decreased compared to the rats in NK group, meanwhile estrogen levels in the

OVDR rat group were significantly decreased compared to the NK and OVK rat group. Histopathological observation of distal femur epiphysis in group NK showed normal structure, meanwhile, distal femur epiphysis in OVK group was found osteoporosis, with some abnormalities, such as: increased of bone marrow space, domination of adipocytes in the bone marrow, and decrease of trabecular bone speculum in epiphysis. Histopathological findings of distal femur epiphysis in OVDR group were increased of trabecular bone speculum in epiphysis and the domination of adipocytes in the bone marrow of epiphysis. Immunohistochemistry of distal femur epiphysis in OVDR group revealed increasing *tartrate resistant alkaline phosphatase 5b* (TRAP5b) expression in trabecular bone, which was located in bone marrow space and trabecular speculum surface as well. It can be concluded that the combination of calcitriol and raloxifene supplementation in ovariectomized rats aged 8 weeks increases TRAP5b expression as a marker for the increase of osteoclast activity in bone resorption, which may lead to the formation of the bone.

Key words : calcitriol, ovariectomy, raloxifene

PENDAHULUAN

Turunnya hormon estrogen pada masa menopause sering dikaitkan dengan meningkatnya resorpsi tulang, menurunnya densitas tulang (Stone *et al.*, 1998; Slemenda *et al.*, 1996) dan berisiko tinggi terjadi patah tulang (Doherty *et al.*, 2001). Suplementasi estrogen pada perempuan pascamenopause maupun tikus ovariektomi meningkatkan konsentrasi estrogen dalam darah (Aswar *et al.*, 2012; van Abel, 2002), menekan *remodeling* tulang (Manolagas, 2002), menekan resorpsi tulang (Hughes *et al.*, 1996), dan meningkatkan pembentukan tulang (Qu *et al.*, 1998), dan secara tidak langsung mengaktivasi ginjal untuk mengkonversi vitamin D tidak aktif menjadi vitamin D aktif (Notelovitz, 1997). Namun, suplemen estrogen mempunyai risiko tinggi terjadi kanker endometrium (Rossouw *et al.*, 2002; Rodan dan Martin, 2000; Beresford *et al.*, 1997; Berkvist dan Persson, 1996).

Suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ meningkatkan 1,25-dihidroksivitamin D₃ plasma (Vieth *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 1998), memicu pembentukan tulang (Anderson *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006) dan menurunkan konsentrasi estradiol (Hartiningsih *et al.*, 2012; Rasheed *et al.*, 2009). Suplemen *calcitriol* sebanyak 8 dan 20 ng/tikus selama delapan minggu pada tikus ovariektomi menyebabkan osteoporosis tulang femur distalis (Hartiningsih dan Anggraeni, 2013; Hartiningsih *et al.*, 2012). Kombinasi suplemen *calcitriol* dengan *ethynil ethyl estradiol* selama delapan minggu pada tikus ovariektomi meningkatkan konsentrasi estradiol, menurunkan risiko osteoporosis, namun meningkatkan risiko kanker endometrium (Hartiningsih dan Anggraeni, 2013).

Raloxifene, suatu *selective estrogen receptor modulator* (SERM) mempunyai efek

agonis estrogenik, mempromotori pembentukan tulang dan menekan resorpsi tulang (Viereck *et al.*, 2003). Keberhasilan penanganan osteoporosis ditandai turunnya jumlah dan aktivitas osteoklas meresorpsi tulang (McClung, 1996; Vedi dan Compston, 1996). Selama proses diferensiasi dan resorpsi tulang, osteoklas secara progresif mengekspresikan petanda *tartrate-resistant acid phosphatase-5b* (TRAP5b) (Halleen dan Ranta, 2001; Janckila *et al.*, 2001; Vaananen *et al.*, 2000; Alatalo *et al.*, 2000; Halleen *et al.*, 2000). *Tartrate-resistant acid phosphatase 5b* merupakan enzim protease yang diekspresikan dalam konsentrasi tinggi oleh lisosom prekursor osteoklas dan osteoklas dewasa (Takahashi *et al.*, 1994). Apakah kombinasi suplemen *calcitriol* dengan *raloxifene* dapat menurunkan ekspresi TRAP5b sebagai petanda aktivitas osteoklas meresorpsi tulang pada individu ovariektomi belum banyak dilaporkan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengukur aktivitas osteoklas dengan cara melakukan pemeriksaan ekspresi TRAP5b menggunakan teknik immunohisto-kimia pada jaringan tulang femur. Penggunaan suplementasi kombinasi *calcitriol* dengan *raloxifene* pada individu ovariektomi diharapkan dapat menurunkan resorpsi tulang yang ditandai turunnya ekspresi TRAP5b pada tulang femur.

METODE PENELITIAN

Dalam penelitian ini digunakan 25 tikus Wistar betina umur delapan minggu, diberi pakan standar yang mempunyai kandungan 20% protein, 0,6 kalsium/Ca, 0,4% posfor/P dengan komposisi pakan (g/100 g pakan) terdiri dari 78% jagung, 20% ikan teri tawar, 0,3% kalsium karbonat/CaCO₃, 0,7% molase, dan 1,0% vitamin mineral.

Tikus ditempatkan dalam kandang individu berukuran panjang 24,0 cm, lebar 13,5 cm, tinggi 16,5 cm, beralas anyaman kawat ayam yang ditempatkan 4 cm dari dasar kandang, dengan suhu berkisar 22-25°C. Tikus diberi pakan standar dan air minum aquabidestilata *ad libitum*. Tikus dibagi lima kelompok perlakuan (kontrol normal (NK), kontrol ovariektomi (OVK), ovariektomi dan suplemen *calcitriol* 20 ng/hari/tikus secara oral (OVD), ovariektomi dan suplemen *raloxifene* 3 mg/hari/kg tikus secara oral (OVR), dan ovariektomi dan kombinasi *calcitriol* 20 ng/hari/tikus dengan suplemen *raloxifene* 3 mg/hari/kg tikus secara oral (OVDR), masing-masing lima tikus. Seminggu pascaadaptasi pakan, dilakukan operasi ovariektomi *bilateral* (pengambilan ovarium kiri dan kanan) melalui sayatan *caudal midline*, sayatan pada kulit dibuat sepanjang 2 cm mulai dari umbilikus ke arah kaudal. Sebagai anestetiknya digunakan campuran ketamin 10% (dosis 50 mg/kg, Pantex Holland) dan xylazine 2% (dosis 5 mg/kg, Pantex Holland) intramuskuler. Hal yang sama dilakukan pada tikus kontrol meskipun tidak dilakukan pengambilan ovarium (operasi semu). Satu minggu pascaoperasi, semua tikus diberi perlakuan selama delapan minggu.

Pada akhir perlakuan, tikus dianestesi dengan campuran xylazine 2% dan ketamin 10%, darah diambil melalui pleksus retro-orbitalis untuk pemeriksaan estradiol, selanjutnya tikus dikorbankan nyawanya dengan dieutanasi menggunakan campuran xylazine 2% dosis 5 mg/kg dan ketamin 10% dosis 50 mg/kg intramuskuler. Setelah dinekropsi, uterus diambil dan ditimbang. Tulang femur kiri diambil dan difiksasi dalam formalin 10% untuk pemeriksaan histopatologi dan pemeriksaan immunohistokimia *tartrate-resistant acid phosphatase-5b* (TRAP5b), menggunakan monoklonal antibodi anti-TRAP5b (Bio Legend, San Diego, Amerika Serikat), dan dideteksi menggunakan streptavidin-biotin (Histostain-SP Kits, Invitrogen Ltd, Inggris). Estradiol diperiksa dengan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (kit komersial produksi Omega Laboratorium).

Data estradiol serum yang diperoleh dianalisis dengan uji sidik ragam pola searah yang dilanjutkan dengan uji Duncan's. Histopatologi tulang dan pemeriksaan immunohistokimia TRAP5b yang diperoleh dianalisis secara diskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tikus OVK dan OVD mempunyai konsentrasi estradiol cenderung lebih rendah dibanding tikus normal NK, dan mempunyai persentase bobot uterus lebih ringan secara signifikan ($P < 0,05$) dibanding tikus NK (Tabel 1). Li *et al.* (2013) dan Pan *et al.* (2010) melaporkan bahwa ovariektomi pada tikus menurunkan konsentrasi estradiol serum. Hartiningsih *et al.* (2006) juga melaporkan bahwa suplementasi *calcitriol* selama tiga bulan setelah ovariohisterektomi menurunkan estrogen. Dilaporkan Li *et al.* (2013) dan Pan *et al.* (2010) bahwa ovariektomi pada tikus selain menurunkan konsentrasi estradiol serum dan bobot uterus, juga menyebabkan atrofi uterus. Menurut Lepescheux *et al.* (2001) bahwa turunnya bobot uterus terkait dengan atrofi uterus, dan meningkatnya bobot uterus terkait dengan bertambah besar atau tingginya ukuran struktur uterus. Kombinasi suplementasi *calcitriol* dan *raloxifene* juga menyebabkan konsentrasi estradiol tikus OVDR lebih rendah secara signifikan ($P < 0,05$) dibanding tikus OVD, OVK, dan NK, mempunyai persentase bobot uterus tidak berbeda dengan tikus OVD dan OVK, namun lebih ringan secara signifikan ($P < 0,05$) dibanding tikus NK (Tabel 1).

Konsentrasi estradiol tikus OVR lebih tinggi secara signifikan ($P < 0,05$) dibanding tikus OVDR, OVK, dan tikus OVD, namun mempunyai persentase bobot uterus tidak berbeda dengan tikus OVD, OVK, dan OVDR (Tabel 1). Konsentrasi estradiol tikus OVR tidak berbeda dengan tikus NK, namun mempunyai persentase bobot uterus lebih ringan secara signifikan ($P < 0,05$) dibanding tikus NK (Tabel 1). Li *et al.* (2013), dan Pan *et al.* (2010) melaporkan bahwa suplementasi *ethynil estradiol* pada tikus ovariektomi meningkatkan konsentrasi estradiol serum, meningkatkan bobot uterus, dan menyebabkan hiperplasia epitel kelenjar uterus, semua struktur uterus terjadi hipertrofi dan hiperplasia. Amant *et al.* (2005) melaporkan bahwa kebanyakan hiperplasia endometrium berperan sebagai prekursor kanker endometrium tipe I. Dilaporkan juga bahwa hampir 80% karsinoma endometrium atau kanker endometrium tipe I terjadi akibat terapi sulih hormon atau terkait dengan estrogen. Dari uraian tersebut memberi gambaran bahwa suplementasi *raloxifene* pada tikus

Tabel 1. Rataan konsentrasi estradiol (pg/mL), bobot uterus (%) tikus *Wistar* ovariectomi yang mengkonsumsi kombinasi suplemen *calcitriol* dengan *raloxifene* selama delapan minggu

Kelompok	Normal (NK)	Ovariectomi (OVK)	Ovariectomi+ <i>calcitriol</i> (OVD)	Ovariectomi+ <i>Raloxifen</i> (OVR)	Ovariectomi+ <i>calcitriol</i> + <i>raloxifen</i> (OVDR)
Estradiol	^c 13,01±1,31 ^a	^c 11,92±0,63 ^a	10,49±1,92 ^a	^c 14,00±1,68 ^{ab}	7,06±0,44 ^b
Bobot uterus	0,20±0,006 ^a	0,06±0,01 ^b	0,057±0,015 ^b	0,067±0,006 ^b	0,06±0,017 ^b

Keterangan : Angka dalam baris yang diikuti atau diawali huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda signifikan

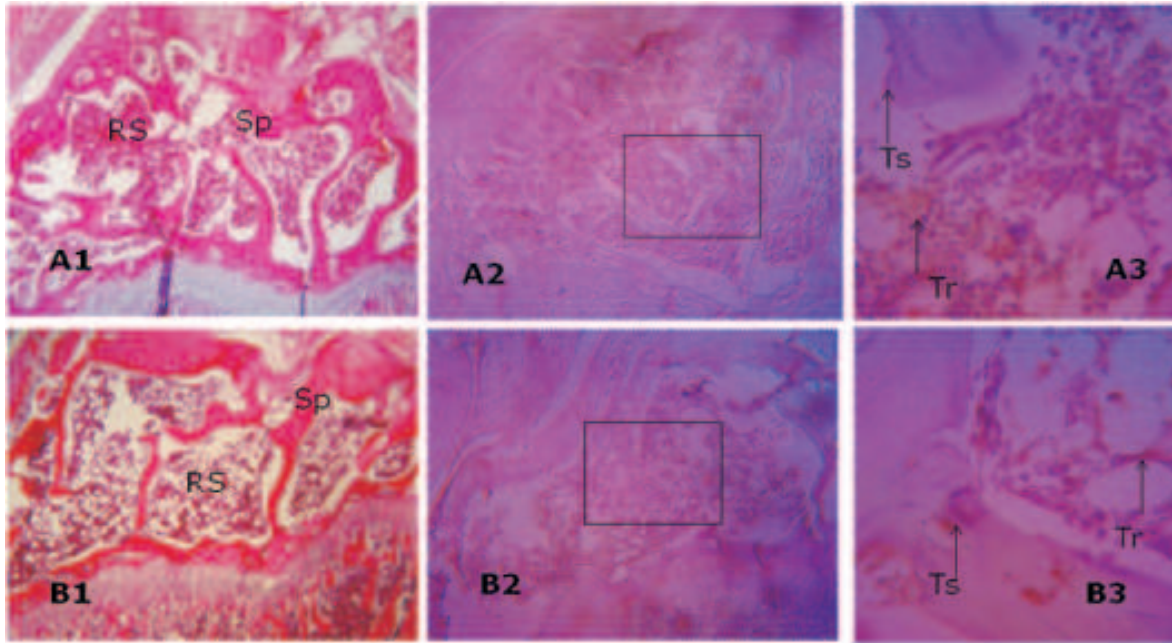
$$\text{Bobot uterus (\%)} = (\text{Bobot uterus}) : (\text{bobot badan tikus pada akhir penelitian}) \times 100\%$$

OVR yang menyebabkan lebih tingginya konsentrasi estradiol namun mempunyai persentase bobot uterus lebih ringan, dan kombinasi suplemen *calcitriol* dan *raloxifene* pada tikus OVDR, menyebabkan lebih rendahnya konsentrasi estradiol dan persentase bobot uterus dibanding tikus NK, diduga aman bagi uterus, namun dalam penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan histopatologi uterus.

Histopatologi epifisis tulang femur distalis tikus NK tidak teramati ada perubahan. Spikulum trabekula dan rongga sumsum tulang di antara tulang trabekula epifisis tulang femur distalis (Gambar 1: A1) sesuai yang digambarkan Buckwalter *et al.* (1996), bahwa epifisis proksimalis dan distalis tulang panjang tersusun dari tulang trabekula, dan celah yang menghubungkan antar trabekula diisi oleh sumsum tulang. Gambaran immunohistokimia dengan antibodi monoklonal *mouse anti-TRAP5b* (Gambar 1: A2 dan A3), pada tulang trabekula antar rongga sumsum tulang dan permukaan spikulum trabekula bagian epifisis tulang femur distalis tikus NK teramati TRAP5b positif berwarna coklat. Dari pemeriksaan histopatologi dan immunohistokimia epifisis tulang femur distalis tikus NK menunjukkan proses *remodeling* tulang berlangsung normal, terjadi proses keseimbangan antara resorpsi tulang oleh osteoklas yang ditandai TRAP5b berwarna coklat pada tulang trabekula antar rongga sumsum tulang dan pada permukaan spikulum trabekula, dan pembentukan tulang oleh osteoblas yang ditandai lebih banyaknya spikulum trabekula. Penggunaan spikulum trabekula sebagai petanda keberadaan osteoblas adalah sesuai laporan Shiraiishi *et al.* (2000) bahwa rekrut-men, diferensiasi osteoblas, dan pembentukan tulang oleh osteoblas ditandai dengan banyaknya spikulum trabekula. Dalam

penelitian ini, aktivitas resorpsi tulang oleh osteoklas ditunjukkan petanda TRAP5b yang terlihat berwarna coklat di dalam tulang trabekula antar rongga sumsum tulang dan permukaan spikulum trabekula. Semakin tinggi aktivitas resorpsi tulang ditandai oleh semakin banyaknya TRAP5b yang diproduksi oleh osteoklas. Halleen dan Ranta (2001) melaporkan bahwa sejak terjadi proses diferensiasi, prekursor osteoklas secara progresif mengekspresikan TRAP5b. Beberapa peneliti melaporkan bahwa osteoklas selama meresorpsi tulang juga mensekresikan TRAP5b (Janckila *et al.*, 2001; Halleen *et al.*, 2000; Vaananen *et al.*, 2000; Alatalo *et al.*, 2000). Menurut Takahashi *et al.* (1994) dan Yam (1974) bahwa peningkatan aktivitas osteoklas diikuti peningkatan sintesis dan sekresi TRAP5b. Ljusberg *et al.* (1999) dan Minkin (1982) melaporkan bahwa TRAP5b berperan dalam resorpsi tulang baik secara intraseluler maupun ekstraseluler. Menurut Reinholt *et al.* (1990) peran ekstraseluler TRAP5b selama resorpsi tulang ditunjukkan oleh akumulasinya di dalam matriks tulang yang berbatasan dengan *ruffled border* osteoklas yang meresorpsi tulang, sedangkan menurut Halleen *et al.* (1999) peran intraseluler TRAP5b selama resorpsi tulang ditunjukkan dari keberadaannya dan aktivitasnya di dalam vesikel transitotik.

Bagian epifisis tulang femur distalis tikus normal NK diberi antibodi monoklonal anti *tartrate resistant alkaline phosphatase 5b* (TRAP5b) (A2 dan A3) terlihat TRAP5b positif berwarna coklat pada trabekula tulang dalam rongga sumsum tulang (Tr) dan permukaan spikulum trabekula (Ts) (A2=Streptavidin-biotin, 100x.; A3= Streptavidin-biotin, 250x.). Pada tikus ovariectomi OVK diberi antibodi monoklonal anti *tartrate resistant alkaline pho-*



Gambar 1. Histopatologi epifisis tulang femur distalis tikus normal NK (A1) terlihat rongga sumsum tulang normal dan dominasi jaringan hematopoietik dalam rongga sumsum tulang (RS), spikulum trabekula normal (Sp). Pada tikus ovariektomi OVX (B1) terlihat pelebaran rongga sumsum tulang normal dan dominasi jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang (RS), sedikit spikulum trabekula (Sp) (Hematoksilin-eosin, 100x.).

sphatase 5b (TRAP5b) (B2 dan B3) terlihat TRAP5b positif berwarna coklat pada trabekula tulang dalam rongga sumsum tulang (Tr) dan permukaan spikulum trabekula (Ts) (B2=Streptavidin-biotin, 100x.; B3=Streptavidin-biotin, 250x.).

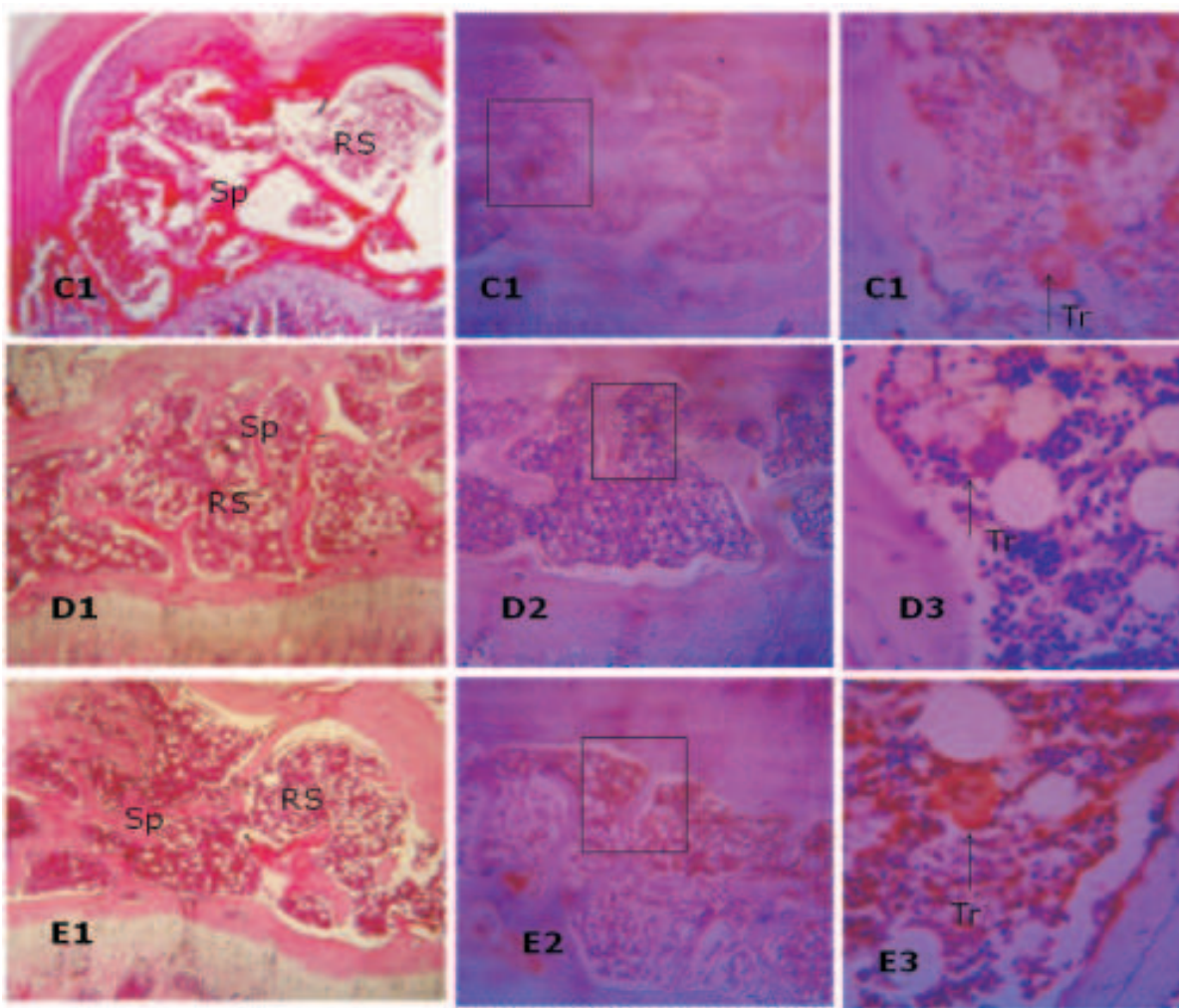
Tikus kontrol ovariektomi OVX mempunyai konsentrasi estradiol lebih rendah dibanding tikus NK dan pada pemeriksaan histopatologi epifisis tulang femur distalis menunjukkan terjadi osteoporosis yang ditandai dominasi jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang dan sedikitnya spikulum trabekula (Gambar 1: B1). Lebih rendahnya konsentrasi estradiol tikus ovariektomi diduga menjadi penyebab dominasi jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang. Cooke dan Naaz (2004) menyatakan bahwa estrogen berperan penting dalam mengendalikan osteoblas dan adiposit. Penelitian pada hewan model dan manusia menunjukkan bahwa turunya konsentrasi estrogen mengganggu proliferasi dan aktivitas estrogenik dalam rongga sumsum tulang (Rodriguez *et al.*, 1999). Menurut Weisberg *et al.* (2003) adiposit dalam sumsum tulang meningkatkan resorpsi tulang. Lebih rendahnya konsentrasi estradiol tikus ovariektomi juga menyebabkan tidak terbentuknya

sebagian kerangka tulang trabekula dan turunya spikulum trabekula. Verma *et al.* (2002) dan Justesen *et al.* (2001) melaporkan bahwa peningkatan konversi sel stroma menjadi adiposit dibanding menjadi osteoblas, menurunkan pembentukan tulang. Lebih tingginya aktivitas resorpsi tulang dan turunya pembentukan tulang memberi gambaran terjadi osteoporosis. Beberapa peneliti melaporkan bahwa osteoporosis dapat terjadi akibat tidak seimbang proses resorpsi dan pembentukan tulang (Karsdal *et al.*, 2007; Seeman *et al.*, 2006; Martin dan Sims, 2005; Teitelbaum dan Ross, 2003; Goltzman, 2002), laju resorpsi tulang lebih aktif dari pada pembentukan tulang, meningkatnya resorpsi tulang, menurunnya pembentukan tulang atau kedua-duanya (Buckwalter *et al.*, 1996).

Suplementasi *calcitriol* pada tikus ovariektomi OVD menyebabkan konsentrasi estradiol lebih rendah dibanding tikus OVX dan NK. Hal tersebut menyebabkan lebih sedikit spikulum trabekula di bagian epifisis tulang femur distalis (Gambar 2: C1) dan lebih banyak ekspresi TRAP5b dalam rongga sumsum tulang di bagian epifisis tulang femur distalis tikus OVD dibanding tikus NK (Gambar 2: C2 dan C3). Namun, terlihat lebih sedikit ekspresi

TRAP5b dan lebih banyak spikulum trabekula tikus OVD dibanding tikus OVK. Lebih sedikitnya ekspresi TRAP5b tikus OVD dibanding tikus OVK memberi gambaran bahwa suplementasi *calcitriol* pada tikus OVD menyebabkan lebih rendahnya aktivitas osteoklas meresorpsi tulang dibanding tikus OVK. Namun, menyebabkan lebih tingginya aktivitas resorpsi tulang tikus OVD dibanding tikus NK yang ditandai lebih banyaknya ekspresi TRAP5b dalam rongga sumsum tulang tikus OVD dibanding tikus NK. Menurut Manolagas (2000) estrogen berperan menurunkan aktivitas osteoklas, dan turunnya estrogen meningkatkan

resorpsi tulang. Suplementasi *calcitriol* pada tikus OVD juga diduga meningkatkan *calcitriol* dan menyebabkan tikus OVD mempunyai lebih sedikit ekspresi TRAP5b dalam rongga sumsum tulang tikus OVD dibanding tikus OVK. Ekspresi TRAP5b dalam rongga sumsum tulang tikus OVD yang lebih sedikit dibanding tikus OVK memberi gambaran bahwa suplementasi *calcitriol* pada tikus OVD menyebabkan aktivitas resorpsi tulang tikus OVD lebih rendah dibanding tikus OVK. Hartiningsih dan Anggraeni (2013) melaporkan bahwa suplementasi *calcitriol* pada tikus ovariektomi menurunkan aktivitas resorpsi tulang yang



Gambar 2. Histopatologi epifisis tulang femur distalis tikus ovariektomi yang diberi suplementasi *calcitriol* OVD (C1) terlihat pelebaran rongga sumsum tulang normal dan dominasi jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang (RS), sedikit spikulum trabekula (Sp). Pada tikus ovariektomi yang diberi suplementasi *raloksifene* OVR (D1) terlihat sedikit jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang (RS), lebih banyak spikulum trabekula (Sp). Pada tikus ovariektomi yang diberi kombinasi suplementasi *calcitriol* dan *raloksifene* OVDR (E1) terlihat sedikit jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang (RS), lebih banyak spikulum trabekula (Sp) (Hematoksilin-eosin, 100x.).

ditandai lebih sedikitnya adiposit dalam rongga sumsum tulang femur. Dilaporkan Zhou *et al.* (2006), Kong dan Li (2006); Sun dan Zemel (2004), bahwa 1,25-dihidroksivitamin D₃ menginduksi apoptosis adipogenesis dan menghambat adipogenesis dalam sel. Dari uraian tersebut memberi gambaran bahwa suplementasi *calcitriol* pada tikus OVD menyebabkan aktivitas resorpsi tulang tikus OVD lebih rendah dibanding tikus OVK, namun lebih tinggi dibanding tikus NK.

Suplementasi *calcitriol* pada tikus ovariektomi OVD yang diduga meningkatkan *calcitriol* juga menyebabkan tikus ovariektomi OVD mempunyai lebih banyak spikulum trabekula dibanding tikus OVK, namun mempunyai lebih sedikit spikulum trabekula di bagian epifisis tulang femur distalis dibanding tikus NK. Chang *et al.* (2013) dan Anderson *et al.* (2006) melaporkan bahwa suplementasi 1,25-dihidroksivitamin D₃ memicu pembentukan tulang yang ditandai meningkatnya proliferasi preosteoblas menjadi osteoblas, alkaline fosfatase, osteokalsin, dan densitas mineral tulang femur. Dari uraian tersebut memberi gambaran bahwa suplementasi *calcitriol* sebanyak 20 ng menyebabkan pembentukan tulang lebih rendah dibanding tikus NK, namun lebih tinggi dibanding tikus OVK.

Bagian epifisis tulang femur distalis tikus OVD yang diberi antibodi monoklonal anti *tartrate resistant alkaline phosphatase 5b* (TRAP5b) (C2 dan C3) terlihat TRAP5b positif berwarna coklat pada trabekula tulang dalam rongga sumsum tulang (Tr) dan pada permukaan spikulun trabekula (Ts) (C2=Streptavidin-biotin, 100x.; C3=Streptavidin-biotin, 250x.). Pada tikus OVR (D2 dan D3) terlihat sedikit TRAP5b positif berwarna coklat pada trabekula tulang dalam rongga sumsum tulang (Tr) (D2=Streptavidin-biotin, 100x.; D3=Streptavidin-biotin, 250x.). Pada tikus OVDR (E2 dan E3) terlihat sedikit TRAP5b positif berwarna coklat pada trabekula tulang dalam rongga sumsum tulang (Tr) dan pada permukaan spikulun trabekula (Ts) (E2=Streptavidin-biotin, 100x.; E3=Streptavidin-biotin, 250x.).

Suplementasi *raloxifene* pada tikus ovariektomi OVR menyebabkan konsentrasi estradiol cenderung lebih tinggi dan meningkatkan pembentukan tulang yang ditandai lebih banyaknya spikulum trabekula dibanding tikus NK (Gambar 2: D1). Selain itu juga menyebabkan ekspresi TRAP5b dalam rongga sumsum tulang bagian epifisis tulang femur distalis tikus

OVR lebih sedikit dibanding tikus NK yang memberi gambaran turunya aktivitas osteoklas meresorpsi tulang (Gambar 2: D2 dan D3). Sesuai laporan Wu *et al.* (1999) bahwa *raloxifene* mempunyai sifat agonis reseptor estrogenik pada tulang. Scott *et al.* (1999) juga melaporkan bahwa *raloxifene* mempunyai efek agonis estrogenik pada tulang.

Suplementasi kombinasi *raloxifene* dengan *calcitriol* pada tikus ovariektomi OVDR menyebabkan lebih rendahnya konsentrasi estrogen dibanding tikus OVD, OVK, dan NK (Tabel 1). Lebih rendahnya konsentrasi estrogen tikus OVDR dibanding tikus OVD, OVK, dan NK diduga menjadi penyebab lebih banyaknya ekspresi TRAP5b dalam rongga sumsum tulang epifisis femur distalis tikus OVDR sebagai petanda lebih tingginya aktivitas osteoklas meresorpsi tulang (Gambar 2: E2 dan E3). Lebih tingginya *raloxifene* tikus OVDR dibanding tikus OVD diduga menjadi penyebab meningkatnya pembentukan tulang yang ditandai lebih banyaknya spikulum trabekula epifisis femur distalis tikus OVDR (Gambar 2: E1). Lebih tingginya *raloxifene* dan 1,25-dihidroksivitamin D₃ tikus OVDR dibanding tikus OVK dan NK juga diduga menjadi penyebab meningkatnya pembentukan tulang yang ditandai lebih banyaknya spikulum trabekula epifisis femur distalis tikus OVDR. Dari uraian tersebut memberi gambaran bahwa kombinasi suplementasi *calcitriol* dengan *raloxifene* meningkatkan resorpsi tulang dan meningkatkan pembentukan tulang.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kombinasi suplementasi *calcitriol* dan *raloxifene* selama delapan minggu pada tikus ovariektomi meningkatkan ekspresi TRAP5b sebagai petanda meningkatnya aktivitas osteoklas meresorpsi tulang, dan meningkatkan pembentukan tulang yang ditandai banyaknya spikulum trabekula epifisis femur distalis.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut apakah suplementasi kombinasi *calcitriol* 20 ng/hari/tikus dan *raloxifene* 3 mg/hari/tikus secara oral selama delapan minggu pada tikus ovariektomi aman bagi ginjal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan sebagian hasil Penelitian Pengembangan Bagian, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Fakultas Kedokteran Hewan yang telah memberi dana penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Alatalo SL, Halleen JM, Hentunen TA, Monkkonen J, Vaananen HK. 2000. Rapid screening method for osteoclast differentiation *in vitro* that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. *Clin Chem* 46: 1751–1754.
- Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. 2005. Endometrial cancer. *Lancet* 366: 491-505.
- Anderson GL, Chlebowski RT, Rossouw JE. 2006. Prior hormone therapy and breast cancer risk in the women's health initiative randomized trial of estrogen plus progestin. *Maturitas* 55: 103-115.
- Aswar UM, Mohan V, Bondhankar SL. 2012. Antiosteoporotic activity of phytoestrogen-rich fraction separated from ethanol extract of aerial parts of *Cissus quadrangularis* in ovariectomized rats. *Indian J Pharmacol* 44(3): 345-350.
- Beresford SAA, Weiss NS, Voigt LF, McKnight B. 1997. Risk of endometrial cancer in relation to use of oestrogen combined with cyclic progestagen therapy in postmenopausal women. *Lancet* 349: 458-461.
- Berkvist L, Persson I. 1996. Hormone replacement therapy and breast cancer : a review of current knowledge. *Drud saf* 15: 360-370.
- Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Becker R. 1996. Bone biology, part I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect* 45: 371–386.
- Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. 1996. Bone biology, part II: formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *JBJS Instr. Course Lect* 45: 387–399.
- Chang KL, Hu YC, Hsieh BS, Cheng HL, Hsu HW, Huang LW, Su SJ. 2013. Combined effect of soy isoflavones and vitamin D3 on bone loss in ovariectomized rats. *Nutrition* 29: 250-257.
- Cooke PS, Naaz A. 2004. Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med* 229: 1127–1135.
- Doherty DA, Sanders KM, Kotowicz MA, Prince RL. 2001. Lifetime and five-year age-specific risks of first and subsequent osteoporotic fractures in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 12: 16–23.
- Goltzman D. 2002. Discoveries, drugs and skeletal disorders. *Nat Rev Drug Discov* 1: 784-796.
- Halleen JM, Ranta R. 2001. Tartrate-resistant acid phosphatase as a serum marker of bone resorption. *Am Clin Lab* 20: 29–30.
- Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Vaananen HK. 2000. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15: 1337–1345.
- Halleen JM, Raisanen SR, Salo J, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA, Lehenkari PP, Kaija H, Vihko P, Vaananen HK. 1999. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem* 274: 22907–22910
- Hartiningsih, Anggraeni D. 2013. Kombinasi *Calcitriol* dan *Ethinil Ethyl Estradiol* Untuk Mencegah Osteoporosis Tikus Ovariectomi. Laporan Penelitian Pengembangan Bagian 2013 Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Hartiningsih, Anggraeni D, Aji D. 2012. Respon metafisis tulang femur distalis tikus ovariectomi yang mengkonsumsi kalsitriol. *Jurnal Kedokteran Hewan* 6: 92-98.
- Hartiningsih, Widiyono I, Anggraeni D. 2006. Peranan ikan teri tawar dan 1,25-dihidroksivitamin D3 dalam kesehatan tulang dan ginjal: Studi penanggulangan osteoporosis. Laporan Penelitian Fundamental Perguruan Tinggi. (Tahun Pertama), Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

- Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. 1996. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . *Nat Med* 2: 1132-1136.
- Janckila AJ, Takahasi K, Sun SZ, Yam LT. 2001. Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. *Clin Chem* 47: 74–80.
- Justessen J, Stenderus K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steinche T, Kassem M. 2001. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* 2(3): 165-171.
- Karsdal MA, Martin TJ, Bollerslev J, Christiansen C, Henriksen K. 2007. Are nonresorbing osteoclasts sources of bone anabolic activity? *J Bone Miner Res* 22: 487-494.
- Kong J, Li YC. 2006. Molecular mechanism of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E916–E924.
- Lepescheux L, Secchi J, Gaillard-Kelly M, and Miller P. 2001. Effects of 17 β -estradiol and trimegestone alone, and in combination, on the bone and uterus of ovariectomized rats. *Gynecol Endocrinol* 15: 312–320.
- Li F, Yang Y, Guo C, Zhang C, Yang Z, Li P. 2013. Antiosteoporotic activity of echinacoside in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 15:20(6): 549-557.
- Ljusberg J, Ek-Rylander B, Andersson G. 1999. Tartrate-resistant purple acid phosphatase is synthesised as a latent proenzyme and activated by cysteine proteinases. *Biochem J* 343: 63–9.
- Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. 2002. Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* 57: 385-409.
- Manolagas SC. 2000. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21: 115-137.
- Martin TJ, Sims NA. 2005. Osteoclast derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trend Mol Med* 11: 76-81.
- McClung MR. 1996. Current bone mineral density data on bisphosphonates in postmenopausal osteoporosis. *Bone* 19: 195S–198S.
- Minkin C. 1982. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 34: 285–90.
- Notelovitz M. 1997. Estrogen therapy and osteoporosis: principles & practice. *Am J Med Sci* 313(1): 2-12.
- Pan M, Li Z, Yeung V, Xu RJ. 2010. Dietary supplementation of soy germ phytoestrogens or estradiol improves spatial memory performance and increases gene expression of BDNF, TrkB receptor and synaptic factors in ovariectomized rats. *Nutrition and Metabolism* 7: 75.
- Qu Q, Perala-Heape M, Kapanen A, Dahllund J, Salo J, Vaananen HK, Harkonen P. 1998. Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone* 22: 201–209.
- Rasheed WI, Oraby FS, Hussein JS. 2009. Therapeutic efficacy of garlic oil with 1,25 Dihydroxy Vit D₃ and calcium in osteoporotic ovariectomized rats. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(2): 977-981.
- Reinholt FP, Widholm SM, Ek-Rylander B, Andersson G. 1990. Ultrastructural localisation of tartrate-resistant acid ATPase in bone. *J Bone Miner Res* 5: 1055–1061.
- Rodan GA, Martin TJ. 2000. Therapeutic approaches to bone disease. *Science* 289: 1508-1514.
- Rodriguez JP, Garat S, Gajardo H, Pino AM, Seitz G. 1999. Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics. *J Cell Biochem* 75: 414–423.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick M, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. 2002. Risk and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288: 321-333.
- Scott JA, DA Camara CC, Barly JE. 1999. Raloxifene : A Selective Estrogen Receptor Modulator. *Am J Clin Nutr* 89: 1997S-2008S.

- Seeman E, Vellas B, Benhamou C, Aquino JP, Semler J, Kaufman JM, Hoszowski K, Varela AR, Fiore C, Brixen K, Reginster JY, Boonen S. 2006. Strontium ranelate reduce the risk of vertebral and nonvertebral fractures in women eighty years of age and older. *J Bone Miner Res* 21: 1113-1120.
- Shiraishi A, Takeda S, Masaki T, Higuchi Y, Uchiyama Y, Kubodera N, Sato K, Ikeda K, Nakamura T, Matsumoto T, Ogata E. 2000. Alfacalcidol inhibits bone resorption and stimulates formation in an ovariectomized rat model of osteoporosis: distinct actions from estrogen. *J Bone Miner Res* 15: 235-244.
- Slemenda C, Longcope C, Peacock M, Hui S, Johnston CC. 1996. Sex steroids, bone mass, and bone loss. A prospective study of pre-, peri-, and postmenopausal women. *J Clin Invest* 97: 14-21.
- Stone K, Bauer DC, Black DM, Sklarin P, Ensrud KE, Cumming SR. 1998. Hormonal predictors of bone loss in elderly women : a prospective study. The study of osteoporotic fractures research group. *J Bone Miner Res* 13: 1167-1174.
- Sun X, Zemel MB. 2004. Role of uncoupling protein 2 (UCP2) expression and 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 in modulating adipocyte apoptosis. *Faseb J* 18: 1430-1432.
- Takahashi N, Udagawa N, Tanaka S, Murakami H, Owan I, Tamura T, Suda T. 1994. Postmitotic osteoclast precursors are mononuclear cells which express macrophage-associated phenotypes. *Dev Biol* 163: 212-221.
- Teitelbaum SL, Ross FP. 2003. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4: 638-649.
- Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. 2000. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 113: 377-381.
- Van Abel M, Hoenderop JGJ, Dardenne O, St Arnaud R, Van Os CH, Van Leeuwen HJPTM, Bindels RJM. 2002. 1,25-Dihydroxyvitamin D3-independent stimulatory effect of estrogen on the expression of EcaC1 in the kidney. *J Am Nephrol* 13: 2102-2109.
- Vedi S, Compston JE. 1996. The effects of long-term hormone replacement therapy on bone remodeling in postmenopausal women. *Bone* 19: 535-539.
- Verma S, Rajaratnam JH, Denton J, Hoyland JA, Byers RJ. 2002. Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. *J Clin Pathol.* 55: 693-698.
- Viereck V, Grundker C, Blaschke S, Niederle B, Siggelkow H, Frosch KH, Raddatz D, Emons G, Hofbauer LC. 2003. Raloxifene concurrently stimulates osteoprotegerin and inhibits interleukin-6 production by human trabecular osteoblasts. *J Clin Endocrin & Met* 88(9): 4206-4213.
- Vieth R, Milojevic S, Peltekova V. 2000. Improved cholecalciferol nutrition in rats is noncalcemic, suppresses parathyroid hormone and increases responsiveness to 1,25 dihydroxycholecalciferol. *J Nutr* 130: 578-584.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112(12): 1785-1808.
- Wood RJ, Fleets JC, Cashman K, Bruns ME, Deluca HF. 1998. Intestinal calcium Absorption in the Aged rats: Evidence of Intestinal resistance to 1,25(OH)₂ Vitamin D. *Endocrinology* 39(9): 3843-3848
- Wu X, Glinn MA, Ostrowski NL, Su Y, Ni B, Cole HW, Bryant HU, Paul SM. 1999. Raloxifene and estradiol benzoate both fully restore hippocampal choline acetyltransferase activity in ovariectomized rats. *Brain Research* 847: 98-104.
- Yam LT. 1974. Clinical significance of human acid phosphatases. *Am J Med* 56: 604-616.
- Zhou YS, Liu YS, Tan JG. 2006. Is 1, 25-dihydroxyvitamin D3 an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells *in vitro*? *Chin Med J (Engl)* 119: 1278-1286.