

Penurunan *Osteoclast* Epifisis Tulang Radius Mencit Perimenopause dengan Pemberian Estrogen dan Berenang

(*OSTEOCLAST COUNT DECREASING ON EPIPHYSIS PART OF RADIUS IN PERIMENOPAUSAL MICE ON ESTROGEN AND SWIMMING TREATMENT*)

Yuliana¹, Ida Ayu Dewi Wiryanthini², Nyoman Mangku Karmaya¹, Tangking Widarsa³

¹Bagian Anatomi, ²Bagian Biokimia, ³Program Studi Ilmu Kesehatan Masyarakat
Fakultas Kedokteran Universitas Udayana Jalan Sudirman, Denpasar,
Telepon 0361-222510 Email: lee.yuliana@gmail.com

ABSTRAK

Peningkatan usia harapan hidup menyebabkan berbagai masalah kesehatan. Salah satu di antaranya adalah osteoporosis. Penyakit ini bisa dicegah dengan pemberian estrogen dan berenang. Terapi estrogen tidak aman jika diberikan dalam waktu lama. Tujuan penelitian adalah mengetahui terjadinya penurunan *osteoclast* pada pemberian estrogen dan berenang. Penelitian dirancang dengan *Pretest-Posttest Control Group Design* ini menggunakan 52 ekor mencit (15-16 bulan). Mencit dibagi secara acak menjadi empat kelompok, yaitu kelompok kontrol, estrogen, berenang, dan kombinasi. Setelah 90 hari perlakuan, mencit dikorbankan nyawanya dan dibuat preparat histologi *epiphysis* radius mencit dengan pengecatan *haematoxyllin eosin*. Perbedaan jumlah rata-rata *osteoclast* antara kelompok perlakuan dianalisis dengan analisis sidik ragam. Rataan *osteoclast* pada kelompok kontrol sebesar $0,12 \pm 0,1$. Ketiga kelompok perlakuan memiliki rata-rata *osteoclast* yang sama, yaitu $0,02 \pm 0,06$. Simpulan penelitian ini tidak ada perbedaan yang signifikan dalam hal penurunan *osteoclast* pada pemberian estrogen dan berenang secara tersendiri maupun kombinasi.

Kata kunci: osteoporosis, *osteoclast*, perimenopause, estrogen, berenang

ABSTRACT

Increasing of life age expectancy has risen many health problem. One of the problem is osteoporosis. This disease can be prevented by estrogen and swimming treatment. Estrogen is not safe to be given in long term. This study aim was to investigate the decreasing of *osteoclast* count in estrogen and swimming treatment. This study used *Pretest-Posttest Control Group Design* with fifty two mice (15-16 months old). The mice were divided randomly into 4 groups, i.e. control, estrogen, swimming and combination group. After 90 days treatment, epiphysis of radius bone was sectioned and stained by haematoxyllin eosin. Osteoclast difference between groups were analyzed by using analysis of variance. Mean of *osteoclast* in control group was 0.12 ± 0.1 , and three other groups had the same level, i.e. 0.02 ± 0.06 . In conclusion, the decrease of *osteoclast* count did not have any significant difference between treatment groups.

Keywords: osteoporosis, *osteoclast*, perimenopause, estrogen, swimming

PENDAHULUAN

Kemajuan teknologi membawa dampak positif bagi kesehatan sehingga jumlah penduduk usia lanjut makin bertambah. Peningkatan usia sering disertai dengan berbagai penyakit akibat penurunan hormon. Salah satu contoh penyakit yang sering dialami wanita menopause adalah osteoporosis. Jika tidak ditangani dengan serius, osteoporosis dapat menyebabkan fraktur patologi dan mengganggu

aktivitas kehidupan sehari-hari. Penyakit ini perlu diketahui sejak dini, dicegah, diperlambat, dan diobati. Jika osteoporosis bisa dicegah secara dini, tentu akan meningkatkan kualitas kehidupan penderita.

Osteoporosis terjadi karena pembentukan *osteoclast* lebih cepat daripada *osteoblast* sehingga resorpsi tulang lebih besar daripada pembentukan tulang (Sambo *et al.*, 2009). Densitas tulang wanita berkurang sekitar 5-15% pada masa *perimenopause* dan sebagian besar

terjadi pada tulang trabekular (Chahal dan Drake, 2007).

Osteoporosis ditandai dengan kerapuhan tulang, sehingga mudah fraktur hanya dengan sedikit trauma. Hal ini akan menyebabkan penurunan kualitas hidup. Tulang yang sering menderita osteoporosis adalah vertebra lumbalis, panggul, iga, dan radius. Prevalensi osteoporosis pada tulang radius wanita yang berusia di atas 40 tahun sekitar 18,8% (Shin *et al.*, 2004). Fraktur tulang radius terjadi lebih awal daripada fraktur panggul dan vertebra (Oyen *et al.*, 2011).

Di Indonesia jumlah wanita usia lanjut pada tahun 2000 bertambah sebanyak 15,5 juta orang, yang berisiko patah tulang karena osteoporosis sebesar 14,7%, dan yang mengalami fraktur patologi sebanyak 227.850 orang. Biaya yang perlu dikeluarkan untuk pengobatan diperkirakan sebesar sekitar 22,9 triliun rupiah (Republika online, 2004).

Ketidakseimbangan antara resorpsi dan pembentukan tulang menyebabkan osteoporosis. Penurunan estrogen pada masa menopause menyebabkan peningkatan *bone turnover* dan resorpsi tulang oleh *osteoclast*. Akibatnya terjadi penurunan massa tulang (Stachura dan Olchowik, 2008).

Pencegahan osteoporosis bisa dengan olahraga dan obat-obatan. Obat-obatan yang diberikan yaitu estrogen, kalsium, vitamin D, dan bifosfonat. Olahraga memiliki efek anabolik, sehingga mampu menghentikan bahkan mengurangi osteoporosis pada saat yang bersamaan (Reid *et al.*, 2009).

Pasien yang berusia di atas 40 tahun, penderita penyakit jantung, obesitas, diabetes melitus, dan hipertensi perlu mempertimbangkan banyak faktor jika akan berolahraga. Olahraga yang tepat bagi pasien seperti itu adalah berenang (Hart *et al.*, 2001).

Reseptor estrogen pada *osteoclast* diperkirakan berperan dalam perlindungan estrogen terhadap osteoporosis. Indikasi terapi hormon telah berubah. Preparat estrogen dosis rendah (0,3 mg per orang) telah disetujui penggunaannya untuk pencegahan osteoporosis pada wanita *postmenopause* (Utian *et al.*, 2010). Waktu pemberian hormon estrogen masih merupakan hal yang *controversial*. Sebagian besar dilakukan setelah *menopause* (Bonnick, 2010).

Penelitian ini bertujuan mengetahui interaksi estrogen dan berenang yang diberikan secara bersama-sama terhadap penurunan

jumlah sel *osteoclast*. Jika pada penelitian yang telah ada lebih banyak dilakukan pengukuran parameter kimia darah, maka pada penelitian ini dilakukan pengukuran jumlah sel. Penelitian yang ada mengenai pemberian kombinasi antara estrogen dan berenang pada masa perimenopause untuk pencegahan osteoporosis juga masih kurang.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan rancangan desain *Pretest Posttest Control Group Design* (Campbell, 1968). Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi FK UNUD, dari bulan Desember 2011 sampai Maret 2012. Sampel penelitian adalah mencit betina perimenopause sebanyak 52 ekor mencit (*Mus musculus*) umur 15-16 bulan dengan bobot badan 25-30 g, dan tidak ada cacat fisik. Umur mencit ditentukan dari melihat tanggal kelahiran mencit dan waktu pengambilan sampel. Satu bulan mencit ekuivalen dengan 3 tahun pada manusia. Jadi mencit 15-16 bulan ekuivalen dengan manusia 45-48 tahun (masa *perimenopause*).

Perlakuan hewan percobaan

Subjek penelitian dibagi menjadi dua kelompok secara acak, yaitu 12 ekor mencit untuk *pretest* (tiga ekor untuk masing-masing kelompok) serta 40 ekor mencit untuk *posttest*. Kelompok *posttest* dibagi empat secara acak, yaitu kelompok kontrol, pemberian estrogen, perlakuan berenang, serta kombinasi estrogen dan berenang. Kelompok kontrol dibiarkan hidup bebas selama 90 hari. Kelompok estrogen diberikan 1 tablet *natural conjugated estrogen (esthero)*, 0,625 mg, yang dihancurkan dan dilarutkan dalam 160 ml akuades serta diberikan pada mencit sebanyak 0,00078 mg per 20 g bobot badan (0,2 ml) secara oral sekali sehari memakai sonde selama 90 hari (Lalamentik, 2008). Perlakuan berenang dikerjakan dengan memasukkan mencit ke dalam bak berukuran 30x30 cm berisi air dengan suhu 32–34°C, dengan ketinggian air 25 cm selama 4 menit empat kali seminggu selama 90 hari, setiap hari Senin, Selasa, Kamis, dan Jumat. Lama berenang minimal 4 menit, maksimal 10 menit, dan dihentikan jika mencit sudah berenang selama 10 menit atau sudah tidak mau berenang setelah dirangsang sebanyak tiga kali. Setelah 90 hari perlakuan,

mencit dieuthanasia (dikorbankan) dengan chloroform dan diambil *epiphysis* tulang radiusnya setebal 5 mm untuk dibuat sediaan histologi dan dilakukan pewarnaan dengan *haematoxylin eosin*.

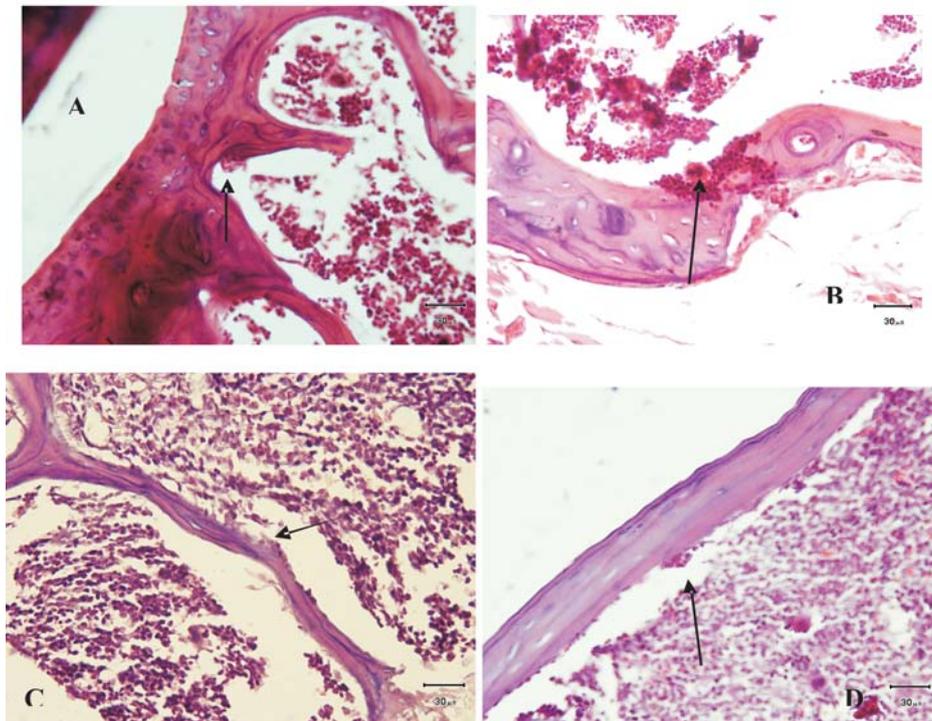
Teknik Pembuatan Preparat dan Pengamatan Histologi

Epiphysis tulang radius mencit difiksasi dalam buffer formalin 10% (24 jam), dicuci dengan air mengalir, dan dilakukan dekalsifikasi dengan *nitric acid* 5% (12 jam). Setelah dicuci dengan air, dimasukkan ke dalam *tissue processor*, dengan rangkaian proses sebagai berikut: masuk ke *netral buffer formalin* 10% (2 jam dua kali), alkohol 70% (2 jam), alkohol 95% (2 jam), alkohol 100% (2 jam, 3 jam), toluene (3 jam dua kali), serta paraffin (2 jam dua kali). Jaringan diinfiltrasi dengan paraffin pada mesin *Tissue-Tek TEC*, kemudian diiris dengan ketebalan empat mikron. Preparat diapungkan dalam akuades yang berisi perekat gelatin dan kalium dikromat pada mesin penangas air dan diambil dengan gelas objek. Preparat dikeringkan dalam inkubator dengan suhu 37-38°C selama satu malam dan diwarnai

dengan prosedur *Harris Hematoxyllin Eosin* (HE). Prosedur penghitungan jumlah sel *osteoclast* dilakukan dengan pemeriksaan mikroskopis memakai mikroskop listrik binokuler *Olympus*, pembesaran 400 x dan diperiksa dengan menggunakan lima lapangan pandang (empat titik ujung dan satu di tengah). Pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Patologi Balai Besar Veteriner (BB Vet), Pegok, Denpasar, Bali. Untuk mengurangi bias, pemeriksaan dilakukan dengan cara tersamar tunggal. Analisis data dilakukan dengan sidik ragam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data rata-rata *osteoclast* mencit *pretest* berdistribusi normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$). Analisis *Two Way Anova* menunjukkan antara keempat kelompok *pretest* tidak ada perbedaan, dengan nilai p 0,936 ($p > 0,05$). Data rata-rata *osteoclast* mencit *posttest* berdistribusi normal ($p > 0,05$) dan tidak homogen ($p < 0,05$). Gambar hasil pengecatan HE disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Gambaran *osteoclast epiphysis* radius mencit (tanda panah) kelompok kontrol (A), estrogen (B), renang (C), serta kombinasi (D) *posttest* (HE, 400 x). Pada gambar tampak sel *osteoclast* yang memiliki banyak sel (multinucleus). Jumlah sel *osteoclast* antara ketiga perlakuan tidak berbeda

Tabel 1. Uji Mann Whitney Rataan *Osteoclast* Radius Mencit Perimenopause

Kelompok (I)	Kelompok (J)	Beda rata-rata (I-J)	P	Beda <i>mean Rank</i>
Kontrol	Estrogen	0,04	0,022	5
	Renang	0,04	0,022	5
	Estrogen+renang	0,04	0,022	5
Estrogen	Renang	0,04	1,00	0
	Estrogen+renang	0,00	1,00	0
Renang	Estrogen+renang	0,00	1,00	0

Keterangan: I = kelompok I; J = kelompok II; p = tingkat kemaknaan

Kelompok kontrol mempunyai rata-rata *osteoclast* $0,12 \pm 0,1$, sedangkan nilai ketiga kelompok lainnya sama, yaitu $0,02 \pm 0,06$. Uji Kruskal Wallis menunjukkan perbedaan tersebut bermakna secara statistika ($p < 0,05$). Uji Mann Whitney menunjukkan bahwa semua perlakuan memberikan efek, namun efek ketiga kelompok perlakuan tidak berbeda dengan nilai $p > 0,05$ (Tabel 1).

Efek Estrogen dan Berenang terhadap Penurunan *Osteoclast*

Faktor yang memengaruhi densitas tulang bisa bersifat lokal maupun sistemik. Estrogen dan sitokin adalah regulator penting untuk proses pembentukan *osteoclast*. *Estrogen-dependent osteoclast cytokines* meliputi *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α) dan interleukin (IL-6). Penelitian menunjukkan kadar TNF- α dan IL-6 diturunkan oleh hormon estrogen (Li et al., 2009).

Estrogen menghambat proliferasi dan diferensiasi *osteoclast precursor*, yang secara langsung dipengaruhi oleh keberadaan sitokin (Duhe, 2003). Reseptor estrogen terdapat pada *osteoblast* dan *osteoclast*. Kerja reseptor estrogen tersebut diperantarai oleh sitokin, terutama oleh IL-1, IL-6, TNF- α , dan *Granulocyte Monosit-Colony Stimulating Factor* (GM-CSF). Kekurangan estrogen meningkatkan ekspresi sitokin tersebut, sehingga meningkatkan jumlah *osteoclast* dan penurunan *bone mineral density* (Hania, 2008).

Estrogen dapat menekan produksi sitokin *osteoklastogenik* pada sel T. Melalui stimulasi ER α pada *osteoclast*, estrogen dapat menginduksi ekspresi *Fas Ligand*. Hal tersebut menyebabkan kematian sel melalui mekanisme

autokrin. Penelitian menunjukkan terdapatnya aksi estrogen yang menginduksi pengikatan ER α terhadap *transcriptional enhancers* pada gen *Fas Ligand*. Kejadian tersebut menyebabkan *upregulation* *osteoblast* yang akan menginduksi apoptosis *osteoclast* melalui mekanisme parakrin (Krum dan Brown, 2008).

Ekspresi ER α penting untuk apoptosis *osteoclast*. Induksi apoptosis oleh estrogen terjadi pada tahap *pre-osteoclast* dan hal tersebut memerlukan keberadaan *osteoblast* dan ekspresi FasL pada *osteoblast*. Estrogen dapat menghambat pembentukan *osteoclast* dengan menginduksi kematian *osteoclast* pada tahap *pre-osteoclast* (Krum et al., 2008).

Ada banyak penelitian mengenai hubungan antara berenang dan massa tulang. Hasilnya menunjukkan hanya ada sedikit peningkatan massa tulang. Sebaliknya, penelitian pada program latihan yang intensif menunjukkan peningkatan produksi hormon stres. Hal tersebut menimbulkan efek negatif pada tulang berupa peningkatan *osteoclast*. Olahraga intensitas rendah tidak memadai untuk menurunkan *osteoclast* (Duhe, 2003).

SIMPULAN

Pemberian estrogen per oral, perlakuan berenang, dan kombinasi dapat menurunkan *osteoclast* pada *epiphysis* tulang radius mencit perimenopause. Estrogen dapat diberikan bersama-sama dengan perlakuan berenang untuk menurunkan *osteoclast* pada tulang radius mencit. Namun, tidak ditemukan perbedaan signifikan dalam hal penurunan *osteoclast* antara ketiga kelompok perlakuan.

SARAN

Penerapan pada manusia memerlukan penelitian lebih lanjut, terutama tentang profil kimia darah serta dosis yang tepat untuk pemberian estrogen dan berenang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada Unit Litbang FK UNUD/RSUP Sanglah Denpasar yang telah membiayai penelitian ini dengan No Surat Perjanjian: 884/Skrt/VIII/2011.

DAFTAR PUSTAKA

- Bonnick SL. 2010. NAMS continuing medical education activity. Management of osteoporosis in the postmenopausal women: position statement of the North American Menopause Society. *Menopause*: 17(1):23-4.
- Campbell D.T. 1968. *Experimental and Quasi Experimental Design for Research*. Chicago: Rand Mc Nally. P. 223-326.
- Chahal H, Drake W. 2007. The Endocrine System and Ageing. *The Journal of Pathology*, 211: 173-80.
- Duhe SA. 2003. Swimming versus Voluntary Running Exercise on Bone Health in Ovariectomized Retired Breeder Rats. (Tesis). Available from: [http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-0626103-161512/unrestricted/Duhe thesis.pdf](http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-0626103-161512/unrestricted/Duhe%20thesis.pdf). [cited 2009 Dec. 31].
- Hania HM. 2008. Occurrence of Osteoporosis Among Menopausal Women in Gaza Strip. (Tesis). Gaza: Islamic University.
- Hart KJ, Shaw JM, Vajda E, Hegsted M, Miller SC. 2001. Swim-trained Rats Have Greater Bone Mass, Density, Strength, and Dynamics. *J Appl Physiol* 91: 1663-1668.
- Krum SA, Brown M. 2008. Unraveling estrogen action in Osteoporosis. *Cell cycle* 7(10): 1348-1352.
- Krum SA, Miranda-Carboni GA, Hauschka PV, Carroll JS, Lane TF, Freedman LP, Brown M. 2008. Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival. *The EMBO Journal* 27:535-45.
- Lalamentik G. 2008. "Terapi Sulih Testosteron (*Testosterone Replacement Therapy*) Memperbaiki Corpus Cavernosum Tikus Wistar (*Rattus Novergicus*) yang dikastrasi" (tesis). Denpasar: Universitas Udayana.
- Li N, Qin LP, Han T, Wu YB, Zhang QY, Zhang H. 2009. Inhibitory Effects of *Morinda officinalis* Extract on Bone Loss in Ovariectomized Rats. *Molecules* 14: 2049-2061.
- Oyen J, Brudvik C, Gjesdal CG, Tell GS, Lie SA, Hove LM. 2011. Osteoporosis as a risk factor for distal radial fractures: a case-control study. *J Bone Joint Surg Am*: 93(4): 348-56.
- Reid RL, Blake J, Abramson B, Aliya K, Senikas V, Fortier M. 2009. *Menopause and Osteoporosis Update JOGC* 7: 36- 43.
- Republika Online. 2004. Osteoporosis Tak Dapat Dihindari. Available at: <http://www.gizi.net/cgi-bin/berita/fullnews.cgi?Newsid108744-0610,58908>. [cited 2009 Dec. 31].
- Sambo AP, Umar H, Adam JMF. 2009. Causes of Secondary Osteoporosis. *The Indonesian Journal of Medical Science*: 2(1):41-50.
- Shin A, Choi JY, Chung HW, Park S, Shin C, Choi YH, Cho SI, Kim DS, Kim DI, Lee KM, Lee K, Yoo KY, Kang D. 2004. Prevalence and Risk Factors of Distal Radius and Calcaneus Bone Mineral Density in Korean Population. *Osteoporosis International*; 15(8): 639-44.
- Stachura M, Olchowik G. 2008. Selected aspects of osteoporosis prevention. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research* 2(1): 13-18.
- Utian WH, Bachmann GA, Cahill BE, Gallagher C, Grodstein F, Heiman JR, Henderson VW, Hodis HN, Karas RH, Manson JE, Reid RL, Santen RJ, Schmidt PJ, Stuenkel CA, Waxman NJ, Wysocki S. 2010. Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: position statement of the North American Menopause Society. *Menopause* 17 (2): 242-255.