

Respon Tulang Femur Tikus Osteoporosis yang Mengonsumsi Calcitriol

Response of Femur Bone in Osteoporosis Rats Consuming Calcitriol

Hartiningih*, Devita Anggraeni

Departemen Ilmu Bedah dan Radiologi, Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
*E-mail: hartiningih56@yahoo.com

Naskah diterima : 27 Oktober 2016, direvisi : 9 Januari 2018, disetujui : 30 Mei 2018

Abstract

Calcitriol supplementation in ovariectomized rats decreased bone resorption and increased bone formation, however, it depend on dose. The objective of the research was to study the response of femur bone in osteoporosis rats consuming *calcitriol*. Thirty female *Wistar* rats at 8 weeks of age were randomly divided into six groups (sham operated rats as normal control rats/group N and NK, ovariectomized control rats/group Ov and OvK, ovariectomized rats/group OvD and OvE) of five each. All rats were fed standard diet for 8 weeks. At 16 weeks of age, group N and Ov were euthanized, the right femur were taken for histopathological examination. Group NK and OvK were fed standard diet, group OvD was fed standard diet +40ng *calcitriol*; and group OvE was fed standard diet+25µg *ethynil ethyl estradiol*. Treatments were done for six weeks. At the end of study, blood samples were taken from plexus orbitalis medialis for estrogen analysis. All rats were euthanized using ketamine 10% and xylazine 2%. Right femur was taken for histopathological examination using hematoxylin and eosin stain, and immunohistochemistry using monoclonal antibody anti TRAP5b which was detected with streptavidin-biotin. The results showed that estradiol level of the rats in group OvD was not significantly different compared with the rats in OvK group, however, it was significantly lower compared to the rats in group OvE. Histopathologic figure of right distal femur metaphysis in group OvD was shown lesser adipocyte in the bone marrow and more trabecular bone speculum compared to group OvK, however, there was more adipocyte in the bone marrow and lesser trabecular bone speculum compared to group OvE. Immunohistochemistry of distal femur metaphysis in group OvD and OvE were revealed *tartrate resistant alkaline phosphatase 5b* (TRAP5b) expression in trabecular bone, which was located in bone marrow space and trabecular speculum surface as well. Based on the results, it can be concluded that calcitriol 40ng/day supplementation in osteoporosis rats for 6 weeks decreased bone resorption and increased bone formation distal femur metaphysis.

Key words : Calcitriol, femur bone, osteoporosis

Abstrak

Suplementasi *calcitriol* pada tikus ovariektomi menurunkan resorpsi tulang dan meningkatkan pembentukan tulang tergantung dosis. Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji respon tulang femur tikus osteoporosis yang mengonsumsi *calcitriol*. Tiga puluh tikus *Wistar* betina umur 8 minggu, dibagi 6 kelompok (ovariektomi semu sebagai kontrol normal/N dan NK, kontrol ovariektom /Ov dan OvK dan ovariektomi/OvD dan OvE), masing-masing 5 tikus. Semua tikus diberi pakan standar selama 8 minggu. Untuk peneguhan status osteoporosis, pada umur 16 minggu, tikus kelompok N dan Ov dietanasi, tulang femur kanan diambil untuk pemeriksaan histopatologis. Tikus kelompok NK dan OvK diberi pakan standar, sedangkan tikus kelompok OvD diberi pakan standar +40ng *calcitriol*, dan tikus OvE diberi pakan standar + 25µg *ethynil ethyl estradiol* selama 6 minggu. Pada akhir perlakuan, darah diambil melalui pleksus retroorbitalis medialis untuk pemeriksaan estrogen, selanjutnya tikus dietanasi dengan campuran xylazine 2% dan ketamin 10%. Femur kanan diambil untuk pemeriksaan histopatologis menggunakan pengecatan hematoxylin dan eosin, dan pemeriksaan immunohistokimia *tartrate resistant acid phosphatase 5b* (TRAP5b) menggunakan antibodi monoklonal anti-TRAP5b dan dideteksi dengan streptavidin-biotin. Hasil analisis konsentrasi estradiol tikus OvD tidak berbeda dengan tikus OvK, namun lebih rendah signifikan dibanding tikus OvE. Hasil pemeriksaan histopatologis metafisis tulang femur distalis tikus OvD terlihat mempunyai lebih sedikit jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang dan lebih banyak spikulum trabekula dibanding tikus OvK, namun terlihat mempunyai lebih banyak jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang dan sedikit spikulum trabekula dibanding tikus OvE. Hasil pemeriksaan immunohistokimia metafisis tulang femur distalis tikus OvD dan OvE terlihat ekspresi TRAP5b pada tulang trabekula antar rongga sumsum tulang dan pada permukaan spikulum trabekula. Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa *calcitriol* 40 ng/hari selama 6 minggu pada tikus osteoporosis menurunkan resorpsi tulang dan meningkatkan pembentukan metafisis tulang femur distalis.

Kata kunci : Calcitriol, osteoporosis, tulang femur

Pendahuluan

Osteoporosis terjadi karena ketidakseimbangan antara resorpsi tulang oleh osteoklas dengan pembentukan tulang oleh osteoblas (Strait *et al.*, 2008; Karsdal *et al.*, 2007; Seeman *et al.*, 2006; Martin dan Sims, 2005). Rendahnya estrogen karena faktor alami atau akibat pembedahan dengan cara operasi pengambilan ovarium memicu ketidakseimbangan antara resorpsi dengan pembentukan tulang. Rendahnya estrogen menjadi inisiator potensial osteoklas untuk meningkatkan resorpsi tulang (Mirkin dan Pickar, 2013). Estrogen berperan meningkatkan pembentukan tulang dan menurunkan resorpsi tulang (Shuid *et al.*, 2011), dan mengaktivasi vitamin D₃ (1,25-dihidroksivitamin D₃) (Raisz, 2005). Terapi sulih hormon menggunakan hormon estrogen dapat menghambat resorpsi tulang, meningkatkan densitas tulang, dan menurunkan risiko fraktur tulang (Bowring dan Francis, 2011; Ribot dan Tremolieres, 2006; Boyce *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2004), namun meningkatkan risiko kanker ovarium, endometrium dan kelenjar mammae (Zarate *et al.*, 2014; Hartiningsih dan Anggraeni, 2013; Messina dan Wood, 2008; Udell *et al.*, 2006; Raisz, 2005).

Suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ memicu pembentukan tulang (Chang *et al.*, 2013; Anderson *et al.*, 2006; Hendy *et al.*, 2006), namun juga meningkatkan resorpsi tulang (Chang *et al.*, 2013). Suplemen *calcitriol* 8 ng/tikus selama 6 minggu menurunkan estrogen dan menyebabkan osteoporosis yang ditandai meningkatnya resorpsi tulang dan menurunnya pembentukan tulang metafisis tulang femur proksimalis tikus ovariektomi (Hartiningsih *et al.*, 2012). Suplemen *calcitriol* 20 ng selama 8 minggu pada tikus ovariektomi juga menurunkan estrogen, namun menurunkan resorpsi tulang dan meningkatkan pembentukan tulang epifisis tulang femur distalis dibanding tikus ovariektomi tanpa suplemen *calcitriol* (Hartiningsih dan Anggraeni,

2016). Bagaimana respon tulang tikus ovariektomi osteoporosis yang mengkonsumsi suplemen *calcitriol* 40 ng/tikus selama 6 minggu belum pernah dilaporkan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengkaji respon tulang tikus osteoporosis melalui pemeriksaan aktivitas resorpsi dan pembentukan tulang. Sebagai parameter aktivitas resorpsi tulang dilakukan pemeriksaan jaringan adiposit secara histopatologis dan ekspresi TRAP5b menggunakan teknik immunohistokimia pada tulang femur, sedangkan parameter aktivitas pembentukan tulang dilakukan pemeriksaan spikulum trabekula tulang secara histopatologis. Penggunaan suplemen *calcitriol* 40 ng diharapkan dapat bermanfaat untuk menangani osteoporosis, menyebabkan terjadinya keseimbangan antara aktivitas resorpsi tulang dengan pembentukan tulang individu osteoporosis.

Materi dan Metode

Dalam penelitian ini digunakan 30 tikus Wistar betina umur 8 minggu, diberi pakan standar yang mempunyai kandungan protein 20%, Ca 0,6%, P 0,4% dengan komposisi pakan (g/100 g pakan) terdiri dari 78% jagung, 20% ikan teri tawar, 0,3% CaCO₃, 0,7% molase, dan 1,0% vitamin mineral (Hartiningsih dan Anggraeni, 2016). Tikus ditempatkan dalam kandang individu dengan suhu ruang berkisar 22-25°C, diberi pakan standar dan air minum aquabidestilata secara *ad libitum*.

Tahap induksi osteoporosis

Tikus dibagi 6 kelompok (N dan NK, Ov, OvK, OvD, dan OvE). Seminggu pasca adaptasi lingkungan, dilakukan induksi osteoporosis dengan cara operasi ovariektomi (pengambilan ovarium) pada tikus kelompok Ov dan OvK, OvD dan OvE. Operasi ovariektomi seperti yang dilakukan oleh Hartiningsih dan Anggraeni (2016) yaitu dengan membuat sayatan 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 kelompok N dan NK untuk kontrol normal, namun tidak dilakukan pengambilan ovarium (operasi semu). Satu minggu pasca operasi, semua tikus diberi pakan standar selama 8 minggu. Sebagai kontrol terjadi osteoporosis, pada umur 16 minggu atau 8 minggu pasca operasi, tikus N dan Ov dietanasi dengan campuran ketamin 10% dosis 50 mg/kg dan xylazine 2% dosis 5 mg/kg intramuskuler, tulang femur kanan diambil dan difiksasi dalam formalin 10% untuk pemeriksaan histopatologis.

Tahap penanganan osteoporosis

Untuk penanganan osteoporosis, tikus NK dan OvK diberi pakan standar, tikus OvD diberi pakan standar dan *calcitriol* 40ng/tikus/hari secara oral, dan OvE diberi pakan standar dan *ethynil ethyl estradiol* 25µg/tikus/hari secara oral selama 6 minggu.

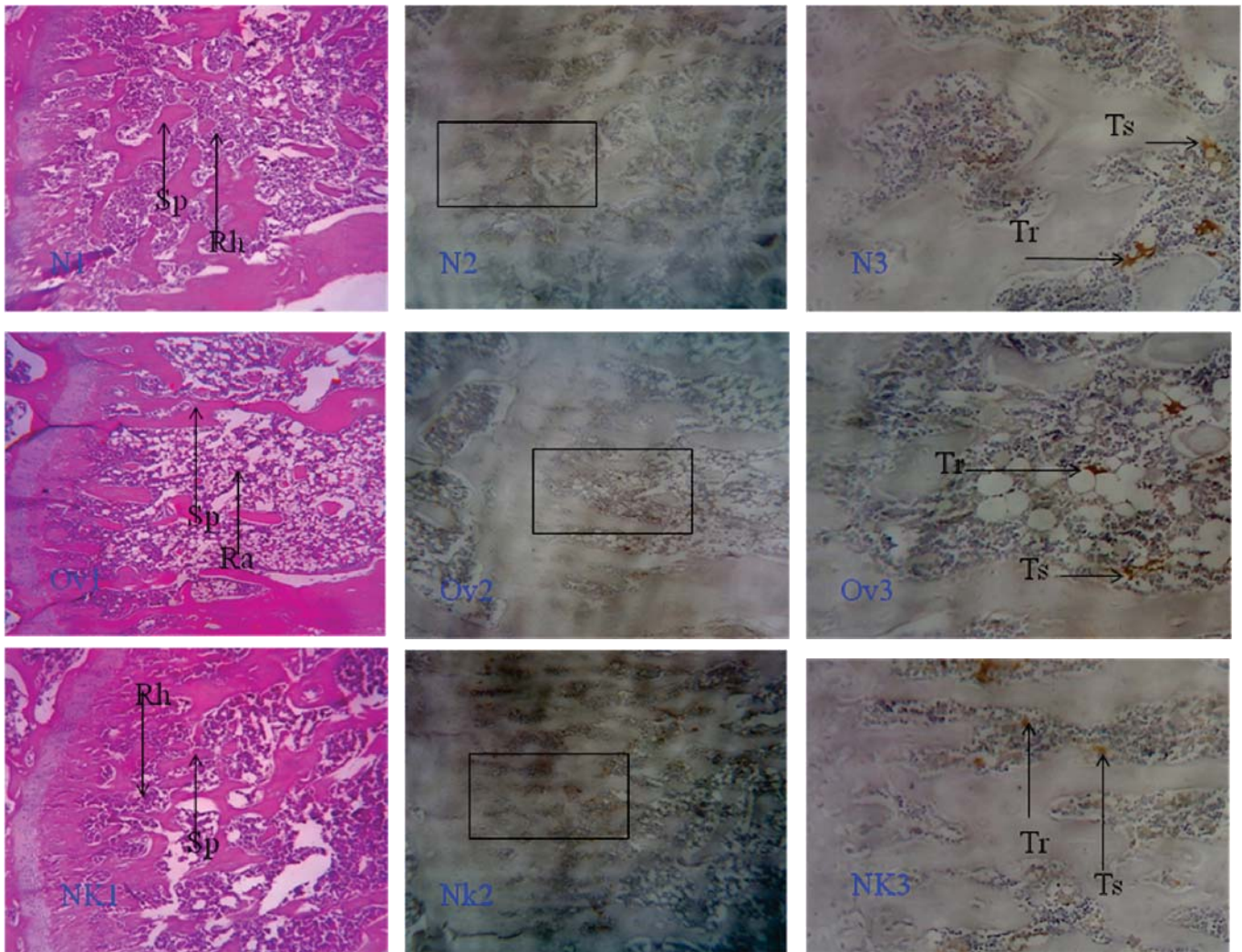
Pada akhir perlakuan, seperti yang dilakukan oleh Hartiningsih dan Anggraeni (2016), tikus dianestesi dengan campuran ketamin 10% dosis 50 mg/kg dan xylazine 2% dosis 5 mg/kg intramuskuler, darah diambil melalui pleksus retroorbitalis untuk pemeriksaan estrogen, selanjutnya tikus dietanasi dengan campuran ketamin 10% dosis 50 mg/kg dan xylazine 2% dosis 5 mg/kg intramuskuler. Tulang femur kanan diambil dan difiksasi dalam formalin 10% untuk pemeriksaan histopatologis dan pemeriksaan immunohistokimia *tartrate resistant acid phosphatase 5b* (TRAP5b), menggunakan monoklonal antibodi anti TRAP5b (BioLegend, San Diego), dan dideteksi menggunakan streptavidin-biotin (Histostain-SP Kits, Invitrogen Ltd, UK). Estrogen diperiksa dengan ELISA (Omega Diagnostic LTD, Scotland, United Kingdom).

Data estradiol yang diperoleh dianalisis dengan

ANOVA pola searah yang dilanjutkan dengan uji Duncan's, sedangkan hasil pemeriksaan histopatologis dan pemeriksaan immunohistokimia TRAP5b tulang dianalisis secara diskriptif.

Hasil dan Pembahasan

Histopatologis metafisis tulang femur distalis tikus N dan NK, tikus kontrol normal terlihat mempunyai spikulum trabekula metafisis berbentuk normal, dan rongga sumsum tulang didominasi jaringan hematopoietik (Gambar 1:N1 dan Gambar 2:NK1). Dalam waktu 8 minggu pasca ovariektomi, metafisis tulang femur distalis tikus Ov, tikus ovariektomi menunjukkan osteoporosis yang ditandai pelebaran rongga sumsum tulang, dominasi jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang, penurunan tebal dan jumlah spikulum trabekula (Gambar 1:Ov1) dibanding tikus N (Gambar 1:N1). Dari pemeriksaan immunohistokimia, tikus Ov (Gambar 1: Ov2 dan 1:Ov3) juga terlihat mempunyai sedikit TRAP5b berwarna coklat pada tulang trabekula dalam rongga sumsum tulang dan pada permukaan spikulum trabekula dibanding tikus N (Gambar 1:N2 dan 1:N3). Beberapa peneliti melaporkan bahwa pada perempuan pasca menopause penderita osteoporosis, pada mencit dan tikus ovariektomi tidak hanya meningkatkan akumulasi adiposit, jumlah dan ukuran adiposit dalam rongga sumsum tulang (Hartiningsih dan Anggraeni, 2016; Syed *et al.*, 2008; Benayahu *et al.*, 2000), tetapi juga menyebabkan turunnya spikulum trabekula (Hartiningsih dan Anggraeni, 2016), atau tidak ada struktur trabekula (Syed *et al.*, 2008; Rosen dan Bouxsein, 2006). Beberapa peneliti lain melaporkan bahwa sel stroma dalam rongga sumsum tulang perempuan pasca menopause osteoporosis lebih cenderung mengalami diferensiasi menjadi adiposit dari pada osteoblas (Sekiya *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2000). Dalam penelitian ini, penurunan tebal dan jumlah spikulum trabekula menunjukkan turunnya pembentukan tulang oleh osteoblas.



Gambar 1. Histopatologi metafisis tulang femur distalis tikus kontrol normal N (N1) terlihat rongga sumsum tulang normal dan dominasi jaringan hematopoietik dalam rongga sumsum tulang (Rh), spikulum trabekula normal (Sp), pada tikus ovariektomi Ov (Ov1) terlihat pelebaran rongga sumsum tulang dan dominasi jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang (Ra), sedikit spikulum trabekula (Sp) (Hematoksilin-eosin, 100x.). Bagian metafisis tulang femur distalis tikus kontrol normal N diberi antibodi monoklonal anti *tartrate resistant alkaline phosphatase 5b* (TRAP5b) (N2 dan N3) terlihat TRAP5b positif berwarna coklat pada trabekula tulang dalam rongga sumsum tulang (Tr) dan permukaan spikulum trabekula (Ts) (N2=Streptavidin-biotin, 100x.; N3= Streptavidin-biotin, 250x.). Tikus ovariektomi Ov yang diberi antibodi monoklonal anti *tartrate resistant alkaline phosphatase 5b* (TRAP5b) (Ov2 dan Ov3) terlihat TRAP5b positif berwarna coklat pada trabekula tulang dalam rongga sumsum tulang (Tr) dan permukaan spikulum trabekula (Ts) (Ov2=Streptavidin-biotin, 100x.; Ov3=Streptavidin-biotin, 250x.).

Menurut Justesen *et al.* (2001), Verma *et al.* (2002) dan Manolagas (2002) meningkatnya apoptosis osteoblas dan lebih tingginya konversi sel stroma menjadi adiposit dibanding menjadi osteoblas menurunkan pembentukan tulang dan menurunkan jumlah spikulum trabekula. Lebih banyaknya jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang tikus Ov diduga terkait dengan turunnya estrogen tikus Ov. Dilaporkan

Hartiningih dan Anggraeni (2016) bahwa dalam waktu 8 minggu pasca ovariektomi selain menyebabkan turunnya estrogen juga menyebabkan dominasi jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang. Menurut Cooke dan Naaz (2004), dan Riggs *et al.* (2002) estrogen berperan penting dalam mengendalikan osteoblas dan adiposit. Penelitian pada hewan model dan manusia menunjukkan bahwa

turunnya konsentrasi estrogen mengganggu proliferasi dan aktivitas estrogenik dalam sumsum tulang (Rodriguez *et al.*, 1999). Dilaporkan Muruganandan *et al.* (2009), Pittenger *et al.* (1999) dan Aubin and Liu (1996) bahwa osteoblas dan adiposit keduanya berasal dari prekursor sel stem mesenkimal sehingga adanya perubahan atau pergeseran laju diferensiasi, daya hidup atau eliminasi dari salah satu garis keturunan osteoblas atau adiposit akan memicu perubahan rasio antara osteoblas dengan adiposit. Menurut Weisberg *et al.* (2003) adiposit dalam sumsum tulang tidak hanya menekan osteoblastogenesis tetapi juga meningkatkan resorpsi tulang. Dari uraian tersebut memberi gambaran bahwa dalam waktu 8 minggu pasca ovariektomi terjadi peningkatan aktivitas resorpsi tulang oleh osteoklas dan penurunan aktivitas pembentukan tulang oleh osteoblas. Sedikitnya ekspresi TRACP5b dalam rongga sumsum tulang tikus Ov diduga terkait dengan turunnya osteoblas sebagai media esensial terbentuknya osteoklas. Mizoguchi *et al.* (2009) melaporkan bahwa osteoblas berperan penting dalam pembentukan osteoklas. Menurut Cohen (2006), Pixley dan Stanley (2004), dan Lotze dan Hamilton (2003) *macrophage colony-stimulating factor* (MCSF) yang diekspresikan osteoblas merupakan faktor esensial pada tahap awal osteoklastogenesis, berperan sebagai pemacu proliferasi awal prekursor osteoklas, daya bertahan hidup dan diferensiasi prekursor osteoklas. Beberapa peneliti melaporkan bahwa sejak terjadi proses diferensiasi, precursor osteoklas mengekspresikan

TRACP5b (Janckila *et al.*, 2000; Halleen *et al.*, 2001; Vaananen *et al.*, 2000).

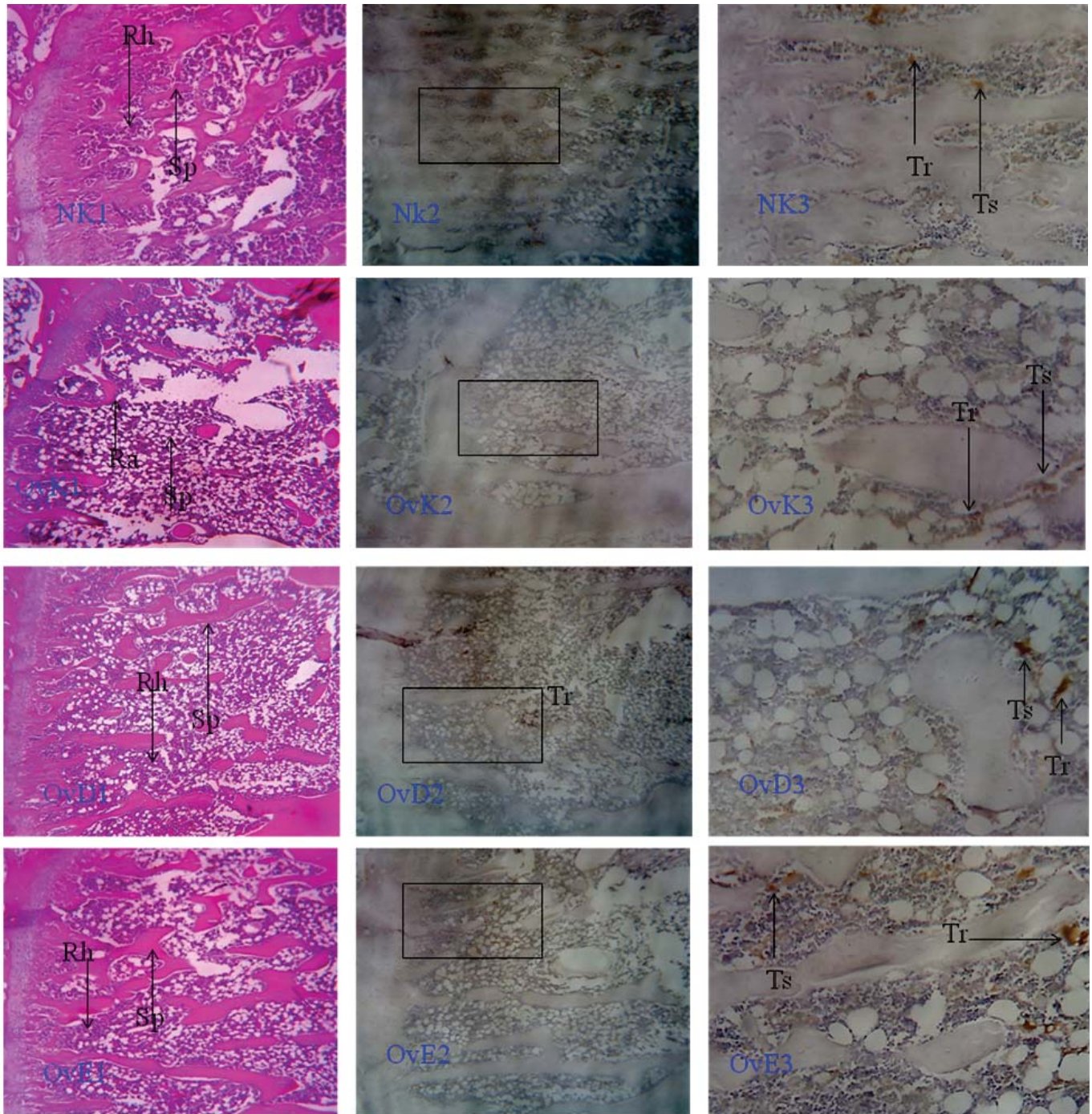
Dalam waktu 14 minggu pasca ovariektomi, histopatologis metafisis tulang femur distalis tikus OvK (Gambar 2:OvK1) terlihat mempunyai lebih banyak jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang, rongga sumsum tulang lebih luas dan lebih sedikit spikulum tulang trabekula dibanding tikus Ov (Gambar 1:Ov1). Dari pemeriksaan immunohistokimia, tikus OvK (Gambar 2:OvK2 dan 2:OvK3) juga terlihat mempunyai sedikit TRAP5b berwarna coklat pada tulang trabekula dalam rongga sumsum tulang dan pada permukaan spikulum tulang trabekula dibanding tikus Ov (Gambar 1:Ov2 dan 1:Ov3). Dalam penelitian ini, dominasi jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang tikus OvK juga diduga terkait dengan lebih rendahnya konsentrasi estrogen (Tabel 1). Dominasi jaringan adiposit rongga sumsum tulang dan lebih luasnya rongga sumsum tulang memberi gambaran tingginya aktivitas resorpsi tulang. Sedikitnya spikulum trabekula memberi gambaran turunnya osteoblas dan aktivitas pembentukan tulang oleh osteoblas. Dalam penelitian ini sedikitnya ekspresi TRACP5b dalam rongga sumsum tulang tikus OvK juga diduga terkait dengan turunnya osteoblas sebagai media esensial terbentuknya osteoklas. Dari uraian tersebut di atas memberi gambaran bahwa dalam waktu 14 minggu pasca ovariektomi, tikus osteoporosis tanpa diberi suplemen menurunkan estrogen, terjadi peningkatan aktivitas resorpsi tulang dan penurunan aktivitas pembentukan tulang.

Tabel 1. Rerata konsentrasi estradiol (pg/ml) pada tikus *Wistar* betina selama penanganan osteoporosis.

Kelompok	Kontrol NK	Ovariektomi OvK	Ovariektomi+ estradiol OvE	Ovariektomi+ calcitriol OvD
Konsentrasi estradiol	13,78±1,85 ^a	11.31±0,91 ^b	14.82±2,06 ^c	11, 79±1,93 ^b

Keterangan :

Angka dalam baris yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda signifikan ($p > 0.05$)



Gambar 2. Histopatologi metafisis tulang femur distalis tikus normal (NK1) terlihat rongga sumsum tulang normal dan dominasi jaringan hematopoietik dalam rongga sumsum tulang (Rh), spikulum trabekula normal (Sp), pada tikus osteoporosis (OvK1) terlihat pelebaran rongga sumsum tulang dan dominasi jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang (Ra), sedikit spikulum trabekula (Sp) (Hematoksilin-eosin, 100x.). Histopatologi metafisis tulang femur distalis tikus osteoporosis yang diberi suplemen *calcitriol* (OvD1) dan tikus osteoporosis yang diberi suplemen *ethinil ethyl estradiol* (OvE1) terlihat lebih banyak jaringan hematopoietik dalam rongga sumsum tulang (Rh), lebih banyak spikulum trabekula (Sp) (Hematoksilin-eosin, 100x.). Metafisis tulang femur distalis yang diberi antibodi monoklonal anti *tartrate resistant alkaline phosphatase 5b* (TRAP5b) pada tikus normal (NK2 dan NK3), tikus osteoporosis OvK (OvK2 dan OvK3), tikus OvD (OvD2 dan OvD3), dan tikus OVE (OvE2 dan OvE3) terlihat TRAP5b positif berwarna coklat pada trabekula tulang dalam rongga sumsum tulang (Tr) dan permukaan spikulum trabekula (Ts) (NK2, OvK2, OvD2, dan OvE2=Streptavidin-biotin, 100x.; NK3, OvK3, OvD3 dan OvE3= Streptavidin-biotin, 250x.).

Histopatologis metafisis tulang femur distalis tikus OvE (Gambar 2: OvE1) terlihat mempunyai lebih banyak spikulum tulang trabekula, dan mempunyai lebih sedikit jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang dibanding tikus OvK. Pada pemeriksaan immunohistokimia metafisis tulang femur distalis tikus OvE terlihat ekspresi TRAP5b pada tulang trabekula antar rongga sumsum tulang dan pada permukaan spikulum trabekula (Gambar 2: OvE2 dan Gambar 2: OvE3). Lebih tingginya estrogen tikus OvE dibanding tikus OvK (Tabel 1) diduga menjadi penyebab lebih sedikitnya jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang akibat lebih tingginya konversi sel stroma menjadi osteoblas dibanding menjadi adiposit yang memberi gambaran meningkatnya aktivitas pembentukan tulang yang ditandai lebih banyaknya spikulum trabekula dan menyebabkan luas rongga sumsum tulang mendekati normal. Sedikitnya jaringan adiposit juga memberi gambaran turunnya aktivitas resorpsi tulang yang ditandai luas rongga sumsum tulang mendekati normal.

Beberapa peneliti melaporkan bahwa estrogen berperan meningkatkan pembentukan tulang dengan meningkatkan pembentukan osteoblas, diferensiasi, proliferasi, dan fungsi osteoblas, meskipun bervariasi tergantung pada hewan model (Shuid *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 1998). Dilaporkan Chang *et al.* (2013) bahwa estrogen berpengaruh langsung terhadap osteoblas dengan meningkatkan jumlah osteoblas dan memacu osteoblas untuk meningkatkan pembentukan tulang. Shuid *et al.* (2011) juga melaporkan bahwa estradiol menurunkan aktivitas osteoklas untuk meresorpsi tulang. Dari uraian tersebut di atas memberi gambaran bahwa suplementasi estradiol meningkatkan konsentrasi estradiol, menurunkan aktivitas resorpsi tulang dan meningkatkan aktivitas pembentukan tulang. Lebih tingginya estrogen tikus OvE dibanding tikus OvK juga diduga menurunkan aktivitas osteoklas yang ditandai ekspresi TRAP5b tikus OvE mendekati

tikus normal NK. Dilaporkan Hartiningsih dan Anggraeni (2016) bahwa dalam kondisi normal, proses resorpsi tulang oleh osteoklas yang ditandai TRAP5b berwarna coklat pada tulang trabekula antar rongga sumsum tulang dan pada permukaan spikulum trabekula, akan diikuti proses pembentukan tulang oleh osteoblas yang ditandai banyaknya spikulum trabekula.

Histopatologis metafisis tulang femur distalis tikus OvD terlihat mempunyai lebih sedikit jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang dan lebih banyak spikulum trabekula metafisis tulang femur distalis (Gambar 2:OvD1) dibanding tikus OvK (Gambar 2:OvK1), namun terlihat mempunyai lebih banyak jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang dan lebih sedikit spikulum trabekula metafisis tulang femur distalis (Gambar 2:OvD1) dibanding tikus OvE (Gambar 2:OvE1). Pada pemeriksaan immunohistokimia metafisis tulang femur distalis tikus OvD juga terlihat ekspresi TRAP5b pada tulang trabekula antar rongga sumsum tulang dan pada permukaan spikulum trabekula (Gambar 2:OvD2 dan Gambar 2:OvD3). Jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang metafisis tulang femur distalis tikus OvD yang terlihat lebih sedikit dibanding tikus OvK meskipun mempunyai konsentrasi estrogen tidak berbeda dengan tikus OvK memberi gambaran bahwa suplemen *calcitriol* menurunkan konversi sel stroma dalam sumsum tulang menjadi adiposit. Dilaporkan Duque *et al.* (2004) bahwa *calcitriol* menghambat adipogenesis dalam rongga sumsum tulang dengan menurunkan ekspresi *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ). Zhou *et al.* (2006), Kong dan Li (2006), Sun dan Zemel (2004) juga melaporkan bahwa 1,25-dihidroksivitamin D₃ menginduksi apoptosis adipogenesis dan menghambat adipogenesis dalam sel. Dari uraian tersebut memberi gambaran bahwa suplementasi *calcitriol* 40ng/tikus menurunkan aktivitas resorpsi tulang yang ditandai

lebih sedikit jaringan adiposit. Suplemen *calcitriol* juga menyebabkan spikulum trabekula metafisis tulang femur distalis tikus OvD terlihat lebih banyak dibanding tikus OvK, namun terlihat lebih sedikit dibanding tikus OVE. Dilaporkan Chang *et al.* (2013) dan Anderson *et al.* (2006) bahwa suplementasi 1,25-dihidroksivitamin D₃ meningkatkan proliferasi preosteoblas menjadi osteoblas. Menurut Zhou *et al.* (2006) 1,25-dihidroksivitamin D₃ bekerja langsung pada osteoblas untuk meningkatkan pembentukan tulang. Dalam penelitian ini suplementasi *calcitriol* 40ng/tikus juga memicu pembentukan tulang yang ditandai banyaknya spikulum trabekula sesuai yang dilaporkan Chang *et al.* (2013) bahwa suplementasi 1,25-dihidroksivitamin D₃ meningkatkan marker pembentukan tulang osteoklasin dan alkaline fosfatase, dan meningkatkan volume trabekula tulang femur meskipun lebih rendah dibanding tikus yang diberi estradiol. Ekspresi TRAP5b tikus OvD juga memberi gambaran bahwa suplementasi *calcitriol* pada tikus OvD menyebabkan proliferasi preosteoblas menjadi osteoblas sebagai media esensial terbentuknya osteoklas. Dilaporkan Hartiningsih dan Anggraeni (2016) bahwa dalam kondisi normal, selama remodeling tulang terjadi proses keseimbangan antara aktivitas resorpsi tulang oleh osteoklas dengan pembentukan tulang oleh osteoblas.

Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa suplemen *calcitriol* 40ng/tikus/hari selama 6 minggu efektif untuk menangani osteoporosis metafisis tulang femur distalis dengan menurunkan resorpsi tulang dan memicu pembentukan tulang.

Kesimpulan

Hasil penelitian ini disimpulkan bahwa pemberian *calcitriol* 40 ng/hari selama 6 minggu pada tikus osteoporosis menurunkan resorpsi tulang dan meningkatkan pembentukan metafisis tulang femur distalis.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Fakultas Kedokteran Hewan yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Pengembangan Departemen.

Daftar Pustaka

- Alatalo, S.L., Halleen, J.M., Hentunen, T.A., Monkkonen, J., Vaananen, H.K. (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: 1751–4.
- Anderson, G.L., Chlebowski, R.T., Rossouw, J.E. (2006) Prior hormone therapy and breast cancer risk in the women's health initiative randomized trial of estrogen plus progestin. *Maturitas.* 55: 103-115.
- Anderson, G.L., Limacher, M. and Assaf, A.R., *et al.* (2004) Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the women's health initiative randomized controlled trial. *J.A.M.A.* 291: 1701-1712.
- Aubin, J.E., Liu F. (1996) The osteoblast lineage. In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G, editors. Principles of Bone Biology. Academic Press, San Diego, CA. pp. 51–68.
- Benayahu, D., Shur, I., Ben-Eliyahu, S. (2000) Hormonal changes affect the bone and bone marrow cells in a rat model. *J. Cell. Biochem.* 79: 407–415.
- Bowring, C.E. and Francis, R. M. (2011) National osteoporosis society's position statement on hormone replacement therapy in the prevention and treatment of osteoporosis. *Menopause Int.* 17: 63-65.
- Boyce, B.F., Yamashita, T., Yao, Z., Zhang, Q., Li, F., Xing, L. (2005) Role of NF-Kappa β and C-Fos in osteoclast. *J. Bone Miner. Metab.* 23(suppl): 11-15.
- Chang, K.L., Hu, Y.C., Hsieh, B.S., Cheng, H.L., Hsu, H.W., Huang, L.W. and Su, S.J. (2013) Combined effect of soy isoflavones and vitamin D₃ on bone loss in ovariectomized rats. *Nutrition.* 29: 250-257.
- Cohen, M.M. Jr., 2006. The new bone biology: Pathologic, molecular, clinical correlates. *Am. J. Med. Genet.*, A140:2646-2706.
- Cooke, P.S., Naaz, A. (2004) Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp. Biol. Med.* 229: 1127–1135.

- Duque, G., Maconno, M., Kremer, R. (2004) 1,25(OH)2D3 inhibits bone marrow adipogenesis in senescence accelerated mice (SAM-P/6) by decreasing the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 (PPARgamma2). *Exp. Gerontol.* 39: 333-336.
- Halleen, J.M., Ranta, R. (2001) Tartrate-resistant acid phosphatase as a serum marker of bone resorption. *Am. Clin. Lab.* 20: 29-30.
- Halleen, J.M., Alatalo, S.L., Suominen, H., Cheng, S., Janckila, A.J., Vaananen, H.K. (2000) Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* 15: 1337-1345.
- Hartiningsih dan Anggraeni, D. (2013) Kombinasi Calcitriol dan Ethynil 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 mengonsumsi kalsitriol. *Jurnal Kedokteran Hewan.* 6: 92-98.
- Hartiningsih dan Anggraeni, D. (2016) Ekspresi Tartrate-resistant acid phosphatase 5b pada epifisis tulang femur tikus ovariectomi yang mengonsumsi calcitriol dan raloxifene. *Jurnal Veteriner.* 17(1): 102-111.
- Hendy, G.N., Hruska, K.A., Mathew, S., Goltzman, D. (2006) New insights into mineral and skeletal regulation by active forms of vitamin D. *Kidney Int.* 69: 218-223.
- Janckila, A.J., Takahasi, K., Sun, S.Z., Yam, L.T. (2001) Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. *Clin. Chem.* 47: 74-80.
- Justesen, J., Stenderus, K., Ebbesen, E.N., Mosekilde, L., Steinche, T. and Kassem, M. (2001) Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontolog.* 2(3): 165-171.
- Karsdal, M.A., Martin, T.J., Bollerslev, J., Christiansen, C. and Henriksen, K. (2007) Are nonresorbing osteoclasts sources of bone anabolic activity? *J. Bone Miner. Res.* 22: 487-494.
- Kong, J., Li, Y.C. (2006) Molecular mechanism of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.* 290: E916-E924.
- Lotze, M.T. and Hamilton, J.A. (2003) Macrophage colony stimulating factor (CSF-1). In *The cytokine handbook*. A.W. Thomson and M.T. Lotze, editors. Elsevier Science Ltd. London, United Kingdom. 545-573.
- Manolagas, S.C., Kousteni, S. and Jilka, R.L. (2002) Sex steroids and bone. *Recent Prog. Horm. Res.* 57: 385-409.
- Martin, T.J. and Sims, N.A. (2005) Osteoclast derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trend. Mol. Med.* 11: 76-81.
- Messina, M.J. and Wood, C.E. (2008) Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk, analysis and commentary. *Nutr. J.* 7: 17.
- Mirkin, S. and Pickar, J.H. (2013) Management of osteoporosis and menopausal symptoms: focus on bazedoxifenelconjugated estrogen combination. *International Journal of Women Health* 5: 465-475.
- Mizoguchi, T., Muto, a., Udagawa, N., Aebi, A., Yamashita, T., Hosaya, A., Ninomiya, T., Nakamura, H., Yamamoto, Y., Kinugawa, S., Nakamura, M., Nakamichi, Y., Kobayashi, Y., Nagasawa, S. Oda, K., Tanaka, H., Tagaya, M., Penniger, J.M., Ito, M., and Takahashi, N. (2009) Identification of cell-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *J.C.B.* 23: 541-554.
- Muruganandan, S., Roman, A.A. and Sinal, C.J. (2009) Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Cross talk with the osteoblastogenic program. *Journal Cellular and Molecular Life Sciences.* 66(2): 236-253.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. *Science.* 284: 143-147.
- Pixley, F.J. and Stanley, E.R. (2004) CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell. Biol.* 14: 628-638.
- Qu, Q., Perala-Heape, M., Kapanen, A., Dahllund, J., Salo, J., Vaananen, H.K. and Harkonen, P. (1998) Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone.* 22: 201-209.
- Raisz, L.C. (2005) Pathogenesis osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *The Journal of Clinical Investigations.* 115: 3318-3325.
- Ribot, C., Tremollieres, F. (2006) Hormone replacement therapy in the management of postmenopausal osteoporosis and prevention of fracture risk. *Press. Med.* 35: 1557-1563.
- Riggs, B.L., Khosla, S. and Melton, L.J. (2002) Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr. Rev.* 23: 279-302.

- Rodriguez, J.P., Garat, S., Gajardo, H., Pino, A.M., Seitz, G. (1999) Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics. *J. Cell. Biochem.* 75: 414–423.
- Rodriguez, J.P., Montecinos, L., Rios, S., Reyes, P., Martinez, J. (2000) Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. *Cell. Biochem.* 79(4): 557-565.
- Rosen, C.J. and Bouxsein, M.L. (2006) Mechanisms of disease : is osteoporosis the obesity of bone ? *Nature clinical Practice rheumatology.* 2: 35-43.
- Seeman, E., Vellas, B., Benhamou, C., Aquino, J.P., Semler, J., Kaufman, J.M., Hoszowski, K., Varela, A.R., Fiore, C., Brixen, K., Reginster, J.Y. and 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.
- Sekiya, L., Larson, B.L., Vuoristo, J.T., Cui, J.G., Proskop, D.J. (2004) Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *J. Bone Miner. Res.* 19(2): 256-264.
- Shuid, A. N., Ping, L.L., Muhammad, N., Mohamed, N., Soelaiman, I. N. (2011) The effects of *Labsia pumila var. alata* on bone markers and bone calcium in a rat model of post-menopausal osteoporosis. *Journal of Ethnopharmacology.* 133: 538-542.
- Strait, K. Li, Y., Dillehay, D.L. and Weitzmann, M.N. (2008) Suppression of NF-KappaB activation blocks osteoclastic bone resorption during estrogen deficiency. *International Journal of Molecular Medicine.* 21(4): 521-525.
- Sun, X., Zemel, M.B. (2004) Role of uncoupling protein 2 (UCP2) expression and 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in modulating adipocyte apoptosis. *Faseb. J.* 18: 1430–1432.
- Syed, F.A., Oursler, M.J., Hefferan, T.E., Peterson, J.M., Riggs, B.L., and Khosla, S. (2008) Effects of Estrogen Therapy on Bone Marrow Adipocytes in Postmenopausal Osteoporotic Women. *Osteoporos. -Int.* 19(9):1323-1330.
- Udell, J.A., Fischer, M. A., Brookhart, M.A., Solomon, D.H., Choudhry, N.K. (2006) Effects of the women's health initiative on osteoporosis therapy and expenditure in medicaid. *J. Bone Miner. Res.* 21: 765–717.
- Vaananen, H.K., Zhao, H., Mulari, M., Halleen, J.M. (2000) The cell biology of osteoclast function. *J. Cell. Sci.* 113: 377–81.
- Verma, S., Rajaratnam J.H., Denton J., Hoyland J.A. and Byers R.J. (2002) Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. *J. Clin. Pathol.* 55: 693-698.
- Weisberg, S.P, McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L. and Ferrante, A.W. Jr. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112(12): 1785-1808.
- Zarate, A., Hernandez-Valencia, M., Saucedo, R., Basurto, L. And Manuel-Apolinar, L. (2014) Current position about the use of estrogen therapy in women during the menopause period. *Review of Medical Instruments.* 52(1): 66-69.
- Zhou, Y.S., Liu, Y.S. and Tan, J.G. (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.