

KK
KKB
LP 04/12
wld

KESEHATAN

U

LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING



UJI AKTIVITAS ANTI-OSTEOPOROSIS DARI *BARLERIA LUPULINA* DAN KOMBINASI LATIHAN FISIK PADA MENCIT UNTUK MENGHAMBAT PENINGKATAN KETIDAKSEIMBANGAN REMODELING TULANG

Rr. Retno Widyowati, S.Si, Apt., M.Pharm
Dr. Mangestuti Agil, Apt., MS
Dr. Hening Laswati Putra, dr., Sp.RM
Tutik Sri Wahyuni, S.Si, Apt., M.Si

Dibiayai oleh DIPA UNAIR, sesuai dengan Surat Keputusan Ketua LPPM Universitas Airlangga Tentang Pelaksanaan Penelitian Hibah Bersaing Tahun Anggaran 2011 Nomor: 844/H3/KR/2011, Tanggal 20 April 2011

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
OKTOBER 2011**

i

b. Halaman Pengesahan**HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR**

1. Judul Penelitian : Uji Aktivitas Anti-osteoporosis dari *Barleria lupulina* dan Kombinasi Latihan Fisik pada Mencit untuk Menghambat Peningkatan Ketidakseimbangan Remodeling Tulang

2. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : Rr. Retno Widyowati, S.Si, Apt., M.Pharm
 b. Jenis Kelamin : L/ P
 c. NIP : 19770105 200212 2 002
 d. Jabatan Fungsional : Lektor/IIIC
 e. Jabatan Struktural : -
 f. Bidang Keahlian : Fitokimia
 g. Fakultas/Jurusan : Farmasi / Farmakognosi dan Fitokimia
 h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 i. Tim Peneliti

No	Nama dan Gelar Akademik	Bidang Keahlian	Fakultas/ Jurusan	Perguruan Tinggi
1.	Rr. Retno Widyowati, S.Si., Apt., M.Pharm	Fitokimia	Farmasi	Unair
2.	Dr. Mangestuti Agil, Apt., MS	Farmakognosi	Farmasi	Unair
3.	Dr. Hening Laswati Putra, dr., Sp.RM	Orthopedi	Kedokteran	Unair
4.	Tutik Sri Wahyuni, S.Si, Apt., M.Si	Fitokimia	Farmasi	Unair

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 2 tahun
 b. Biaya total yang diusulkan : Rp. 100.000.000,-
 c. Biaya yang disetujui tahun ke-1 : Rp. 35.000.000,-

Surabaya, 18 OCT 2011

Mengetahui,
 Wakil Dekan I Fakultas Farmasi
 Universitas Airlangga,

Dr. Isnaeni, Apt., MS
 NIP.19560113 198203 2 003

Ketua Peneliti,

Rr. Retno Widyowati, S.Si, Apt., M. Pharm
 NIP.19770105 200212 2 002

Mengetahui :
 Ketua Lembaga Penelitian Unair,

Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., MSi
 NIP 19590805 198701 1 001

PRAKATA

Puji syukur ke hadapan Tuhan Yang Maha Esa, bahwa atas berkat dan rahmatNya kami mendapatkan kesempatan untuk melaksanakan Penelitian Hibah Bersaing, yang berjudul: **“UJI AKTIVITAS ANTI-OSTEOPOROSIS DARI *BARLERIA LUPULINA* DAN KOMBINASI LATIHAN FISIK PADA MENCIT UNTUK MENGHAMBAT PENINGKATAN KETIDAKSEIMBANGAN REMODELING TULANG”**. Penelitian tersebut diperlukan untuk memberikan landasan ilmiah pada pemakaian tanaman dari *Barleria lupulina* sebagai obat antiosteoporosis yang sudah berlangsung secara turun temurun di kalangan masyarakat.

Oleh karena itu, maka bersama ini kami menyampaikan ucapan terima kasih atas kesempatan yang sudah kami peroleh kepada:

1. DP2M Dikti atas bantuan dana penelitian Hibah Bersaing sehingga penelitian ini dapat terlaksana
2. Ketua LPPM Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan untuk melakukan penelitian ini
3. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang senantiasa memberikan fasilitas dan kesempatan kepada para staf pengajar untuk melakukan penelitian.

Kami berharap agar hasil penelitian ini bermanfaat bagi pengembangan dunia pengobatan untuk pemberantasan penyakit degeneratif. Pemberantasan penyakit tersebut merupakan persyaratan yang harus dipenuhi bagi tercapainya cita-cita masyarakat Indonesia sehat jasmaniah dan rohaniyah.

Terima kasih.

Ketua Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
A. LAPORAN HASIL PENELITIAN	
RINGKASAN/SUMMARY	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
BAB I.PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	18
BAB IV. METODE PENELITIAN.....	19
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	39
DAFTAR PUSTAKA.....	40
LAMPIRAN	43
B. DRAFT ARTIKEL ILMIAH	47
C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN	59

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. <i>Barleria lupulina</i> Lindl.	5
Gambar 2.2. Proses Pembentukan tulang Prinsip kerja enzim asetilkolinesterase	11
Gambar 4.1. Siklus Menstruasi.....	23
Gambar 4.2. Skema Kerja Grafik	28
Gambar 5.1. Hasil Pengamatan Ulas Vagina Pada Minggu ke-3	30
Gambar 5.2. Hasil Pengamatan Ulas Vagina Pada Minggu ke-5	31
Gambar 5.3. Mencit normal dan osteoporosis	32
Gambar 5.4. Alat treadmill dan kelompok perlakuan dengan treadmill.....	33
Gambar 5.5. Proses pembedahan mencit untuk mendapatkan tulang femurnya	33
Gambar 5.6. Morfologi tulang femur kelompok kontrol negatif	34
Gambar 5.7. Morfologi tulang femur kelompok kontrol positif	35
Gambar 5.8. Morfologi tulang femur kelompok uji I (ekstrak etanol 70% landik)	36
Gambar 5.9. Morfologi tulang femur kelompok uji II (ekstrak etanol 70% landik disertai treadmill latihan fisik)	37

LAMPIRAN

Lampiran 3. Hasil morfologi tulang femur.....	43
---	----

BAB I PENDAHULUAN

Perempuan pascamenopause akan mengalami masa usia tua dengan berbagai masalah kesehatan dampak dari defisiensi estrogen, salah satunya adalah osteoporosis. Osteoporosis merupakan penyakit tulang sistemik yang ditandai oleh penurunan densitas masa tulang dan perburukan mikroarsitektur tulang sehingga tulang menjadi rapuh dan mudah patah (Lee *et al.*, 2004). Dengan meningkatnya usia harapan hidup, maka berbagai penyakit degeneratif dan metabolik, termasuk osteoporosis akan menjadi permasalahan muskuloskeletal yang memerlukan perhatian khusus, terutama di negara-negara berkembang. Sejak dicanangkannya *Bone Joint Decade* (BJD) 2000-2010 osteoporosis menjadi penting, karena selain termasuk dalam 5 besar masalah kelainan muskuloskeletal yang harus ditangani, juga kasusnya semakin meningkat sejalan dengan peningkatan jumlah usia tua.

Pada tahun 2020 diperkirakan jumlah perempuan yang hidup dalam usia menopause di Indonesia mencapai 30,3 juta orang, lebih kurang 35% menderita osteoporosis dan 50% osteopenia (Baziad, 2003). Prevalensi osteoporosis perempuan pascamenopause di Surabaya menurut penelitian Djoko Roeshadi pada tahun 1996 adalah 26% sedikit lebih rendah daripada di Amerika (30%). Masa tulang periode puncak populasi di Surabaya terjadi pada usia 30-34 tahun dan rata-rata kehilangan masa tulang pascamenopause adalah 1,4% per tahun. Penelitian yang dilakukan di klinik Reumatologi RSCM mendapatkan hasil bahwa faktor resiko osteoporosis yang meliputi usia, lamanya menopause dan kadar estrogen yang rendah, sedangkan faktor

proteksinya adalah kadar estrogen yang tinggi, riwayat berat badan lebih atau obesitas dan latihan yang teratur.

Upaya penanganan osteoporosis lebih menekankan peran serta masyarakat dengan meningkatkan kesadaran masyarakat terhadap masalah osteoporosis, manajemen faktor resiko, deteksi osteoporosis dan monitor berkala resiko fraktur. Salah satu faktor resiko osteoporosis yang dapat dimodifikasi adalah inaktifitas (*sedentary lifestyle*) yang dapat mempercepat penurunan masa tulang (Balbona, 2000; Downey & Weissman, 2001).

Defisiensi estrogen pada masa pascamenopause merupakan salah satu faktor terpenting penyebab peningkatan kecepatan ketidakseimbangan remodeling tulang (Manolagas, 2000; Tobias, 2003) karena defisiensi estrogen menimbulkan perubahan keseimbangan aktivitas sitokin proinflamasi yang mengakibatkan peningkatan resorpsi tulang (Pacifi, 1996), serta gangguan fungsi osteoblas akibat termostat homeostasis tulang yang menjadi tidak responsif terhadap stimulasi pembebanan mekanik sehingga terjadi penurunan pembentukan tulang (Riggs *et al.*, 2002; Lanyon *et.al.*, 2004). Percobaan *in vivo* pada mencit $E\alpha$ KO (*estrogen receptor alpha knock out*) membuktikan peran $E\alpha$ dalam regulasi respon adaptif tulang terhadap pembebanan mekanik (Lee & Lanyon, 2004), sedangkan jumlah dan fungsi ER atau keduanya selain dipengaruhi kadar hormon estrogen (Tobias, 2003; Lee & Lanyon, 2004) juga dipengaruhi pembebanan mekanik yang dibuktikan dengan peningkatan jumlah $E\alpha$ mRNA pada otot gastroknemius tikus betina yang mendapat latihan *endurance* (Lemoine *et al.*, 2002). Fungsi estrogen pada tulang untuk regulasi proliferasi dan diferensiasi osteoblas, sintesa matriks protein tulang dan mempertahankan lama hidup osteosit melalui $E\alpha$ yang penting perannya dalam reaksi respon transkripsi gen

sehingga jumlah dan atau fungsi $E_{1\alpha}$ akan mempengaruhi fungsi osteoblas yang dibuktikan dengan percobaan *in vitro* pada sel kultur osteoblas yang ditransfeksi dengan $E_{1\alpha}$ (Zaman *et al.*, 2000) dan percobaan *in vivo* mencit $E_{1\alpha}$ (Lanyon *et. al.*, 2004).

Selain terapi estrogen, latihan fisik merupakan cara pencegahan osteoporosis yang murah, mudah dilaksanakan, tidak memberikan efek samping seperti pada pemakaian obat dan memberikan banyak manfaat seperti meningkatkan *endurance*, kekuatan otot, kelenturan, koordinasi dan keseimbangan. Percobaan pada hewan coba tikus yang mendapat stimulasi mekanik dengan intensitas rendah dan frekuensi tinggi menunjukkan efek anabolik pada jaringan tulang proksimal tibia (Rubin *et al.*, 2001). Telah dilaporkan bahwa pada perempuan pascamenopause yang mendapat latihan *high-impact* dan terapi sulih hormon menunjukkan efek lokal pada masa tulang dan distribusi masa tulang (Cheng *et al.*, 2002), sedangkan kombinasi latihan *endurance* dan terapi sulih hormon menunjukkan respon peningkatan secara bermakna GH (*growth hormone*), DHEA (*dehydroepiandrosterone*) dan kortisol sebagai efek sinergistik latihan dan terapi sulih hormon (Copeland & Tremblay, 2004). Chilibeck melaporkan bahwa untuk meningkatkan masa tulang, intervensi kombinasi terapi sulih hormon dan latihan fisik lebih efektif daripada bukan kombinasi (Chilibeck, 2004). Telah dilaporkan juga bahwa kombinasi latihan fisik pembebanan aksial dan konsumsi daun semanggi dapat menghambat peningkatan kecepatan ketidakseimbangan remodeling tulang pada perempuan pascamenopause (Laswati, 2007).

Upaya penanggulangan penyakit osteoporosis terus dilakukan terutama pencarian obat anti-osteoporosis baru. Saat ini trend pengobatan masyarakat mengarah pada bahan alam atau *back to nature*. Pengobatan dengan bahan alam dipercaya masyarakat memiliki efek samping lebih ringan dan relatif mudah

didapat di pasaran. Indonesia memiliki lebih kurang 30.000 jenis tanaman obat, namun hanya 1000 jenis tanaman yang telah dimanfaatkan oleh masyarakat dalam upaya penyembuhan dan pencegahan suatu penyakit, peningkatan daya tahan tubuh dan pengembalian kesegaran tubuh (Pramono, 2007). Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan skrining dari 32 tanaman Indonesia terhadap aktivitas dari alkaline fosfatase (ALP) sebagai marker dari diferensiasi osteoblas dan diperoleh hasil bahwa *Barleria lupulina*, *Graptophyllum pictum*, dan *Spilanthes acmella* menstimulasi aktivitas ALP sebesar 139%, 128% dan 169% (Retno, 2009a). Fraksi butanol dan air dari ketiga tanaman tersebut juga mampu menstimulasi aktivitas ALP (Retno, 2009a; Retno, 2009b). ALP mempunyai peran dalam proses mineralisasi EMC (*extracellular matrix*) yang mengatur regulasi konsentrasi ekstraseluler dari senyawa fosfor. Dimana enzim ini akan mengkatalisis ester monofosfat yang berada di dalam membran plasma menjadi *phosphatidyl-glycolipid anchor* yang akan mempengaruhi proses pembentukan masa tulang kembali (Franceschi, 1990).

Barleria lupulina mengandung banyak senyawa golongan iridoid glikosida yang berpotensi digunakan untuk pengobatan osteoporosis karena mampu meningkatkan pembentukan masa tulang (formasi tulang) dengan menstimulasi aktivitas dari enzim alkaline fosfatase (Retno, 2009a), namun sejauh ini belum ada laporan tentang uji aktivitas *in vivo* sebagai anti-osteoporosis dari tanaman ini. Oleh karena itu pada penelitian ini akan dilakukan penelitian terhadap efek pemberian ekstrak etanol 70% *Barleria lupulina* dengan kombinasi latihan fisik pada mencit untuk mengetahui kemampuan kombinasi keduanya dalam menghambat peningkatan ketidakseimbangan proses remodeling tulang.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan tentang *Barleria lupulina*

Tanaman *Barleria lupulina* termasuk dalam famili *Acanthaceae*, dan memiliki nama daerah landik. Tanaman ini dicirikan dengan bentuk daunnya yang sempit, hijau gelap dengan vena yang menonjol keluar dan mempunyai daun bentuk lilin yang berwarna kuning.



Gambar 2.1. *Barleria lupulina* Lindl.

2.1.1. Kegunaan tanaman

Daun landik di Indonesia biasa digunakan untuk terapi diare, tonik, demam, rematik, penyakit liver, gangguan pencernaan, konstipasi, penyakit kuning, infeksi saluran kencing, luka, kudis yang menular, dan anti-inflamasi (PT.Eisai, 1995). Di Thailand, tanaman ini secara tradisional digunakan untuk gangguan mental, diabetes, rematik dan gigitan ular. Dan di India, tanaman ini digunakan untuk terapi penyakit diabetes (Suba, 2004).

2.1.2. Kandungan tanaman

Kandungan kimia dari tanaman landik adalah iridoid glikosida, fenilpropanoid glikosida, lignin, alifatik glikosida dan bezil alkohol (Kanchanapoom, *et.al.*, 2001; Suksamran, *et.al.* 1986; Tuntiwachwuttikul, *et.al.* 1998). Retno telah berhasil melakukan isolasi 13 senyawa iridoid glikosida (8-*O*-acetylpoliimidic acid, 6-*O*-*p*-methoxy-*cis*-cinnamoyl-8-*O*-acetylshanzhiside, 6-*O*-*p*-methoxy-*trans*-cinnamoyl-8-*O*-acetylshanzhiside, shanshiside, shanzhiside methyl ester, 8-*O*-acetylshanzhiside, 8-*O*-acetylshanzhiside methyl ester (barlerin), ipolamiide, 6-*O*-acetylshanzhiside methyl ester, ipolamiidoside, 6,8-*O*,*O*-diacetylshanzhiside methyl ester (acetylbarlerin), 6-*O*-*cis*-*p*-coumaroyl-8-*O*-acetylshanzhiside methyl ester, and 6-*O*-*trans*-*p*-coumaroyl-8-*O*-acetylshanzhiside methyl ester) dari ekstrak etanol 70% daun landik (Retno, 2009)

2.1.3. Studi pendahuluan yang telah dilakukan terhadap *Barleria lupulina*

Penelitian pendahuluan yang telah dilakukan terhadap kandungan dan aktivitas dari landik (*Barleria lupulina*) adalah :

- a. Suksamran, 1986 telah melakukan uji aktivitas anti-inflamasi dari senyawa iridoid glikosida dari *Barleria lupulina*.
- b. Bryne, 1987 dan Tuntiwachwuttikul, 1998 telah melakukan isolasi senyawa iridoid glucosida dari *Barleria lupulina*.
- c. Yoosok, 1999 telah melakukan penelitian terhadap anti-HSV-2 dari landik (*Barleria lupulina*)
- d. Kanchanapoom, 2001 telah berhasil melakukan isolasi senyawa golongan fenilpropanoid glikosida, lignan glikosida, alifatik glikosida dan benzil alkohol glikosida dari landik (*Barleria lupulina*).

- e. Suba, 2002 telah melakukan uji aktivitas CNS dari landik (*Barleria lupulina*).
- f. Suba, 2004 telah melakukan penelitian terhadap aktivitas anti-diabetes dari landik (*Barleria lupulina*) dari India yang mempunyai nama lokal 'Vishellakarani.'
- g. Suba, 2004 telah melakukan penelitian terhadap aktivitas mukosa lambung tikus dan aktivitas ulcerogenik dari ekstrak landik (*Barleria lupulina*)
- h. Suba, 2005 telah mengevaluasi aktivitas anti-inflamasi dari ekstrak metanol landik (*Barleria lupulina*) pada tikus baik secara akut maupun sub akut.
- i. Chomnawang, 2005 telah melakukan uji aktivitas anti-mikroba dari ekstrak landik (*Barleria lupulina*) terhadap etiologi dari *Acne vulgaris*.
- j. Wanikiat, 2008 telah melakukan penelitian dari ekstrak daun landik (*Barleria lupulina*) terhadap aktivitas anti-inflamasi untuk penyakit karena sengatan serangga, alergi, herpes dan virus *varicella zoster*.
- k. Retno, 2009 telah melakukan isolasi senyawa iridoid glikosida dari ekstrak etanol 70% daun landik (*Barleria lupulina*) dan melakukan uji aktivitas terhadap alkaline fosfatase sebagai marker dari sel osteoblast

2.2. Tinjauan Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian sehingga memenuhi baku yang ditetapkan. Sebagian besar ekstrak dibuat dengan mengekstraksi bahan baku secara perkolasi. Seluruh

perkolat biasanya dipekatkan dengan cara destilasi dengan pengurangan tekanan agar bahan sesedikit mungkin terkena panas (Depkes. RI, 2000).

Cairan atau pelarut dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan berkhasiat atau yang aktif, dengan demikian senyawa tersebut dapat terpisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya, serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa yang diinginkan. Dalam hal ekstrak total, maka cairan pelarut yang dipilih yang melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung. Faktor utama pemilihan penyari adalah sebagai berikut: selektivitas, kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut, ekonomis, ramah lingkungan dan aman.

Cara dingin

1. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada kesetimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinyu (terus-menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah maserasi pertama dan seterusnya.

2. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (exhaustive extraction) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak perkolat yang jumlahnya 1-5 kali bahan.

Cara panas

1. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendinginan balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sebanyak 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna.

2. Soxhlet

Soxhlet adalah suatu metode ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinyu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

3. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50 °C.

4. Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98 °C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

5. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama (≤ 30 °C) dan temperatur sampai titik didih air (Depkes RI, 2000).

3.3. Tinjauan tentang osteoporosis

Osteoporosis adalah penyakit metabolisme tulang yang cirinya adalah pengurangan massa tulang dan kemunduran mikroarsitektur tulang sehingga meningkatkan resiko fraktur oleh karena fragilitas tulang meningkat (Jennifer, 2008).

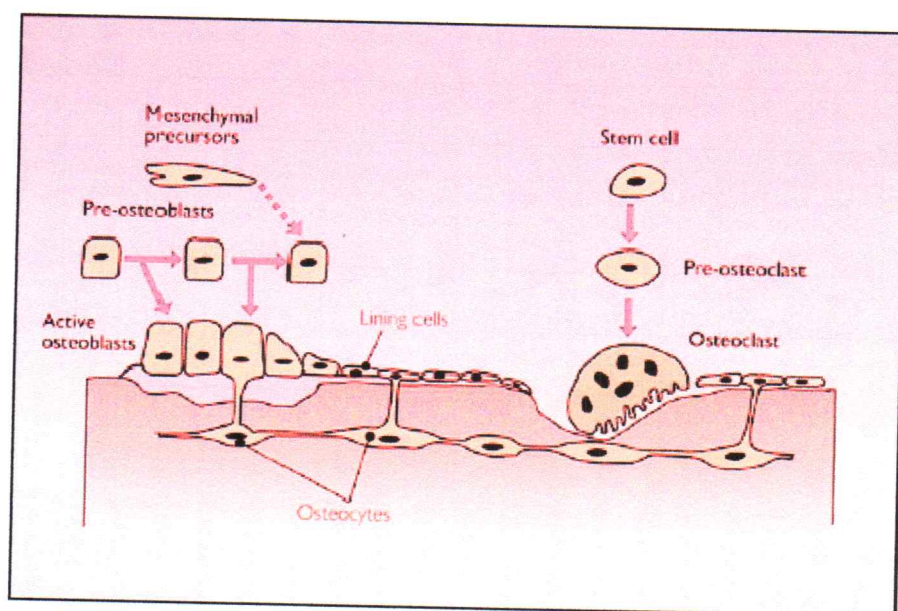
Insiden osteoporosis lebih tinggi pada wanita dibandingkan laki-laki dan merupakan masalah pada wanita pascamenopause. Osteoporosis di klinik menjadi penting karena masalah fraktur tulang, baik fraktur yang disertai trauma yang jelas maupun fraktur yang terjadi tanpa disertai trauma yang jelas.

Penelitian Roeshadi di Jawa Timur, mendapatkan bahwa puncak massa tulang dicapai pada usia 30-34 tahun dan rata-rata kehilangan massa tulang pasca menopause adalah 1,4% per tahun. Penelitian yang dilakukan di klinik Reumatologi RSCM mendapatkan faktor resiko osteoporosis yang meliputi usia, lamanya menopause dan kadar estrogen yang rendah, sedangkan faktor proteksinya adalah kadar estrogen yang tinggi, riwayat berat badan lebih atau obesitas dan latihan yang teratur.

Ada 2 penyebab utama osteoporosis, yaitu pembentukan massa puncak tulang yang kurang baik selama masa pertumbuhan dan meningkatnya pengurangan massa tulang setelah menopause. Massa tulang meningkat secara konstan dan mencapai puncak sampai usia 40 tahun, pada wanita lebih muda sekitar 30-35 tahun. Walaupun demikian tulang yang hidup tidak pernah beristirahat dan akan selalu mengadakan *remodelling* dan memperbaharui cadangan mineralnya sepanjang garis beban mekanik. Faktor pengatur formasi dan resorpsi tulang dilaksanakan melalui 2 proses yang selalu berada dalam keadaan seimbang dan disebut *coupling*. Proses *coupling* ini memungkinkan aktivitas formasi tulang sebanding dengan aktivitas resorpsi tulang.

Proses ini berlangsung 12 minggu pada orang muda dan 16-20 minggu pada usia menengah atau lanjut. *Remodelling rate* adalah 2-10% massa skelet per tahun.

Remodeling tulang adalah proses regenerasi tulang dengan mengganti secara periodik tulang tua dengan tulang baru pada lokasi yang sama (Manolagas, 2000). Proses *remodelling* ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu faktor lokal yang menyebabkan terjadinya satu rangkaian kejadian pada konsep *Activation – Resorption – Formation* (ARF). Proses ini dipengaruhi oleh protein mitogenik yang berasal dari tulang yang merangsang preosteoblas supaya membelah menjadi osteoblas akibat adanya aktivitas resorpsi oleh osteoklas. Faktor lain yang mempengaruhi proses *remodelling* adalah faktor hormonal. Proses *remodelling* akan ditingkatkan oleh hormon paratiroid, hormon pertumbuhan dan $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D. Sedang yang menghambat proses *remodelling* adalah kalsitonin, estrogen dan glukokortikoid. Proses-proses yang mengganggu *remodelling* tulang inilah yang menyebabkan osteoporosis.



Gambar 2.2. Proses pembentukan tulang

Selain gangguan pada proses *remodelling* tulang faktor lainnya adalah pengaturan metabolisme kalsium dan fosfat. Walaupun terdapat variasi asupan kalsium

yang besar, tubuh tetap memelihara konsentrasi kalsium serum pada kadar yang tetap. Pengaturan homeostasis kalsium serum dikontrol oleh organ tulang, ginjal dan usus melalui pengaturan paratiroid hormon (PTH), hormon kalsitonin, kalsitriol ($1,25(\text{OH})_2$ vitamin D) dan penurunan fosfat serum. Faktor lain yang berperan adalah hormon tiroid, glukokortikoid dan insulin, vitamin C dan inhibitor mineralisasi tulang (pirofosfat dan pH darah). Pertukaran kalsium sebesar 1.000 mg/harinya antara tulang dan cairan ekstraseluler dapat bersifat kinetik melalui fase formasi dan resorpsi tulang yang lambat. Absorpsi kalsium dari gastrointestinal yang efisien tergantung pada asupan kalsium harian, status vitamin D dan umur. Didalam darah absorpsi tergantung kadar protein tubuh, yaitu albumin, karena 50% kalsium yang diserap oleh tubuh terikat oleh albumin, 40% dalam bentuk kompleks sitrat dan 10% terikat fosfat.

Dalam terapi hal yang perlu diperhatikan adalah mengenali klasifikasi osteoporosis dari penderita. Osteoporosis dibagi 2, yaitu :

1. Osteoporosis primer

Osteoporosis ini berhubungan dengan kelainan pada tulang, yang menyebabkan peningkatan proses resorpsi di tulang trabekula sehingga meningkatkan resiko fraktur vertebra dan Colles. Pada usia dekade awal pascamenopause, wanita lebih sering terkena daripada pria dengan perbandingan 6-8: 1 pada usia rata-rata 53-57 tahun.

2. Osteoporosis sekunder

Osteoporosis ini disebabkan oleh penyakit atau sebab lain di luar tulang.

3. Osteoporosis idiopatik

Osteoporosis ini terjadi pada laki-laki yang lebih muda dan pemuda pra menopause dengan faktor etiologik yang tidak diketahui.

Pembentukan ulang tulang adalah suatu proses yang terus menerus. Pada osteoporosis, massa tulang berkurang, yang menunjukkan bahwa laju resorpsi tulang pasti melebihi laju pembentukan tulang. Pembentukan tulang lebih banyak terjadi pada korteks (Stevenson & Marsh, 2007).

Dewasa ini pengobatan osteoporosis banyak dilakukan menggunakan terapi antiresorptive, seperti golongan raloxifen (estrogen receptor modulator), golongan bisphosphonate (alendranate, risedronate, ibandronate) dan calcitonin. Meskipun mekanisme aksi dari masing-masing golongan ini berbeda, penghambatan sel osteoclast sebagai mediator dari resorpsi tulang merupakan tujuan akhir yang diinginkan, tapi dikarenakan efek samping yang sering terjadi, banyak pasien yang menghentikan terapinya.

Sebaliknya pengobatan osteoporosis menggunakan terapi formasi tulang (anabolik) yang berhubungan langsung dengan proses pembentukan tulang dapat mereduksi terjadinya patah tulang dengan cara meningkatkan kualitas tulang dan massa tulang. Dengan menggunakan terapi ini, densitas dan turnover tulang akan meningkat, mikro-arsitektur tulang juga meningkat dan ukuran tulang akan berubah. Sel osteoblas mempunyai peran yang sangat besar dalam pembentukan tulang melalui proliferasi dan diferensiasinya. Khususnya pada diferensiasi dari sel osteoblas, menunjukkan rigiditas dan kekuatan dari tulang dalam mempertahankan ke-elastisannya. Dewasa ini golongan anabolik yang menjanjikan adalah paratiroid hormon (PTH) (Girotra, *et.al.* 2006). Tapi terapi menggunakan PTH ini harus dilakukan setiap hari secara injeksi, mempersulit pasien untuk melakukannya sendiri.

Terapi pada osteoporosis harus mempertimbangkan 2 hal, yaitu terapi pencegahan yang pada umumnya bertujuan untuk menghambat hilangnya massa tulang.

Dengan cara yaitu memperhatikan faktor makanan, latihan fisik (senam pencegahan osteoporosis), pola hidup yang aktif dan paparan sinar ultra violet. Selain itu juga menghindari obat-obatan dan jenis makanan yang merupakan faktor resiko osteoporosis seperti alkohol, kafein, diuretika, sedatif, kortikosteroid. Selain pencegahan, tujuan terapi osteoporosis adalah meningkatkan massa tulang dengan melakukan pemberian obat-obatan antara lain hormon pengganti (estrogen dan progesterone dosis rendah). Kalsitrol, kalsitonin, bifosfat, raloxifene, dan nutrisi seperti kalsium serta senam beban. Pembedahan pada pasien osteoporosis dilakukan bila terjadi fraktur, terutama bila terjadi fraktur panggul (Irwan, 2008).

3.4. Tinjauan aktivitas anti-osteoporosis *in vivo*

Untuk pengujian anti-osteoporosis *in vivo* dari ekstrak etanol 70%, fraksi heksan, etil asetat, butanol dan air, digunakan mencit betina yang tidak bersiklus yang merupakan model untuk *postmenopausal bone loss*. Dilakukan evaluasi efek farmakologis dari *Barleria lupulina* terhadap osteoporosis dengan mengamati histologi dan morfologi tulang femur.

3.5. Tinjauan tentang reseptor estrogen

Reseptor estrogen adalah suatu makromolekul protein, termasuk dalam golongan *nuclear receptor superfamily* terletak di dalam sitosol, nucleus dan akhir-akhir ini diduga juga ada di dalam membran sel meskipun belum dapat diisolasi (Levin, 1999). Struktur ER membran belum diketahui sepenuhnya, diduga mempunyai struktur yang sama dengan ER sitosol dan nucleus oleh karena antibody terhadap *ligand-binding*

atau *domain* ER klasik nucleus dapat mengidentifikasi ER membran bermacam-macam sel. Reseptor estrogen terdiri dari 3 bagian (Kato *et al.*, 2000; Nilson *et al.*, 2001) yaitu:

- a. *AB Domain* yang terletak di terminal NH₂, region yang paling besar variasinya, belum diketahui dengan jelas fungsinya, diduga memperbaiki spesifisitas efek ikatan reseptor pada DNA.
- b. *C* atau *DNA Binding Domain* (DBD), kaya dengan asam amino yang memfasilitasi ikatan dengan DNA dan ikatan tersebut adalah spesifik.
- c. *D/EF Domain* atau *Ligand Binding Domain* (LDB) yang terletak di COOH-terminal, efek inhibisi region ini terhadap DBD hilang setelah terjadi ikatan hormone-reseptor, selain itu region ini mempunyai elemen yang mempengaruhiktivasi transkripsi.

Penelitian sebelumnya mengidentifikasi bahwa ERK1/2 merupakan mediator penting *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) untuk induksi diferensiasi osteoblas pada sel kultur osteoblastik dan pada setiap sel bila dilakukan inhibisi ERK menghasilkan supresi marker diferensiasi osteoblas. Estrogen, hormone paratiroid dan strain mekanik yang berperan dalam remodeling tulang menginduksi ERK1/2 (Jessop *et al.*, 2002).

Terdapat 2 macam reseptor estrogen yaitu reseptor estrogen alpha (ER α) dan reseptor estrogen beta (ER β). ER α terdiri dari 595 asam amino residu dengan berat molekul 66 kDa dapat dideteksi di osteoblas, osteosit dan osteoklas, sedangkan ER β yang terdiri dari 485 asam amino residu mempunyai berat molekul 54 kDa juga dapat dideteksi di osteoblas tetapi fungsinya masih belum jelas (Bord *et al.*, 2001; Levi, 2002; Lee & Lanyon, 2004).

2.6. Pengaruh latihan fisik terhadap homeostasis tulang

Latihan fisik adalah pergerakan tubuh yang terprogram dan terstruktur dilakukan untuk memperbaiki satu atau lebih komponen kebugaran fisik (Holly & Shaffrath, 2001). Latihan fisik merupakan stressor fisik yang dapat menginduksi respon hormonal dan imunologi, meningkatkan kadar *growth hormone* (GH), hormone tiroid, glucagon, katekolamin, adrenokortikotropin (ACTH), glukokortikoid (kortisol), testosterone, estrogen dan progesterone (Kjaer & Dela, 1996).

Penelitian pada tikus yang mendapat perlakuan latihan *endurance* 5 hari dalam 1 minggu selama 8 minggu dengan menggunakan *motorized rodent treadmill* menunjukkan *down regulated* proapoptotik gen (penurunan Bax & Apaf-1) dan pengurangan petanda kaspase (Siu *et al.*, 2004).

Pembebanan mekanik pada tulang (*skeletal load*) menimbulkan stress mekanik dan *strain* atau *resultant tissue deformation* yang menimbulkan efek pada jaringan tulang yaitu pembentukan tulang pada permukaan periosteal sehingga memperkuat tulang dan menurunkan *bone turnover* yang mengurangi pengeroposan tulang. Dengan demikian pembebanan mekanik dapat memperbaiki ukuran, bentuk dan kekuatan jaringan tulang dengan memperbaiki densitas jaringan tulang dan arsitektur tulang (Bemben & Fetters, 2000). Tulang melakukan adaptasi mekanik yaitu proses selular yang memerlukan sistem biologis yang dapat mengindera pembebanan mekanik. Informasi pembebanan ini harus dikomunikasikan ke sel efektor yang akan membuat tulang baru atau merusak tulang yang tua.

Penelitian pada tikus OVX yang mendapat kombinasi estrogen dan *bipedal stance exercise* selama 8 minggu meningkatkan masa tulang total, menurunkan

remodeling tulang dan menambah tebal dinding tulang vertebra lumbalis dan leher femur dibandingkan kelompok yang mendapatkan estrogen yang hanya mencegah secara parsial pengurangan tulang trabekula dan yang mendapat perlakuan latihan hanya secara parsial mencegah pengurangan tulang trabekula tetapi meningkatkan ketebalan dinding tulang. Hasil ini menunjukkan efek sinergistik perlakuan kombinasi. Selain itu, dilaporkan juga bahwa pada tikus OVX yang diberikan kombinasi latihan fisik (lari diatas treadmill) dan pemberian genistein 12 mg/hari selama 4 minggu menunjukkan peningkatan yang signifikan BMD tulang femur dibandingkan kelompok control ($p < 0,001$), lebih tinggi dibandingkan yang hanya mendapatkan genistein saja dan latihan fisik saja ($p < 0,01$) (Nakajima *et al.*, 2001). Kombinasi genistein 0,4 mg/hari subkutan dengan lari diatas treadmill 12 m/menit selama 30 menit, perlakuan selama 4 minggu, menunjukkan bahwa volume tulang dan ketebalan trabekula tulang femur distal lebih tinggi daripada kelompok control dan kelompok yang hanya mendapatkan latihan, estrogen 0,03 μ g/hari dan genistein saja (Wu *et al.*, 2003). Penelitian pada tikus OVX yang mendapat kombinasi pemberian bisphosphonate (*etidronate*) dan latihan fisik lari diatas treadmill menunjukkan efek *additive* dalam meningkatkan masa tulang yaitu *etidronate* mengurangi jumlah sel osteoklas sedangkan latihan fisik meningkatkan jumlah osteoblas (Chilibeck, 2004).

BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui aktivitas anti-osteoporosis *in vivo* dari ekstrak etanol 70% *Barleria lupulina* yang disertai dengan kombinasi latihan fisik terhadap penghambatan peningkatan ketidakseimbangan remodeling tulang
2. Mengetahui metode uji *in vivo* yang tepat pada uji aktivitas anti-osteoporosis

3.2. MANFAAT PENELITIAN

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Diperolehnya suatu tumbuhan obat Indonesia yang mempunyai potensi untuk dikembangkan menjadi obat tradisional yang berkhasiat menghambat peningkatan ketidakseimbangan remodeling tulang yang potensial dan aman.
2. Memberikan data ilmiah bahwa pengaruh ekstrak etanol 96% dari tanaman landik (*Barleria lupulina*) dalam menghambat peningkatan ketidakseimbangan remodeling tulang sehingga bisa digunakan sebagai data ilmiah untuk penelitian selanjutnya.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. Bahan

Semua tanaman yang digunakan diperoleh dari Kebun Raya, Purwodadi. Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini berderajat pro analisa. Bahan kimia dapat dilihat pada rincian anggaran bahan kimia. Hewan coba yang digunakan adalah mencit betina *Mus musculus (breeding)* yang diperoleh dari Labortorium Hewan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang tidak bersiklus. Perlengkapan kandang dan *treadmill* untuk mencit, makanan (Pellet CP 511) dan minuman mencit juga diperoleh dari Labortorium Hewan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Bahan pemeriksaan untuk histokimia diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

4.2. Alat

Maserator, rotavapor, inkubator, sentrifuse, *treadmill*, perlengkapan pemeriksaan vagina smear mencit (mikroskop, kaca obyek, cotton swab dan pipet), satu set alat bedah untuk pengambilan bahan tulang tungkai mencit, spuit injeksi 1 ml untuk sonde.

4.3. Tahapan penelitian

4.3.1. Ekstraksi dengan pelarut etanol 70% *Barleria lupulina*

Sebanyak 50 mg serbuk seluruh bagian *Barleria lupulina* diekstraksi dengan 70% etanol dengan cara maserasi, dan maserasi diulang 3 kali. Kemudian ekstrak etanol

diuapkan dengan rotavapor dan diperoleh ekstrak kental etanol 70%. Ekstrak yang sudah kering, ditimbang beratnya dan disimpan dalam eksikator. Ekstrak tersebut dilakukan uji aktivitas anti-osteoporosis *in vivo* yang disertai dengan kombinasi latihan fisik. Sebagian dari ekstrak etanol 70% yang telah diperoleh dilarutkan dengan air sampai larut sempurna dan dilakukan fraksinasi dengan menggunakan pelarut heksan, etil asetat dan *n*-butanol.

4.3.2. Pemilihan dan perlakuan hewan coba

Dalam penelitian ini dipilih mencit betina yang diharapkan tidak bersiklus (menopause) dengan berat badan antara 29-44 gram, umur > 8 bulan dan sehat. Pemilihan hewan coba ini berdasarkan pertimbangan bahwa mencit *Mus musculus* paling sering dipakai dalam penelitian biomedik karena secara genetik mempunyai kemiripan dengan manusia serta mempunyai kemampuan beradaptasi hidup dalam lingkungan laboratorium (Carson *et al.*, 2005).

Jumlah sampel untuk pengujian hipotesis penelitian ditentukan berdasarkan rumus replikasi dari Steel & Torrie (Hanafiah, 2004).

$$(tr-1)(r-1) > 15 \quad tr = \text{treatment (jumlah perlakuan)}$$

$$(4-1)(r-1) > 15 \dots\dots r > 6 \quad r = \text{replication (jumlah ulangan)}$$

Berdasarkan rumus diatas maka ditemukan $n=6$ dan untuk menghindari penurunan jumlah sampel akibat kematian mencit sebesar 20% maka jumlah sampel diperbanyak menjadi 7 sehingga jumlah seluruh sampel penelitian menjadi 28 mencit.

Teknik atau cara pengambilan sampel dengan cara purposive yang memenuhi kriteria inklusi. Penentuan kelompok tidak bersiklus berdasarkan kriteria dari pemeriksaan ulas vagina yang memerlukan bantuan konsultasi dari bagian Reproduksi

Hewan FKH Unair. Mencit betina yang sudah tidak mengalami menopause akan dilakukan induksi dengan deksametason secara peroral 1 x sehari selama kurang lebih 1 bulan.

4.3.3. Pembuatan Osteoporosis dengan induksi deksametasone

4.3.3.1. Penyiapan Bahan Induksi

Sediaan larutan Deksametason dibuat untuk menginduksi terjadinya osteoporosis. Sediaan tersebut dibuat dengan melarutkan Deksametason pada larutan CMC-NA yang telah didispersikan dengan aquadest. Larutan Deksametason ini diberikan secara peroral pada mencit yang akan dilakukan uji aktivitas.

4.3.3.2. Perhitungan Dosis Bahan Induksi

Dalam penelitian ini akan digunakan 28 ekor mencit yang diinduksi dengan Deksametason dengan ketentuan sebagai berikut: dosis Deksametason untuk manusia (70 g) adalah 1,652 mg, dosis tersebut dikonversikan pada mencit dengan berat badan 20 g dengan faktor korelasi 0,0026 menjadi $1,652 \text{ mg} \times 0,0026 = 4,3 \times 10^{-3} \text{ mg}/20 \text{ g BB}$, diasumsikan berat keseluruhan mencit 30 g, maka Deksametason yang dibutuhkan adalah:

$$\frac{30 \text{ g}}{20 \text{ g}} \times 4,3 \times 10^{-3} \text{ mg} = 6,45 \times 10^{-3} \text{ mg}/30 \text{ g BB}$$

Jadi Deksametason yang dibutuhkan untuk keseluruhan mencit adalah $6,45 \times 10^{-3} \text{ mg} \times 40 = 0,258 \text{ mg}$. Volume penyuntikan dihitung berdasarkan berat mencit, yaitu:

$$\frac{\text{dosis / g berat mencit}}{\text{kadar potasium oksonat dalam sediaan}} \times \text{volume sediaan}$$

Pemberian secara per oral dilakukan 1 x sehari selama 1 bulan sampai didapatkan kondisi mencit yang menopause melalui pemeriksaan ulas vagina dari masing-masing mencit.

4.3.3.3.Cara Pembuatan Larutan Deksametason

Deksametason dibuat dalam bentuk sediaan larutan, dengan melarutkannya dalam CMC-Na yang telah didispersikan dengan air. Ditimbang 250 mg Deksametason (untuk 50 mL), dispersikan diatas 5 mL aquadest selama 15 menit. Kemudian gerus hingga homogen. Perkecil ukuran partikel dari deksametason dan campur homogen dengan CMC-Na yang telah didispersikan dengan air tersebut.

4.3.3.4.Pemeriksaan Ulas Vagina

Sebelum melakukan pemeriksaan ulas vagina terhadap mencit yang telah diberikan deksametason, maka perlu diperhatikan terlebih dahulu cara memegang mencit, yaitu:

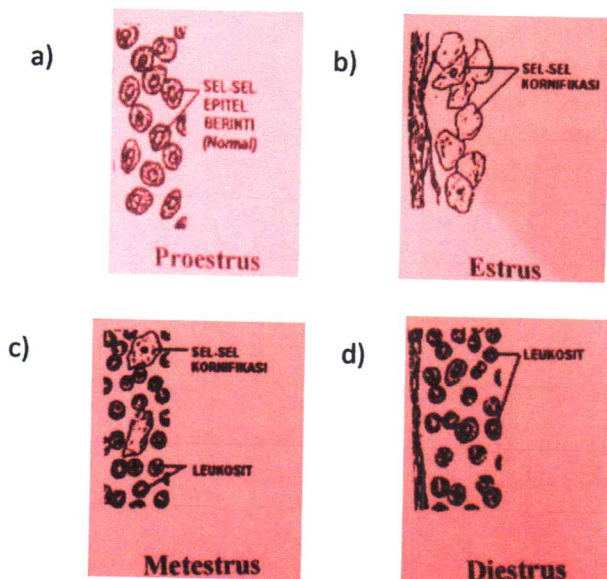
- Leher mencit dipegang/dijepit diantara ibu jari & jari telunjuk
- Ekor dijepit diantara telapak tangan dan jari kelingking
- Posisi mencit terlentang dengan bagian ventral menghadap ke atas

Setelah itu dilakukan pemeriksaan terhadap ulas vagina dari masing-masing mencit yang telah mendapatkan deksametason, yaitu:

- a. Membersihkan vulva mencit dengan menggunakan aquadest
- b. Membasahi *cotton swab* dengan air dan hisap air dengan pipet, kemudian dimasukkan pipet ke dalam lubang vagina
- c. Melakukan pemutaran secara halus dalam lubang vagina tersebut

- d. Menyemprotkan air ke dalam vagina dan dilakukan penghisapan kembali air dengan pipet
- e. *Cotton swab* dikeluarkan dan dioleskan dipermukaan gelas obyektif
- f. Air diteteskan ke permukaan gelas obyektif
- g. Membilas gelas obyektif dengan air secara perlahan-lahan dan meneteskan giemsa secara merata pada gelas obyektif, kemudian diamkan kurang lebih 2-3 menit
- h. Membilas gelas obyektif dengan air mengalir secara perlahan-lahan dan mengeringkannya
- i. Mengamati preparat tersebut di bawah mikroskop dengan pembesaran 400

Mencit betina menopause adalah mencit betina *Mus musculus* galur Swiss yang sudah tidak bersiklus, tidak melalui fase proestrus, estrus, metestrus dan diestrus, yang diketahui dengan pemeriksaan ulas vagina mencit 3 x berturut-turut setiap 12 jam dan diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000 x. Fase menopause ditandai gambaran sel basal dan parabasal yang menetap setelah pemeriksaan berturut-turut 3 x setiap 2 x sehari.



Gambar 4.1. Siklus menstruasi: a) proestrus, b) estrus, c) metestrus dan d) diestrus

4.3.4. Penyiapan Bahan Uji

Ekstrak tanaman disuspensikan dengan CMC-Na 0,5% dalam aquadest dan diujikan pada mencit yang telah diinduksi dengan Deksametason pada berbagai konsentrasi.

Sediaan bahan uji berupa suspensi, sedangkan sebagai pembawanya digunakan CMC-Na 0,5% (b/v) dalam aquadest. Sediaan bahan uji dibuat dengan cara mensuspensikan ekstrak etanol 70% landik dalam CMC-Na 0,5% dalam aquadest. Dosis yang diberikan adalah 2,8 mg/20g BB mencit (0,2 cc) 1 x sehari selama 4 minggu, selain itu juga ada kelompok uji dengan dosis 2,8 mg/20g BB mencit (0,2 cc) 1 x sehari selama 4 minggu yang disertai dengan latihan fisik.

Tahap pembuatan larutan bahan uji :

1. Menimbang ekstrak etanol 70% *Barleria lupulina* (EEBL) sebanyak 500 mg
2. Menimbang CMC-Na 0,5% x 50 ml = 250 mg, CMC-Na didispersikan merata diatas 5 ml aquadest, aduk hingga terbentuk suspensi
3. (1) + (2), diaduk sampai homogen
4. (2) dipindahkan ke labu ukur 50 ml
5. Tambahkan aquadest sampai volumenya 50 ml, kocok sampai homogen

4.3.5. Penyiapan Kontrol Negatif dan Positif

Sebagai kontrol negatif digunakan CMC-Na 0,5% dalam aquadest dan kontrol positif digunakan adalah aledronat yang disuspensikan dalam CMC-Na 0,5%. Volume sediaan yang diberikan baik uji maupun kontrol adalah maksimum 0,2 cc tiap kali pemberian.

Tahap pembuatan larutan kontrol positif :

1. Menimbang CMC-Na 0,5% x 50 ml = 250 mg, CMC-Na didispersikan merata diatas 5 ml aquadest, aduk hingga terbentuk suspensi
2. Menggerus tablet aledronat dan mencampurnya dengan suspensi CMC-Na, kemudian dilakukan pengadukan sampai homogen
3. (2) dipindahkan ke labu ukur 50 ml
4. Ditambahkan aquadest sampai volumenya 50 ml, dan dikocok sampai homogen

4.3.7. Rancangan Uji Aktivitas anti-osteoporosis

Sebelum perlakuan, dilakukan pengelompokan mencit dengan metode randomisasi menjadi empat kelompok. Tujuan randomisasi adalah untuk mengurangi variasi berat badan mencit pada saat perlakuan.

Kelompok-kelompok mencit tersebut adalah :

1. Kelompok kontrol (+) : 7 ekor mencit masing-masing diberikan secara per oral suspensi aledronat sebanyak 0,02 cc 1 x setiap hari
2. Kelompok uji I : 7 ekor mencit masing-masing disuntikkan sediaan bahan uji (ekstrak etanol 70% landik) dosis 2,8 mg/20 g BB
3. Kelompok uji II : 7 ekor mencit masing-masing disuntikkan sediaan bahan uji (ekstrak etanol 70% landik) dosis 2,8 mg/20 g BB dengan disertai latihan fisik
4. Kelompok kontrol (-) : 7 ekor mencit masing-masing diberikan secara per oral suspensi CMC-Na

Pada kelompok uji II, dilakukan latihan fisik dengan pembebanan aksial merupakan latihan berjalan dengan menggunakan sarana treadmill untuk mencit tanpa elevasi dengan progresifitas intensitas yaitu:

- Minggu I didahului 15 menit dengan kecepatan 7 m/menit, dilanjutkan 30 menit dengan kecepatan 11 m/menit dan diakhiri 15 menit dengan kecepatan 7 m/menit
- Minggu II didahului 10 menit dengan kecepatan 7 m/menit, 40 menit dengan kecepatan 11 m/menit dan diakhiri 10 menit dengan kecepatan 7 m/menit.
- Minggu III dan IV intensitas latihan dinaikkan menjadi 5 menit dengan kecepatan 7 m/menit, diikuti 50 menit dengan kecepatan 11 m/menit dan diakhiri 5 menit dengan kecepatan 7 m/menit.

Perlakuan latihan ini diberikan dengan frekuensi 3 x seminggu selama 4 minggu.

4.3.8. Variabel penelitian

Ada beberapa variabel penelitian yang akan didapati, yaitu:

a. Variabel bebas (*independent*)

- Pemberian 0,2 cc (2,8 mg/20g BB mencit) ekstrak etanol 70% *Barleria lupulina* per sonde 1 x sehari selama 4 minggu
- Kombinasi latihan fisik pembebanan aksial 3 x seminggu disertai pemberian per sonde 0,2 cc ekstrak etanol 70% *Barleria lupulina*
- Pemberian per sonde 0,2 cc CMC Na, 1 x sehari selama 4 minggu pada kelompok kontrol positif dan negatif

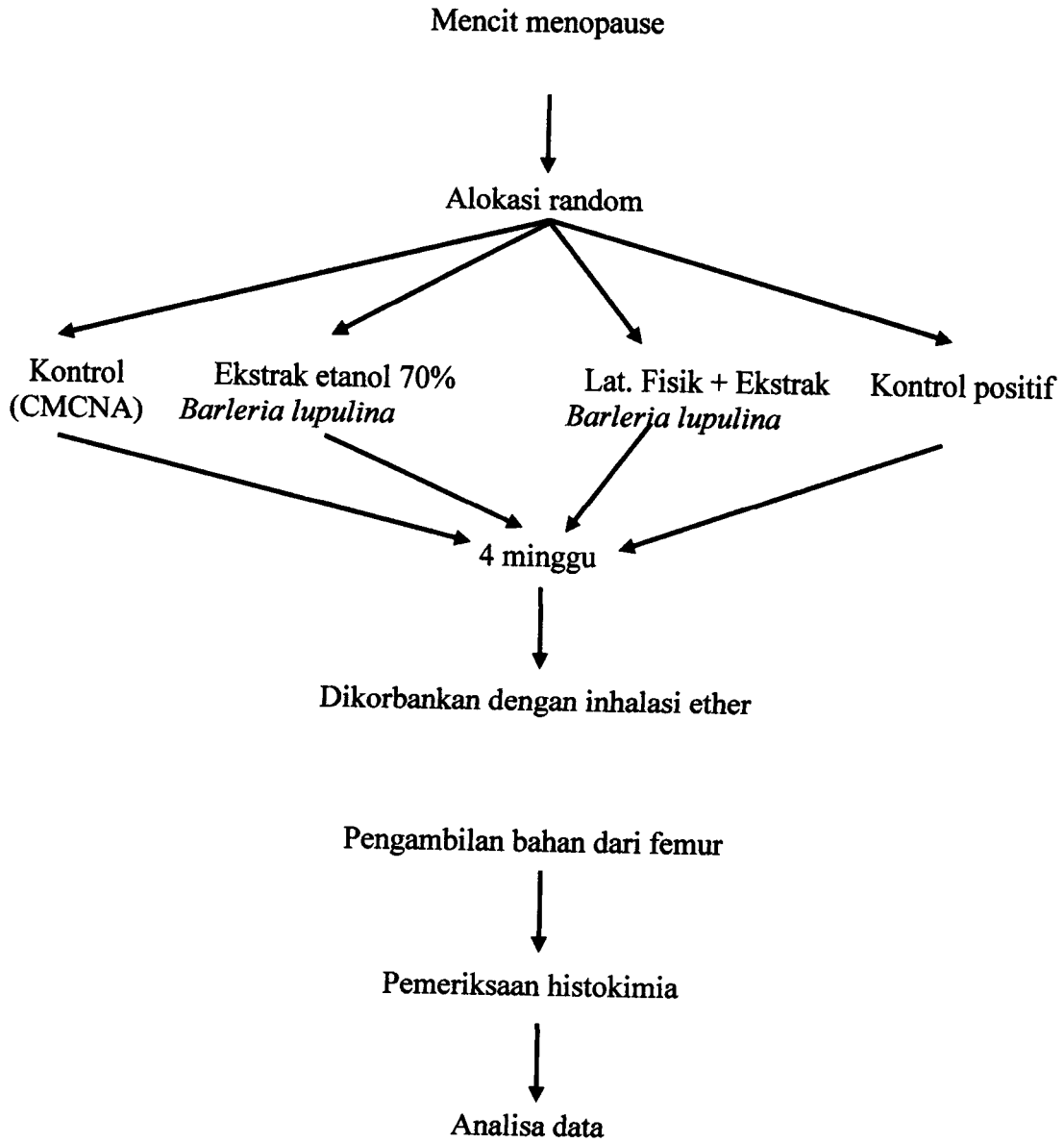
b. Variabel kendali

Jenis mencit (*Mus musculus*) dan jenis kelamin (betina), berat badan rata-rata 29-44 g, jenis makanan dan minuman, kesehatan mencit, perawatan mencit dan sanitasi kandang, temperatur dan kelembaban kandang, waktu pemberian

makan/minum (Smith & Mangkoewidjojo, 1987), sarana latihan (*treadmill*) dan perlakuan semuanya dikondisikan sama pada semua variabel penelitian

4.3.9. Pengambilan data

Bahan diambil dari tulang femur mencit, difiksasi, dekalsifikasi, proses clearing, impregnasi dan embedding. Dilanjutkan pemotongan menggunakan mikrotom. Setelah deparafinasi, diwarnai dengan Mayer's Hematoxylin selama 15 menit, dicuci dengan air mengalir. Setelah pencucian diwarnai lagi dengan eosin selama 2 menit. Tahap akhir adalah dehidrasi, clearing, dan mounting (An, 2003)



Gambar 4.2. Skema kerja

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Ekstraksi Simplisia *Barleria lupulina*

Dari 50 g simplisia *Barleria lupulina* dilakukan proses maserasi dengan menggunakan etanol 70% sebanyak 300 ml selama 3 kali, dan diperoleh hasil ekstrak etanol70% sebanyak 5.0 g.

5.2. Pengukuran Berat Badan Mencit

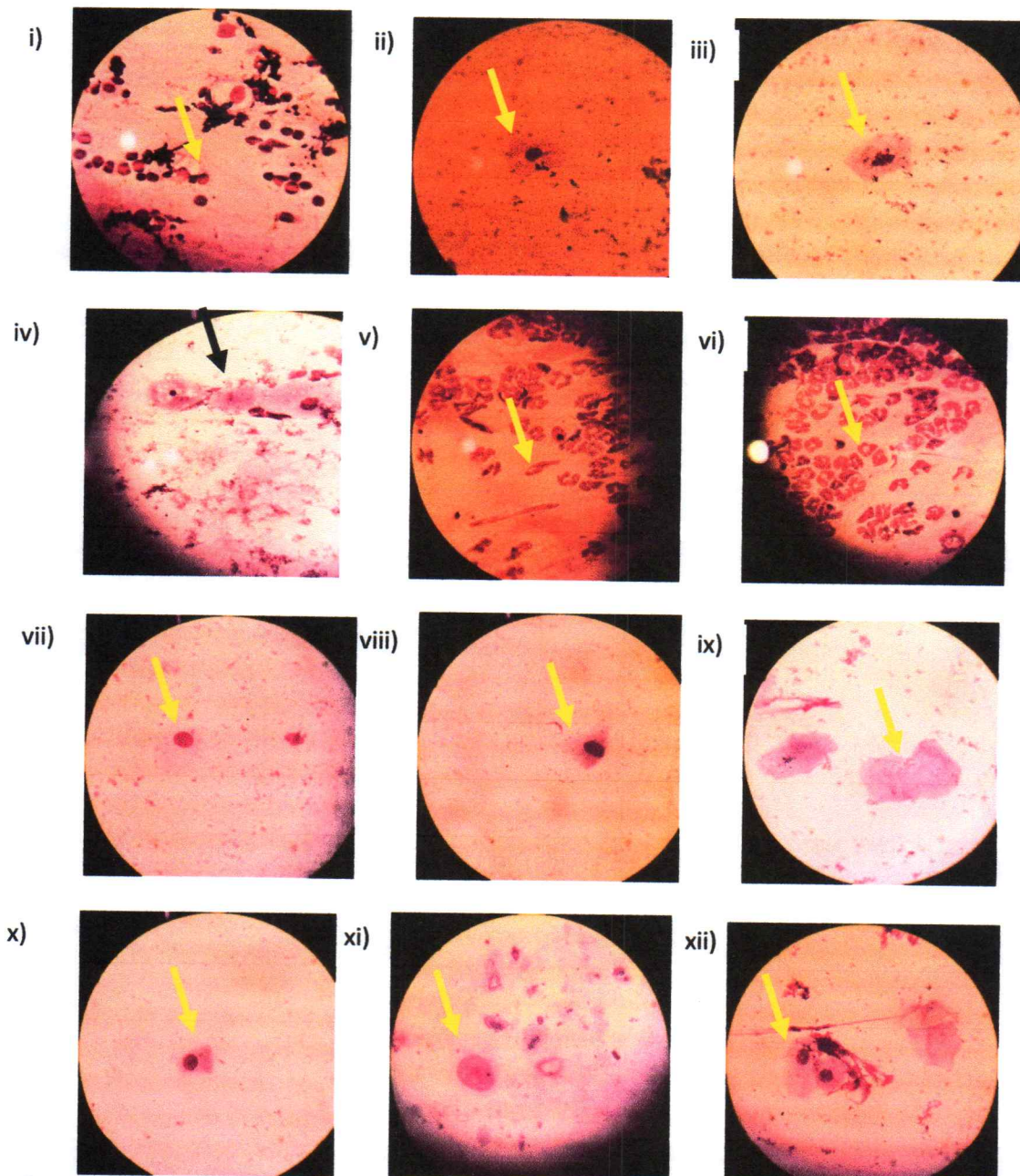
Sebelum dan saat dilakukan perlakuan, maka kondisi berat badan dari mencit harus tetap diperhatikan untuk memantau pengaruh perlakuan terhadap kondisi secara fisik dari mencit. Dari hasil tabel 5.1. terlihat bahwa kondisi berat badan mencit cenderung menurun setelah diinduksi dengan menggunakan deksametason..

Tabel 5.1. Data pengukuran berat badan mencit pada saat diinduksi dengan deksametason

No.	Kelompok	Minggu				
		I	II	III	IV	V
1.	A	33	21	26	26	26
2.		36	33	28	28	25
3.		33	27	25	27	20
4.		27	26	26	25	23
5.		34	43	28	28	22
6.		31	32	31	31	29
7.	B	31	35	34	33	29
8.		32	29	28	28	26
9.		24	23	21	24	20
10.		25	20	19	21	18
11.		42	32	28	28	23
12.		30	28	27	26	24

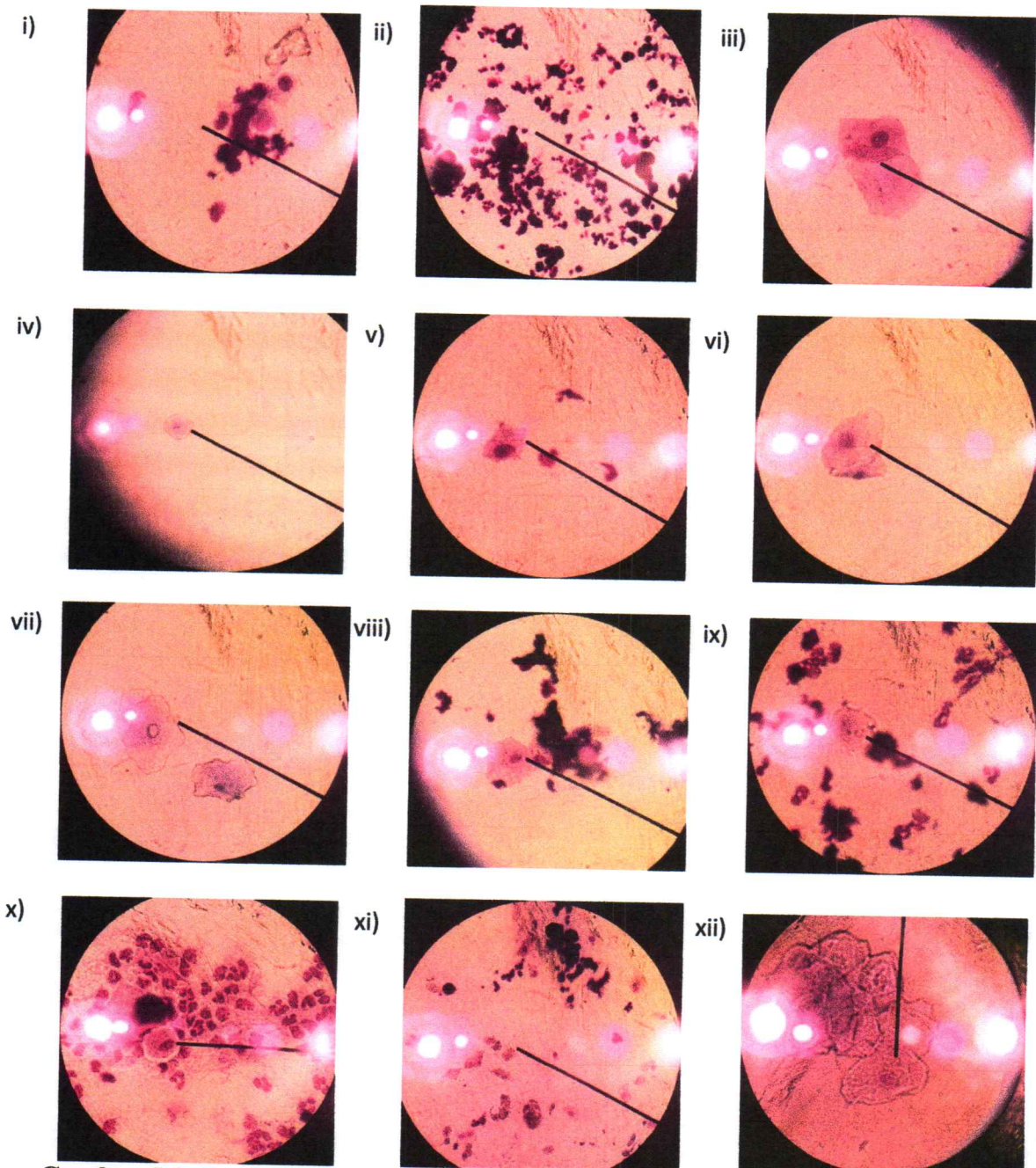
5.3. Pengamatan Hasil Ulas Vagina

Dalam penelitian ini dibutuhkan mencit dalam kondisi menopause karena secara beriringan kondisi tersebut dapat menyebabkan pengeroposan pada tulang (osteoporosis). Pemberian deksametason terhadap mencit selama 1 bulan dapat menyebabkan terjadinya menopause karena siklus hormonnya akan terganggu dan berubah dari kondisi proestrus, estrus, metestrus dan diestrus.



Gambar 5.1. Hasil pengamatan ulas vagina pada minggu ke-3, i) kontrol: proestrus; ii), iii), iv), vii), viii), ix), x), xi) dan xii) estrus; v) metestrus dan vi) diestrus

Hasil pengamatan ulas vagina mencit yang diberi perlakuan deksametason pada minggu ke-3 dapat dilihat pada gambar 5.2. Dari gambar tersebut terlihat bahwa sebagian mencit mengalami siklus estrus. Untuk melihat perkembangan lebih lanjut dari siklus hormon dalam mencit, pada penelitian ini kami mencoba meneruskan pemberian deksametason sampai dengan minggu ke-5.

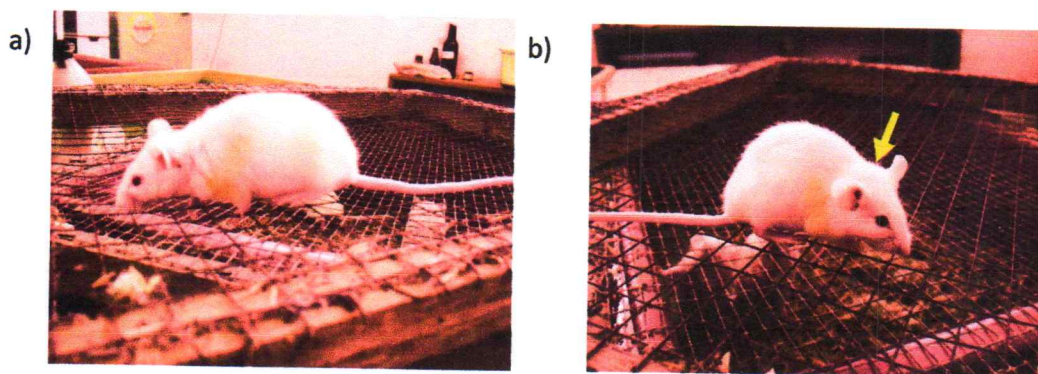


Gambar 5.2. Hasil pengamatan ulas vagina pada minggu ke-5, i) kontrol: proestrus; ii) diestrus; iii), iv), v), vi), vii), viii), xi), xii) estrus; ix), dan x) metestrus

Dari hasil pengamatan ulas vagina yang diperoleh pada gambar 5.2. hampir semua mencit berada pada siklus estrus dan ada 1 ekor mencit yang mati setelah mengalami fase diestrus. Pada awal sebelum kematiannya, mencit tersebut mengalami kebengkokan pada tulang belakang. Oleh karena itu diambil kesimpulan bahwa mencit sudah memasuki masa menopause dan perlakuan terhadap sampel mulai dilakukan.

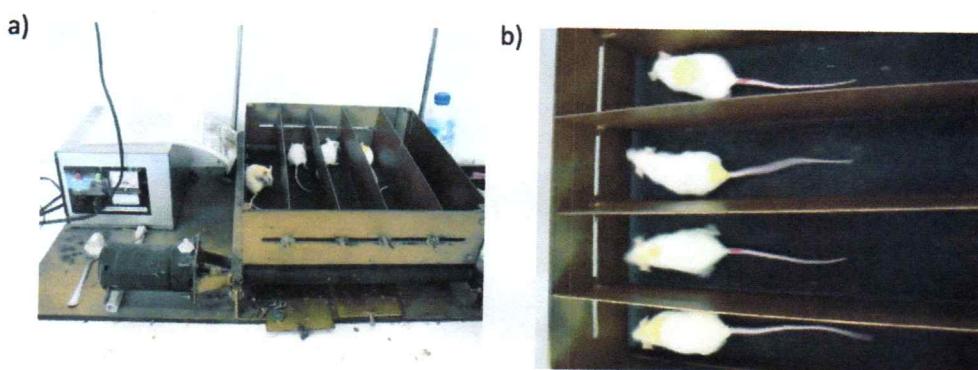
5.4. Hasil Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 70% dari tanaman landik (*Barleria lupulina*) dalam Menghambat Peningkatan Remodeling Tulang yang Disertai Latihan Fisik

Uji aktivitas ekstrak etanol 70% dari tanaman landik dilakukan setelah mencit mengalami masa menopause. Kondisi menopause ini dapat diamati dengan melakukan pemeriksaan ulas vagina. Berdasarkan hasil ulas vagina hampir semua mencit sudah memasuki siklus minimum estrus dan ditandai dengan membungkuknya bagian tengkuk dari mencit. Jadi mencit sudah mengalami pengeroposan tulang (osteoporosis).



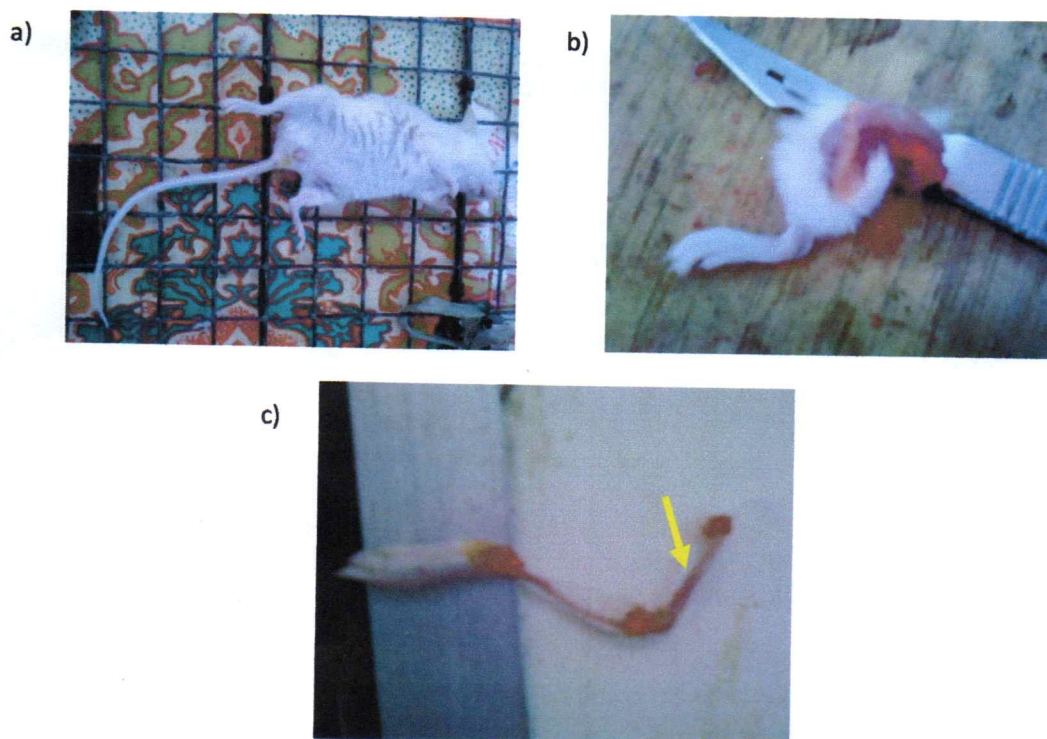
Gambar 5.3. (a) Mencit normal dan (b) mencit osteoporosis yang ditandai dengan kebungkukan pada tulang belakang

Kemudian dilakukan perlakuan dengan memberikan ekstrak etanol 70% *Barleria lupulina* baik yang disertai latihan fisik ataupun tidak selama 30 hari.



Gambar 5.4. (a) Alat treadmill untuk latihan fisik mencit dan (b) kelompok uji II

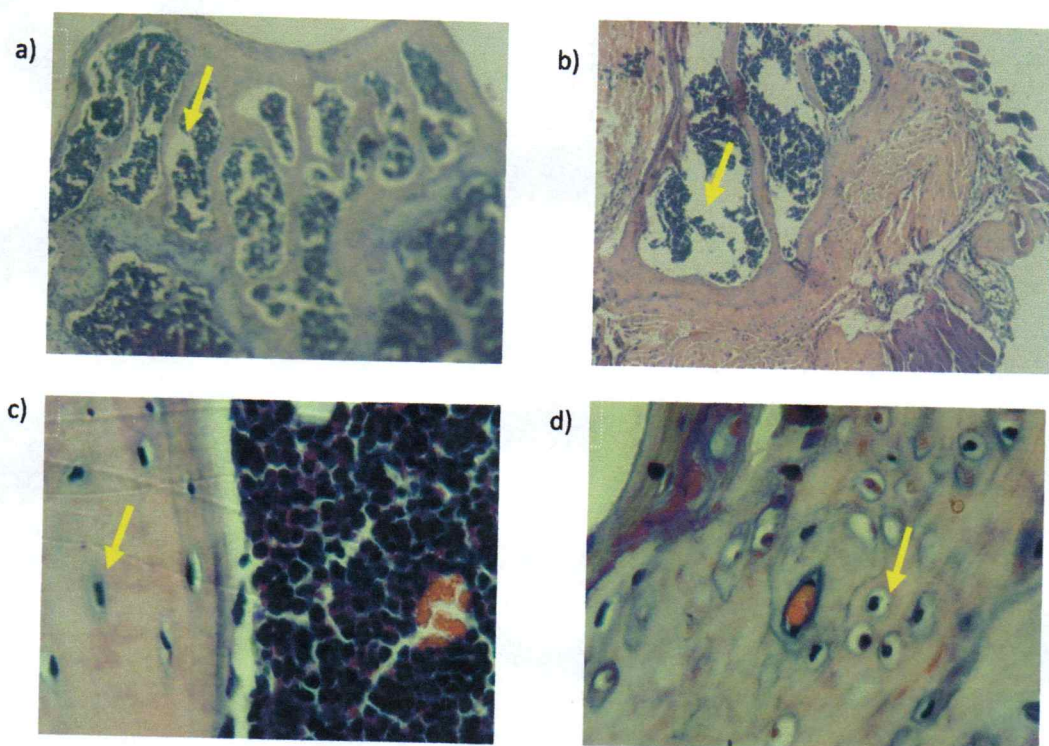
Setelah 30 hari, tulang femur mencit dilakukan pembedahan yang kemudian tulang tersebut dilakukan dekalsifikasi dan staining untuk mempermudah pengamatan morfologi tulangnya (kerapatan tulang dan sel osteoblas).



Gambar 5.5. Proses pembedahan mencit untuk mendapatkan tulang femurnya: a) pembiusan mencit, b) pemotongan bagian kaki mencit dan c) tulang femur mencit

Hasil pengamatan morfologi tulang femur:

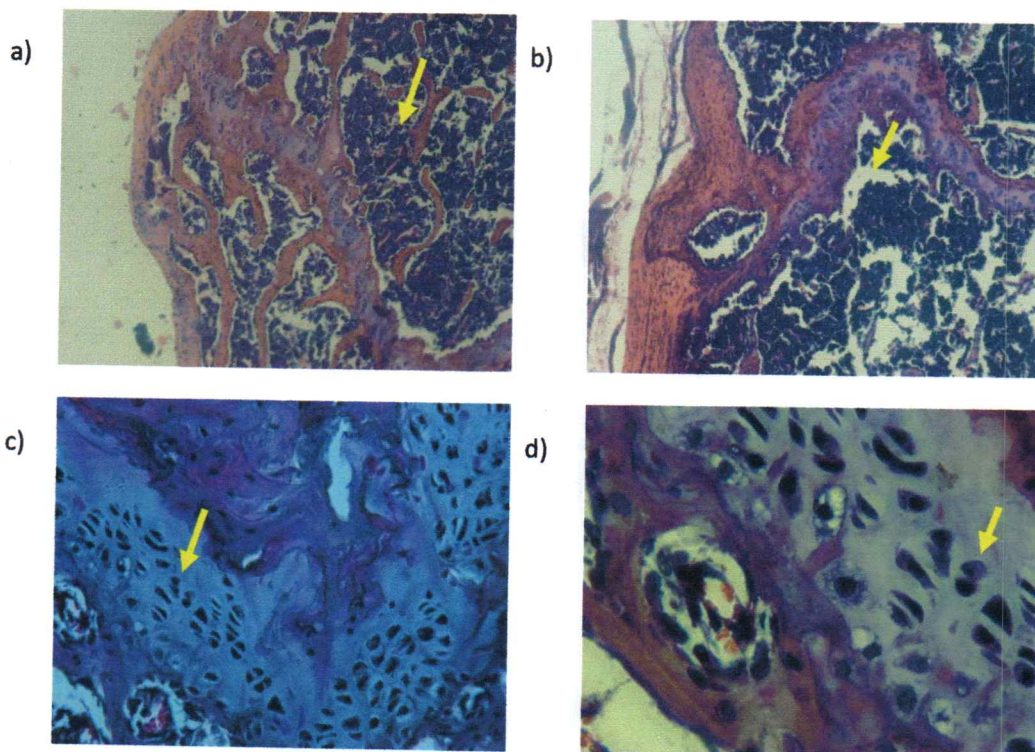
1. Kontrol negatif



Gambar 5.6. Morfologi tulang femur kelompok kontrol negatif: a) dan b) matriks tulang pembesaran 100x dan 400x , c) dan d) sel osteoblas

Secara morfologi tulang femur mencit pada kelompok kontrol negatif mengalami pengeroposan tulang akibat pemberian deksametason selama 1 bulan. Dari gambar diatas terlihat bahwa jumlah sel osteoblas sangat sedikit bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (gambar 5.6.c dan 5.6.d) sedangkan matriks tulang didalam tulang femur terdapat kerenggangan antar selnya (gambar 5.6.a dan 5.6.b).

2. Kontrol positif



Gambar 5.7. Morfologi tulang femur kelompok kontrol positif: a) dan b) matriks tulang, c) dan d) sel osteoblas

Pada kontrol positif, hewan coba (mencit) diberi perlakuan dengan pemberian aledronate secara per-oral. Aledronate merupakan obat yang biasa digunakan pada pasien yang menderita osteoporosis. Secara morfologi matriks tulang femur pada kelompok kontrol positif ini tersusun sangat rapat (gambar 5.7.a dan 5.7.b). Selain itu terlihat juga bahwa jumlah sel osteoblasnya lebih banyak bila dibandingkan dengan kontrol negatif (gambar 5.7c dan 5.7d).

penelitian ini perlu dilakukan penghitungan jumlah sel osteoblas secara kuantitatif dan analisa secara statistika.

Hal yang perlu diperhatikan dalam penelitian ini adalah:

1. Pemilihan hewan coba.

Untuk mendapatkan mencit dengan umur diatas 8 bulan sangat susah dan jarang diperoleh, karena pada mencit usia tua rentan sekali terhadap penyakit dan mudah sekali penurunan kesehatan yang akhirnya mati.

2. Menginduksi mencit supaya terjadi osteoporosis

Untuk membuat mencit yang sedang mengalami osteoporosis dilakukan dengan menginduksi deksametason selama 1 bulan. Hal ini dibutuhkan waktu yang lama dan kejelian mata dalam mengamati perubahan siklus proestrus, estrus, metestrus dan diestrus karena siklus tersebut mudah sekali terjadi perubahan setelah 3-4 jam bila mencit belum mengalami masa menopause. Selain mengamati perubahan siklus, untuk menandai terjadinya osteoporosis juga dapat diamati dari terjadinya pembengkokan pada tulang punggung mencit.

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

- a. Pemberian ekstrak etanol 70% *Barleria lupulina* yang disertai dengan kombinasi latihan fisik pada mencit memberikan gambaran kerapatan matriks tulang dan peningkatan jumlah osteoblas secara morfologi dibandingkan dengan kontrol negatif
- b. Metode uji *in vivo* pada aktivitas anti-osteoporosis dilakukan dengan menginduksi mencit dengan deksametason sehingga mengakibatkan mencit memasuki siklus estrus dan tulang punggung menjadi bengkok. Hal ini mengindikasikan kondisi tulang mencit telah mengalami pengeroposan (osteoporosis)

6.2. Saran

Perlunya dilakukan penghitungan jumlah sel osteoblas secara kuantitatif dan dilakukan analisis secara statistika.

DAFTAR PUSTAKA

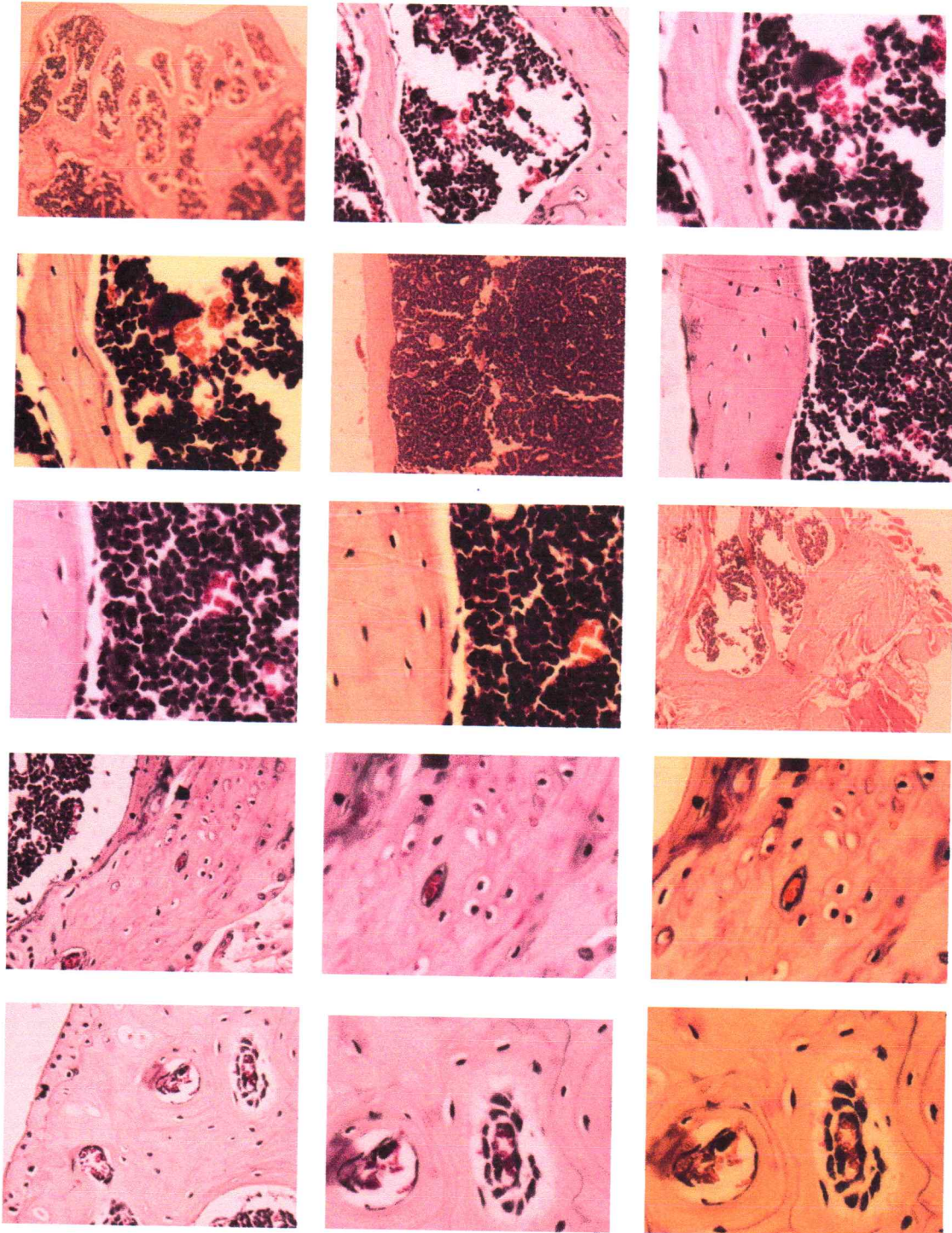
- Balbona, E.J., 2000, **Osteoporosis Screening**. Jacksonville Medicine (Supplement): 9 – 11
- Baziad, 2003, **Menopause dan Andropause** ed 1. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohrdjo, 177 – 182
- Bemben, D.A. and Fetters, N.L., 2000, The Independent and Additive Effects of Exercise Training and Estrogen on Bone Metabolism. **Journal of Strength and Conditioning Research** 14 (1), 114 – 120
- Bord, S., Horner, A., Beavan, S., Compston, J., 2005, Estrogen Receptor α and β are Differentially Expressed in Developing Human Bone. **JCE & M** 86 (5), 2309 – 2314
- Byrne, L.T., Sasse, J.M., Skelton, B.W., Suskarman, A., White, A.H, 1987, The minor iridoid glycosides of *Barleria lupulina* isolation, crystal structure and plant growth inhibiting properties of 6-O-acetylshanzhiside methyl ester. **Aust. J. Chem.** 40, 785 – 794.
- Carson, E., Clifton, D., Lee, T., 2005, *Mus musculus*. Dr. House Mouse in The House.
- Cheng, S., Sipila, S., Taafee, R., Puolakka, J., Suominen, H., 2002, **Change in Bone Mass Distribution Induced by Hormone Replacement Therapy and High-Impact Physical Exercise in Post-menopausal Women** 31, 126–135
- Chilibeck, 2004, Exercise and Estrogen or Estrogen Alternatives (Phytoestrogens, Bisphosphonates) for Preservation of Bones Mineral in Postmenopausal Women. **Can. J. Appl. Physiol** 29 (1), 59–75
- Chomnawang, M.T., Surassmo, S., Nukoolkarn, V.S., Gritsanapan, W., 2005, Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. **J. Ethnopharmacol.** 101, 330 - 333
- Copeland, J.L. and Tremblay, M.S., 2004, Effect of HRT on Hormone Responses to Resistance Exercise in Postmenopausal Women. **Maturitas** 48, 360–371
- Depkes RI., 2000. **Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat**. Cetakan pertama, Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, p. 9 – 10.
- Downey, R.J and Weissman, C., 2001, **Physiological Changes Associated with Bed Rest and Major Body Injury**. In (Gonzalez, E.G., Myers, S.J., Edelstein, J.E., Lieberman, J.S., Downey, J.). Downey and Darling's Physiological Basis of Rehabilitation Medicine 3th ed. Boston: Butterworth Heinemann, p.453–454
- Franceschi RT, Young J., 1990, Regulation of Alkaline Phosphatase by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and Ascorbic acid in Bone-derived Cells. **J Bone Miner Res**; 5:1157–1167
- Girotra, M., Rubin, M.R., Bilezikian, J.P., 2006, The use of parathyroid hormone in the treatment of osteoporosis. **Rev. Endocr. Metab. Disord.** 7, 113–121.
- Hanafiah, K., 2004, **Rancangan Percobaan**. Teori dan Aplikasi. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada, 5–12
- Holly, R.G. and Shaffrath, J.D., 2001, **Cardio Respiratory Endurance**. In (Roitman, J.L) ACSM's Resource Manual for Guidelines for Exercise Testing and Prescription 4th ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 203–204
- Jennifer, JW., 2008, **Methods in Molecular Biology. Osteoporosis Methods and Protocol**. Human Press, p 5

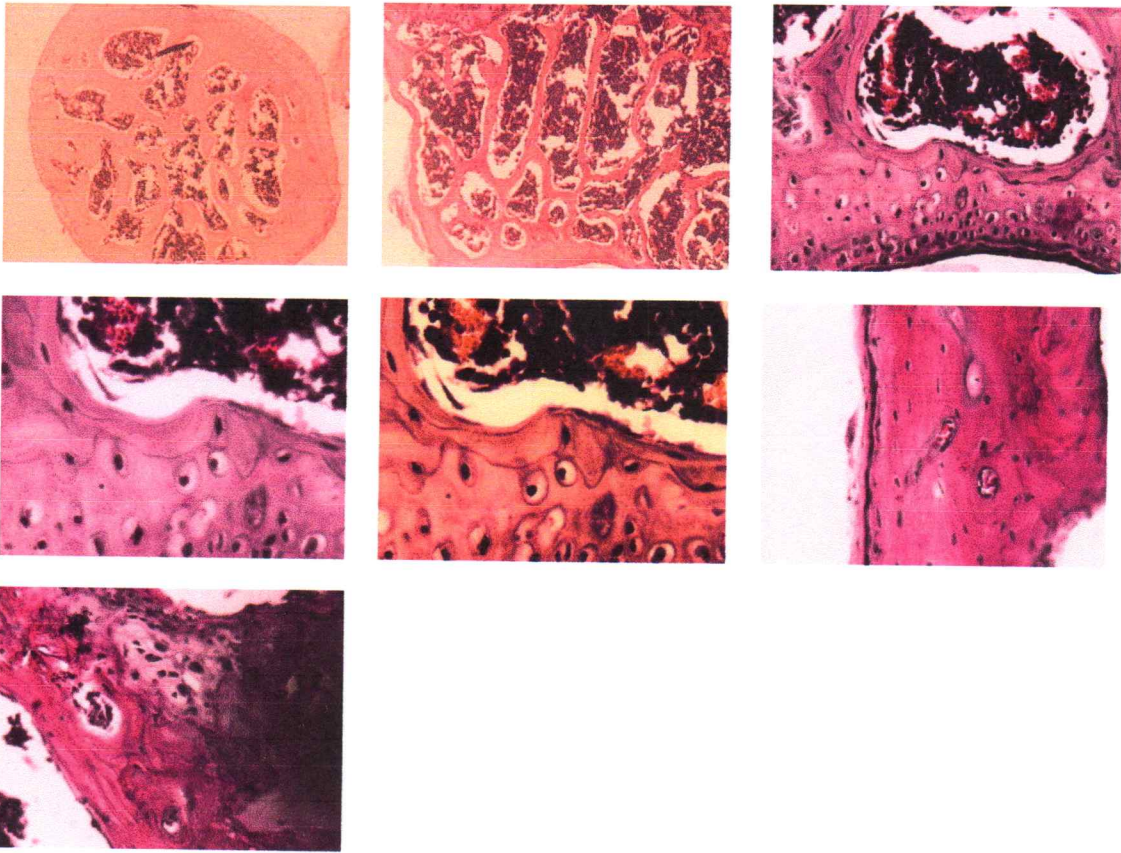
- Jessop, H.L., Rawlinson, S.C.F., Pitsilides, H.A., Lanyon, L.E., 2002, Mechanical Strain and Fluid Movement Both Activities Extracellular Regulated Kinase (ERK) in Osteoblastic-like Cell but Different Signaling Pathways. **Bone** 31, 186–194
- Kanchanapoom, T., Kasai, R., Yamasaki, K., 2001 Iridoid glucosides from *Barleria lupulina*. **Phytochemistry** 58, 337–341.
- Kato, S., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kobayashi, Y., Takeyama, K., Endok, H., Yanagisawa, J., 2000, Molecular Mechanism of a Cross-talk between Estrogen and Growth Factor Signaling Pathways. **Genes to Cells** 5, 593–601
- Lanyon, L., Armstrong, V., Ong, D., Zaman, G., Price, J., 2004, Is Estrogen Receptor α Key to Controlling Bone Resistance to Fracture? **J. of Endocrinology** 182: 183–191
- Laswati, H., 2007, Kombinasi Latihan Fisik dan Pemberian Daun Semanggi Menghambat Peningkatan Ketidakseimbangan Proses Remodeling Tulang Perempuan Pascamenopause melalui Peran Reseptor Estrogen α Sel Osteoblas. **Disertasi**, Program Pascasarjana Universitas Airlangga
- Lee, K.C.L and Lanyon, L.E., 2004, Mechanical Loading Influences Bone Mass Through Estrogen Receptor α . **Exercise and Sports Sciences Review** 32 (2): 64–68
- Lee, T.C., Mc Hugh, P.E., O'Brein, F.J., McHoney, D.O., Taylor, D., Bruzzi, M., 2004, **Bone for Life: Osteoporosis, Bone Remodeling and Computer Simulation**. In: Topics in Biomechanical Engineering. Prendergast, P.J., and McHugh, P.E., eds. Available at URL: <http://www.tcd.ie/bioengineering/documents/Chap.III.pdf> accessed May 5, 2007
- Lemoine, S., Granier, P., Tiffoche, C., Berthon, P.M., Thieulant, M.L., Carre, F., Delamarche, P., 2002, Effect of Endurance Training on Estrogen Receptor α Expression in Different Rat Skeletal Muscle Type. **Acta Physiol Scand.** 175 (3): 211–217
- Levi, G., Geoffroy, V., Palmisno, G., de Vernejoul, M-C, 2002, Bones, Genes and Fractures. **EMBO reports** 3 (1), 22–26
- Levin, E.R., 1999, Cellular Functions of The Plasma Membrane Estrogen Receptor. **TEM** 10 (9), 374–377
- Manolagas, s.c., 2000, Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanism and Implications for The Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. **Endocrine Reviews** 21 (2): 115–137
- Irwan, M., 2008, **Osteoporosis**, Fakultas Kedokteran Universitas Riau. RSUD Arifin Arifin Achmad Pekanbaru.
- Nakajima, D., Kim, C.S., Oh, T.W., Yang, C.Y., Naka, T., Igawa, S., Ohta, F., 2001, Suppressive Effects of Genistein Dosage and Resistance Exercise on Bone Loss in Ovariectomized Rats. **J. Physiol. Anthropol. Appl. Human Sci.** 20 (5), 285–291
- Nilson, S., Makela, S. And Treuter, E., 2001, Mechanism of Estrogen Action. **Physiol. Rev.** 81, 1535–1565
- Pacifi, R., 1996, Estrogen, Cytokines and Pathogenesis of Postmenopausal Osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research** 11 (8): 1043–1051
- Pramono, S. 2007, **Jamu in Indonesian daily life and industry**, Institute of natural medicine, University of Toyama, p. 1.

- PT Eisai Indonesia. 1995, **Medicinal Herb Index in Indonesia**, Jakarta, 1995. p 275
- Retno, W., 2009a, Chemical Constituents of *Barleria lupulina* and Their Alkaline Phosphatase Stimulatory Activity, **thesis**, University of Toyama
- Retno, W., 2009b, Uji Aktivitas Alkaline Phosphatase dari Fraksi *Graptophyllum pictum* dan *Spilanthes acmella* terhadap sel MC3T3-E1 sebagai marker diferensiasi sel osteoblast, **Laporan Dosen Muda**, Fakultas Farmasi Unair
- Riggs, B.L., Khosla, S., and Melton, J.L., 2002, Sex Steroid and The Construction and Conservtion of The Adult Skeleton. **Endocrine Reviews** 23 (3): 279–302
- Rubin, C., Xu, G., Judex, S., 2001, The Anabolic Activity of Bone Tissue Supressed by Disuse, is Normalized by Brief Exposure Mechanical Stimuli. **The FASEB Journal** 15, 2225–2228
- Siu, P.M., Bryner, R.W., Martyn, J.K., Always, S., 2004, Apototic Adaptations from Exercise Training in Skeletal and Cardiac Muscles. **The FASEB Journal** 18, 1150–1152
- Stevenson, J., and Marsh, M., 2007, **An Atlas of Osteoporosis**. Informa Healthcare, 3rd edition, p 2, 12–13
- Suba, V., Murugesan, T., Rao, R.B., Pal, M., Mandal, S.C., Saha, B.P., 2002, Neuropharmacological profile of *Barleria lupulina* Lindl. Extract in animal models. **J. Ethnopharmacol.** 81, 251 - 255.
- Suba, V., Murugesan, T., Pal, M., Mandal, S.C., Saha, B.P., 2004, Antiulcer activity of methanol fraction of *Barleria lupulina* Lindl. in animal models. **Phytoterapy Research**, 18, 925 - 929.
- Suba, V., Murugesan, T., Kumaravelrajan, R., Mandal, S.C., Saha, B.P., 2005, Antiinflammatory, analgesic and antiperoxidative efficacy of *Barleria lupulina* Lindl. Extract. **Phytother. Res.** 19, 695 - 699.
- Suksamran, A., Wongkrajang, K., Kirtikara, K., 1986, Iridoid glucosides of *Barleria lupulina*. **J. Nat. Prod.**, 49, 179.
- Tobias, J.H, 2003, At The Crossroads of Skeletal Responses to Estrogen and Exercise. **TRENDS in Endocrinology and Metbolism** 14 (10): 441–443
- Tuntiwachwuttikul, P., Pandiaroen, O., Taylor, W.C., 1998, Iridoid glucosides of *Barleria lupulina*. **Phytochemistry** 49, 163 - 166.
- Wanikiat, P., Panthong, A., Sujayanon, P., Yoosook, C., Rossi, A.G., Reutrakul, V., 2008, The anti-inflammatory effects and the inhibition of neutrophil responsiveness by *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans* extracts. **Journal of Ethnopharmacology** 116, 234 - 244.
- Wu, J., Wang, X.X., Chiba, H., Higuchi, M., Takasaki, M., Ohta, A., Ishimi, Y., 2003, Combined Intervention of Exercise and Genistein Prevented Androgen Deficiency-Induced Bone Loss in Mice. **J. Appl. Physiol.** 94, 335–342
- Yoosok, C., Panpisutcai, Y., Chaichana, S., Santisuk, C., Reutakul, V., 1999, Evaluation of anti-HSV-2 activity of *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans*. **Journal of Ethnopharmacology**, 179 - 187.
- Zaman, G., Cheng, M.Z., Jessop, H.L., White, R., Lanyon, L.E., 2000, Mechanical Strain Activates Estrogen Response Elements in Bone Cells. **Bone** 27: 233–239

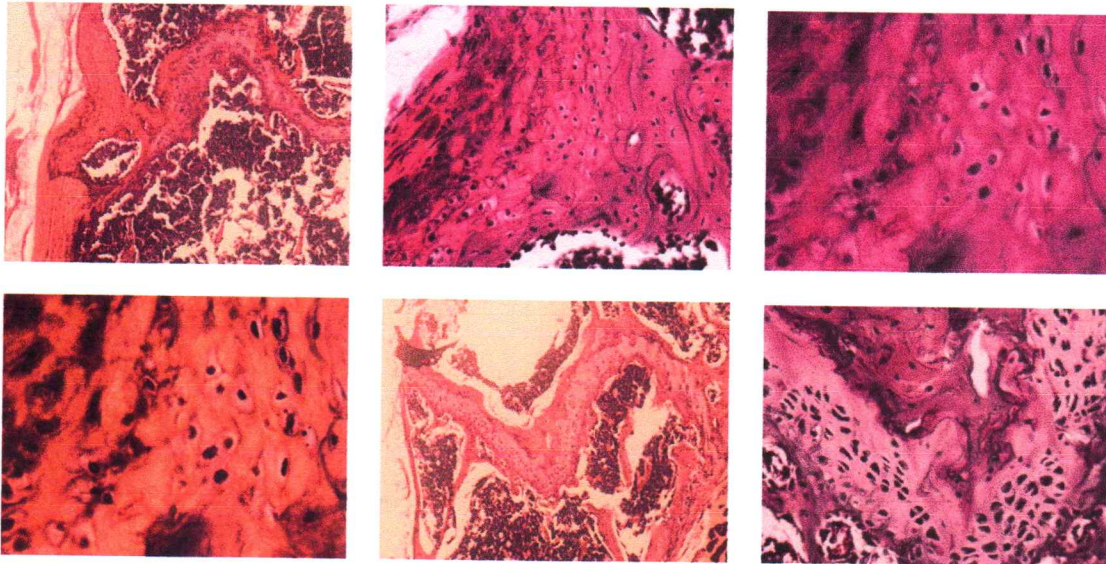
LAMPIRAN
HASIL MORFOLOGI TULANG FEMUR

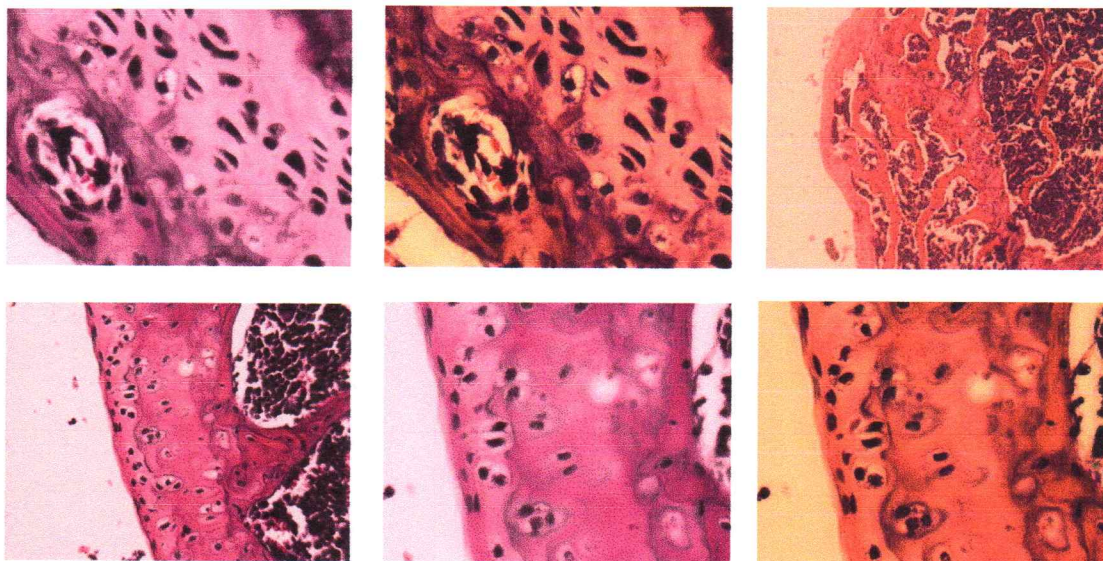
Kontrol negatif:



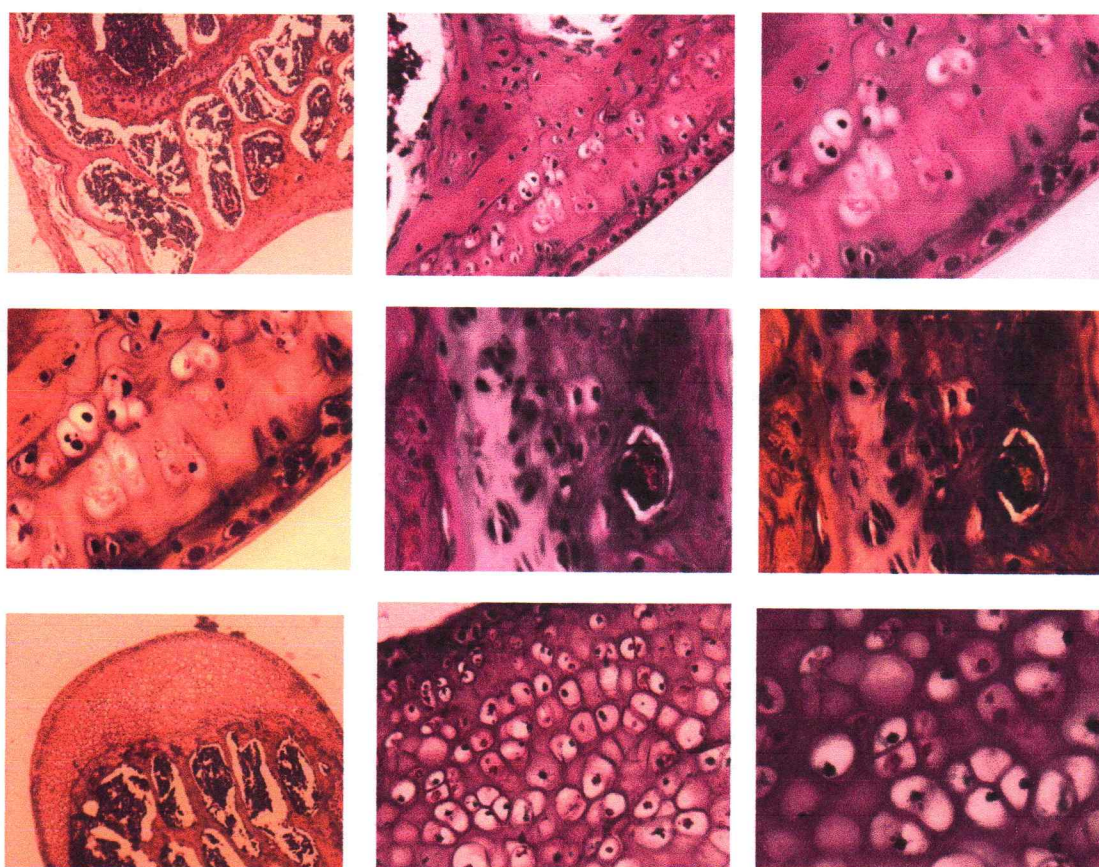


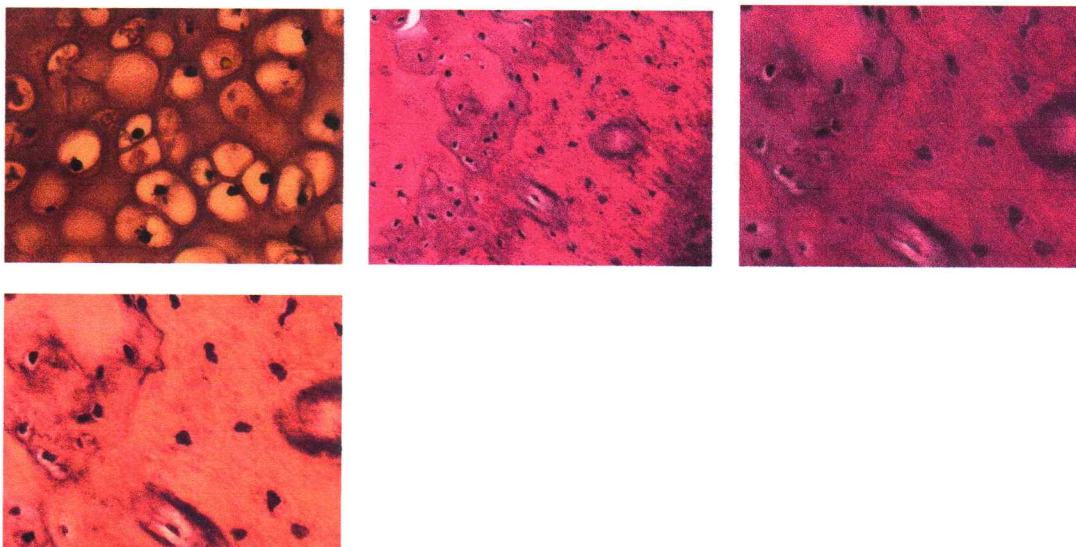
Kontrol positif:



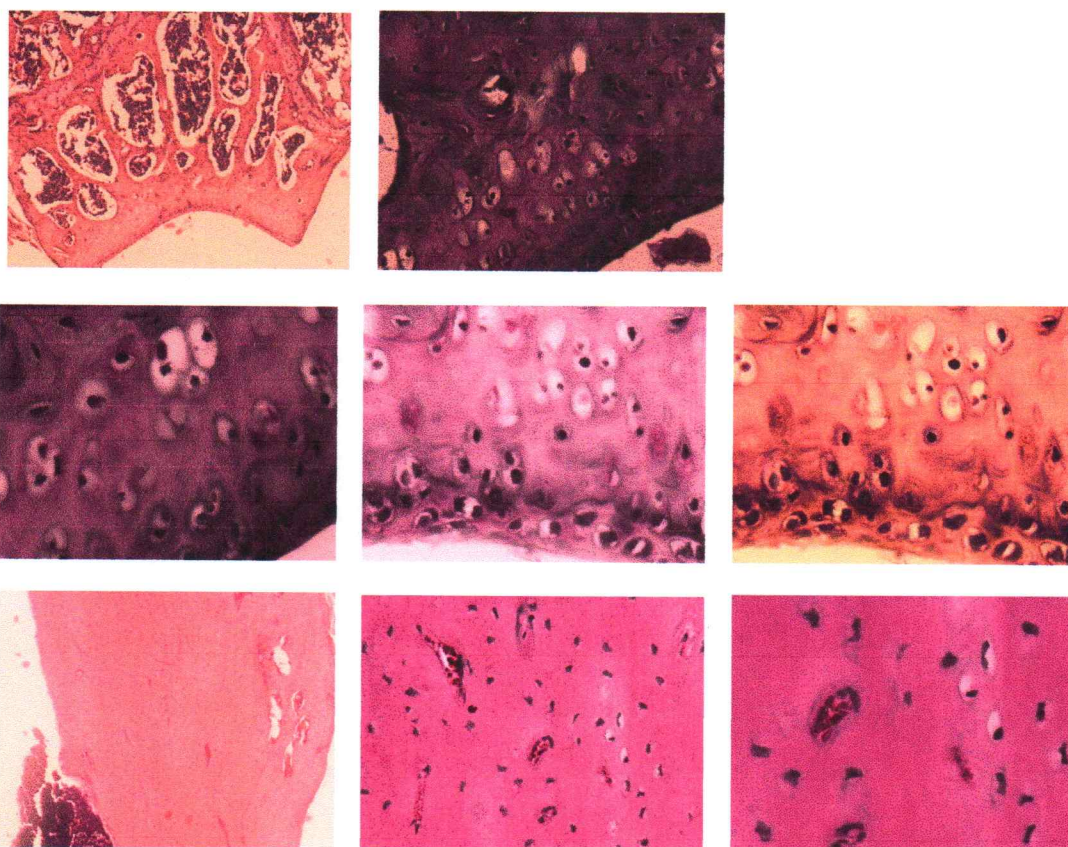


Ekstrak uji 1:





Ekstrak Uji II dan latihan fisik:



B. DRAFT ARTIKEL ILMIAH

1. The characteristic of osteoporotic mice that inducing by dexamethasone, **International Seminar of Medicinal Chemistry, October 15th 2011, Surabaya**

THE CHARACTERISTIC OF OSTEOPOROSIS MICE THAT INDUCED BY DEXAMETHASONE

Retno Widyowati,^{1*} Marta Ika Riyana¹, Hening Laswati Putra², Mangestuti Agil¹

¹Department of Pharmacognosy and Phytochemistry, Faculty of Pharmacy, Airlangga University,

²Department Physical and Rehabilitation, Faculty of Medicine, Airlangga University

*email: retno_biotek@yahoo.com

ABSTRACT

Dexamethasone is a member of the glucocorticoid class of hormones. Instead of building the body up, it is designed to break down stored resources (fats, sugars and proteins). The Stopping it abruptly can cause loss of appetite, upset stomach, vomiting, drowsiness, confusion, headache, fever, joint and muscle pain. The side effect of dexamethasone for long time dose is osteoporosis. Osteoporosis, is a disease characterized by reduced bone mass, quality, and strength, changes in skeletal micro-architecture, and increased fracture risk.¹ Osteoporosis, which literally means "porous bone," is often referred to as the silent disease because symptoms are not noticed until a fracture occurs.² Therefore I examined the characteristic of mice that induced by dexamethasone during 1 month. The result showed that mice were estrous cycle at fourth week by vagina smear and some of them are humpbacked. It indicate to osteoporosis condition.

Keywords: osteoporosis, mice, dexamethasone



THE CHARACTERISTIC OF OSTEOPOROTIC MICE THAT INDUCED BY DEXAMETHASONE

Retno Widyowati,¹ Marta Ika Riyana¹, Hening Laswati Putra², Mangestuti Agil¹
 1) Faculty of Pharmacy, 2) Faculty of Medicine, Airlangga University

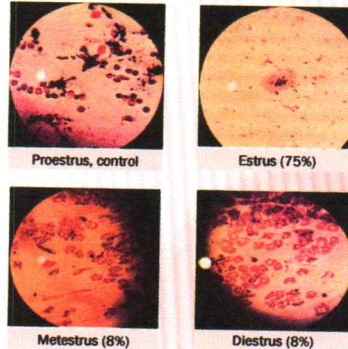


INTERNATIONAL SEMINAR ON MEDICINAL CHEMISTRY, OCTOBER 15TH 2011, SURABAYA

Abstract

Dexamethasone is a member of the glucocorticoid class of hormones. Instead of building the body up, it is designed to break down stored resources (fats, sugars and proteins). The Stopping it abruptly can cause loss of appetite, upset stomach, vomiting, drowsiness, confusion, headache, fever, joint and muscle pain. The side effect of dexamethasone for long time dose is osteoporosis. Osteoporosis, is a disease characterized by reduced bone mass, quality, and strength, changes in skeletal micro-architecture, and increased fracture risk.¹ Osteoporosis, which literally means "porous bone," is often referred to as the silent disease because symptoms are not noticed until a fracture occurs.² Therefore I examined the characteristic of mice that induced by dexamethasone during 1 month. The result showed that mice were estrous cycle at fourth week by vagina smear and some of them are humpbacked. It indicate to osteoporosis condition.

Vaginal Smear Results



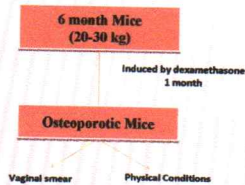
Proestrus, control

Estrus (75%)

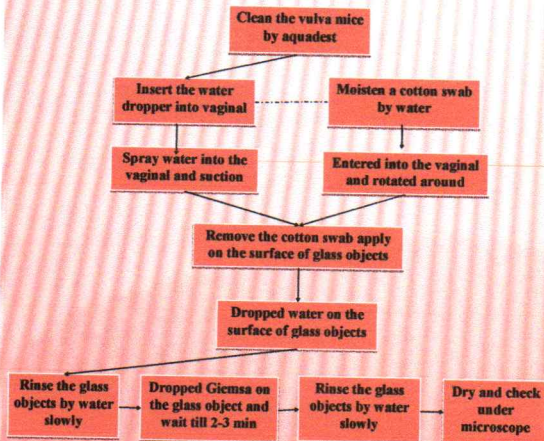
Metestrus (8%)

Diestrus (8%)

Induced Osteoporotic Mice Methods



Vaginal Smear Methods



Mice Body Weight Parameters

No.	Groups	Weeks				
		I	II	III	IV	V
1	Controls	33	21	26	26	26
2		36	32	28	28	25
3		35	27	25	27	20
4		27	26	26	25	23
5		34	43	28	28	22
6		31	32	31	31	29
Averages		32	30	28	28	24
1	Dexamethasone Inducing	31	35	34	33	29
2		32	29	28	28	26
3		24	23	21	24	20
4		25	20	19	21	18
5		42	32	28	28	23
6		30	28	27	26	24
Averages		31	28	26	27	23

Physically Parameters



Normal Mice

Osteoporotic Mice

CONCLUSIONS

- Osteoporotic mice done by inducing dexamethasone during 1 month
- The parameters of osteoporotic mice are :
 - estrus cycle
 - humpbacked

Acceptance letter:



INTERNATIONAL SEMINAR ON MEDICINAL CHEMISTRY
AND TIMMERMAN AWARD 2011

Secretariat: Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Airlangga University
Jl. Dharmawangsa Dalam, Surabaya, Indonesia. Phone: +62-31-5033710, Fax: +62-31-5022113

Our ref.: 099/ISMC/IX/2011

October 10, 2011

Retno Widyowati

Faculty of Pharmacy, Airlangga University
Surabaya

Thank you for submitting a scientific paper for the 2011 International Seminar on Medicinal Chemistry. Medicinal chemists from Indonesia, Malaysia, The Netherlands, Japan, and USA from various areas of medicinal chemistry are expected to attend this one-day scientific meeting which will be held in Airlangga University, Surabaya, Indonesia, on October 15, 2011. Additional meeting information can be found on the official meeting website at www.ismcaward.com.

Verification of Paper Acceptance

Based on evaluation by our Scientific Committee, the following abstract has been accepted for poster presentation at the meeting:

Presenter: **Retno Widyowati**

Paper Title: "The title is **The Characteristic of Osteoporosis Mice that Induced by Dexamethasone**"

Proceeding

Poster presenter who wish to include his/her paper in seminar proceeding should send full paper to the organizing committee. Template is available for download at www.ismcaward.com.

Registration

All attendees must register in order to participate in either workshop or seminar. If you do not complete the registration yet, please submit via www.ismcaward.com.

Accommodation

Should you need help in finding accommodation, please contact Mr. Robby Sondakh by email sondakhrob@yahoo.com, or by mobile phone +62-81-833-4078.

Cancellation

If you are unable to attend the meeting to make your presentation, it is important that you inform us as soon as possible that you must withdraw from the meeting.

Sincerely yours,

Dr. Bambang Tri Purwanto
Chairman of Organizing Committee

2. Profil morfologi mencit dengan tulang keropos yang diberi ekstrak etanol 70% landik dan latihan fisik (direncanakan akan dipublish pada **Majalah Farmasi Indonesia, UGM**)

EFEK PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 70% DARI *BARLERIA LUPULINA* DAN KOMBINASI LATIHAN FISIK PADA MENCIT YANG DIINDUKSI DEKSAMETASON

Retno Widyowati,^{1*} Marta Ika Riyana¹, Hening Laswati Putra², Mangestuti Agil¹

¹Department of Pharmacognosy and Phytochemistry, Faculty of Pharmacy, Airlangga University,

²Department Physical and Rehabilitation, Faculty of Medicine, Airlangga University

ABSTRAK

Barleria lupulina adalah salah satu tanaman obat Indonesia yang mempunyai kandungan senyawa aktif berupa iridoid glikosida, fenilpropanoid glikosida, lignin glikosida dan benzil alkohol glikosida yang berpotensi sebagai anti-diabetes, anti-inflamasi, rematik dan pencegahan osteoporosis. Dari hasil penelitian sebelumnya diketahui bahwa baik ekstrak maupun fraksi butanol dan air mampu meningkatkan aktivitas dari enzim alkaline fosfatase yang merupakan marker dari sel osteoblas (pembentukan tulang). Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas anti-osteoporosis *in vivo* ekstraksi etanol 70% landik dan disertai dengan kombinasi latihan fisik pada mencit yang telah diinduksi dengan deksametason. Hasilnya diperoleh bahwa ekstrak etanol 70% *Barleria lupulina* mampu meningkatkan jumlah sel osteoblas dan memberikan profil yang lebih rapat pada matriks tulang secara morfologi bila dibandingkan dengan kontrol negatif baik pada ekstrak tunggal maupun ekstrak yang disertai dengan latihan fisik (treadmill).

ABSTRACT

Barleria lupulina is one of Indonesia medicinal plants that contain iridoid glycoside, phenylpropanoid glycoside, lignin glycoside and benzyl alcohol glycoside. It used as antidiabetic, antiinflammatory, reumatic and osteoporosis. Based on the preview study, the 70% ethanol extract, butanol fraction and water fraction of *Barleria lupulina* stimulated alkaline phosphatase as marker of osteoblast cells (bone formation). This research done the antiosteoporosis activity of 70% ethanol extracts of *Barleria lupulina* and exercise combination on mice that inducing by dexamethasone. The result showed that 70% ethanol extract of *Barleria lupulina* increase the number of osteoblast cells and rigidity of the bone matrix by morphology. The exercise combination showed the highest number of osteoblast cells.

PENDAHULUAN

Osteoporosis adalah penyakit tulang sistemik yang ditandai oleh penurunan densitas masa tulang dan perburukan mikroarsitektur tulang sehingga tulang menjadi rapuh dan mudah patah (Jennifer, 2008). Dengan meningkatnya usia harapan hidup, maka berbagai penyakit degeneratif dan metabolik, termasuk osteoporosis akan menjadi

permasalahan muskuloskeletal yang memerlukan perhatian khusus, terutama di negara-negara berkembang. Sejak dicanangkannya *Bone Joint Decade* (BJD) 2000-2010 osteoporosis menjadi penting, karena selain termasuk dalam 5 besar masalah kelainan muskuloskeletal yang harus ditangani, juga kasusnya semakin meningkat sejalan dengan peningkatan jumlah usia tua (Irwan, 2008). Pada umumnya pengobatan osteoporosis dibagi menjadi 2 bagian yaitu untuk menghambat hilangnya masa tulang (anti-resorpsi) dan meningkatkan masa tulang (formasi tulang) (NIH, 2001). Permasalahan terapi osteoporosis adalah kompleks dan erat hubungannya dengan cakupan penderita yang rendah akibat mahal biaya deteksi dini, pemeriksaan lanjutan dan obat-obatan untuk penyakit osteoporosis. Selain itu obat-obatan yang ada pun masih belum ada yang ideal karena masalah efikasi dan toleransi yang ditimbulkan oleh obat-obatan tersebut.

Dewasa ini pengobatan osteoporosis banyak dilakukan dengan menggunakan terapi anti-resorpsi, seperti golongan Raloxifen (estrogen reseptor modulator), golongan bisfosfonat (alendranat, risedronat, ibandronat) dan Kalsitonin. Meskipun mekanisme aksi dari masing-masing golongan ini berbeda, penghambatan sel osteoklas sebagai mediator dari resorpsi tulang merupakan tujuan akhir yang diinginkan (Fleisch, 1998), tapi dikarenakan efek samping yang sering terjadi, banyak pasien yang menghentikan terapinya (Wronski *et al.*, 1988; Mashiba *et al.*, 2005; Whyte *et al.*, 2003; Woo *et al.*, 2006).

Upaya penanggulangan penyakit osteoporosis terus dilakukan terutama pencarian obat anti-osteoporosis baru. Saat ini trend pengobatan masyarakat mengarah pada bahan alam atau *back to nature*. Pengobatan dengan bahan alam dipercaya masyarakat memiliki efek samping lebih ringan dan relatif mudah didapat dipasaran. Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan skrining dari 32 tanaman Indonesia terhadap aktivitas dari alkaline fosfatase (ALP) sebagai marker dari diferensiasi osteoblas dan diperoleh hasil bahwa ekstrak etanol 70% dari *Barleria lupulina*, *Graptophyllum pictum*, dan *Spilanthes acmella* menstimulasi aktivitas ALP sebesar 139%, 128% dan 169% (Retno, 2009a). ALP mengkatalisis ester monofosfat yang berada di dalam membran plasma menjadi *phosphatidyl-glycolipid anchor* yang akan mempengaruhi proses pembentukan masa tulang kembali (Franceschi & Young, 1990).

Ekstrak etanol 70% dari *Barleria lupulina* berpotensi digunakan untuk pengobatan osteoporosis karena mampu meningkatkan pembentukan masa tulang dengan menstimulasi aktivitas dari enzim alkaline fosfatase (Retno, 2009a), namun sejauh ini belum ada laporan tentang uji aktivitas anti-osteoporosis *in vivo* dari ekstrak, fraksi dan senyawa yang terkandung di dalamnya yang disertai dengan kombinasi latihan fisik untuk menghambat peningkatan ketidakseimbangan remodeling tulang. Dengan diketahuinya efek-efek tersebut dari tanaman ini, diharapkan dapat mengungkap potensi *Barleria lupulina* sebagai obat untuk penyakit osteoporosis baik melalui peningkatan pembentukan masa tulang (formasi tulang) maupun melalui penghambatan masa tulang (anti-resorpsi) sehingga *remodeling* tulang dalam tubuh dapat berjalan semestinya. Selain itu kajian tentang senyawa aktif dalam *Barleria lupulina* sebagai anti-osteoporosis juga belum banyak dilaporkan, sehingga penelitian ini penting untuk dikembangkan. Tujuan khusus penelitian ini adalah:

- (1) Mengetahui aktivitas anti-osteoporosis *in vivo* dari ekstrak etanol 70% tanaman *Barleria lupulina* yang disertai dengan kombinasi latihan fisik pada mencit yang diinduksi dengan deksametason
- (2) Mengetahui pengaruh induksi deksametason pada mencit

METODOLOGI

Bahan

Barleria lupulina diperoleh dari Kebun Raya, Purwodadi. Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini berderajat pro analisa. Hewan coba yang digunakan adalah mencit betina *Mus musculus* (*breeding*) yang diperoleh dari Labortorium Hewan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang tidak bersiklus. Bahan pemeriksaan untuk histokimia diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Ekstraksi dengan pelarut etanol 70%

Sebanyak 50 mg serbuk seluruh bagian *Barleria lupulina* diekstraksi dengan 70% etanol dengan cara maserasi, dan maserasi diulang 3 kali. Kemudian ekstrak etanol diuapkan dengan rotavapor dan diperoleh ekstrak kental etanol 70%. Ekstrak yang sudah kering, ditimbang beratnya dan disimpan dalam eksikator. Ekstrak tersebut dilakukan uji aktivitas anti-osteoporosis *in vivo* yang disertai dengan kombinasi latihan fisik.

Induksi deksametasone

Mencit betina yang sudah tidak mengalami menopause akan dilakukan induksi dengan deksametason secara peroral 1 x sehari selama kurang lebih 1 bulan. Sediaan tersebut dibuat dengan melarutkan Deksametason pada larutan CMC-NA yang telah didispersikan dengan aquadest. Larutan Deksametason ini diberikan secara peroral pada mencit yang akan dilakukan uji aktivitas.

Pemeriksaan Ulas Vagina

Mencit yang telah mendapatkan deksametason kemudian dilakukan pemeriksaan terhadap ulas vagina dari masing-masing, yaitu membersihkan vulva mencit dengan menggunakan aquadest, membasahi *cotton swab* dengan air dan hisap air dengan pipet, kemudian dimasukkan pipet ke dalam lubang vagina, melakukan pemutaran secara halus dalam lubang vagina tersebut, menyemprotkan air ke dalam vagina dan dilakukan penghisapan kembali air dengan pipet, *Cotton swab* dikeluarkan dan dioleskan dipermukaan gelas obyek, air diteteskan ke permukaan gelas obyek, mMembilas gelas obyek dengan air secara perlahan-lahan dan meneteskan giemsa secara merata pada gelas obyek, kemudian diamkan kurang lebih 2-3 menit, membilas gelas obyek dengan air mengalir secara perlahan-lahan dan mengeringkannya dan mengamati preparat tersebut di bawah mikroskop dengan pembesaran 400.

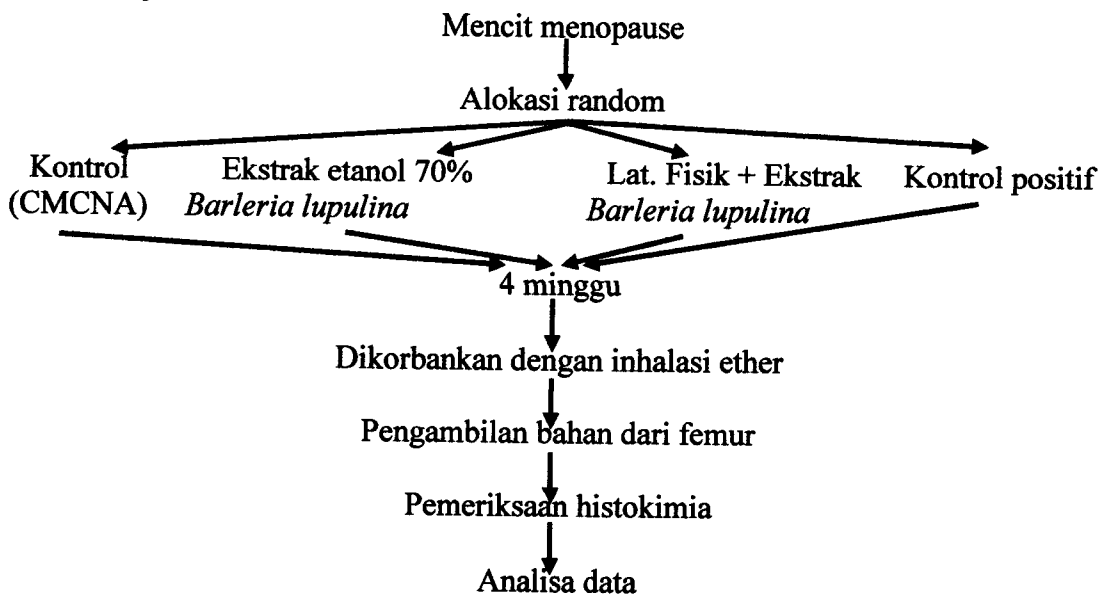
Mencit betina menopause adalah mencit betina *Mus musculus* galur Swiss yang sudah tidak bersiklus, tidak melalui fase proestrus, estrus, metestrus dan diestrus, yang diketahui dengan pemeriksaan ulas vagina mencit 3 x berturut-turut setiap 12 jam dan diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000 x. Fase menopause ditandai gambaran sel basal dan parabasal yang menetap setelah pemeriksaan berturut-turut 3 x setiap 2 x sehari.

Uji Aktivitas Ekstrak etanol 70% Landik dan Latihan Fisik

Setelah mencit mengalami osteoporosis (pengeroposan tulang) Karen diinduksi oleh deksametason, mencit dikelompokkan dengan metode randomisasi menjadi empat kelompok. Tujuan randomisasi adalah untuk mengurangi variasi berat badan mencit pada saat perlakuan, yaitu :

1. Kelompok kontrol (-) : 7 ekor mencit masing-masing diberikan secara per oral suspensi CMC-Na
2. Kelompok kontrol (+) : 7 ekor mencit masing-masing diberikan secara per oral suspensi aledronat sebanyak 0,02 cc 1 x setiap hari
3. Kelompok uji I : 7 ekor mencit masing-masing disuntikkan sediaan bahan uji (ekstrak etanol 70% landik) dosis 2,8 mg/20 g BB
4. Kelompok uji II : 7 ekor mencit masing-masing disuntikkan sediaan bahan uji (ekstrak etanol 70% landik) dosis 2,8 mg/20 g BB dengan disertai latihan fisik
 Pada kelompok uji II, dilakukan latihan fisik dengan pembebanan aksial merupakan latihan berjalan dengan menggunakan sarana treadmill untuk mencit tanpa elevasi dengan progresifitas intensitas yaitu:
 - Minggu I didahului 15 menit dengan kecepatan 7 m/menit, dilanjutkan 30 menit dengan kecepatan 11 m/menit dan diakhiri 15 menit dengan kecepatan 7 m/menit
 - Minggu II didahului 10 menit dengan kecepatan 7 m/menit, 40 menit dengan kecepatan 11 m/menit dan diakhiri 10 menit dengan kecepatan 7 m/menit.
 - Minggu III dan IV intensitas latihan dinaikkan menjadi 5 menit dengan kecepatan 7 m/menit, diikuti 50 menit dengan kecepatan 11 m/menit dan diakhiri 5 menit dengan kecepatan 7 m/menit.
 - Perlakuan latihan ini diberikan dengan frekuensi 3 x seminggu selama 4 minggu.

Skema kerja:



HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Simplisia *Barleria lupulina*

Dari 50 g simplisia *Barleria lupulina* dilakukan proses maserasi dengan menggunakan etanol 70% sebanyak 300 ml selama 3 kali, dan diperoleh hasil ekstrak etanol70% daun tersebut sebanyak 5.0 g.

Pengukuran Berat Badan Mencit

Sebelum dan saat dilakukan perlakuan, maka kondisi berat badan dari mencit harus tetap diperhatikan untuk memantau pengaruh perlakuan terhadap kondisi secara

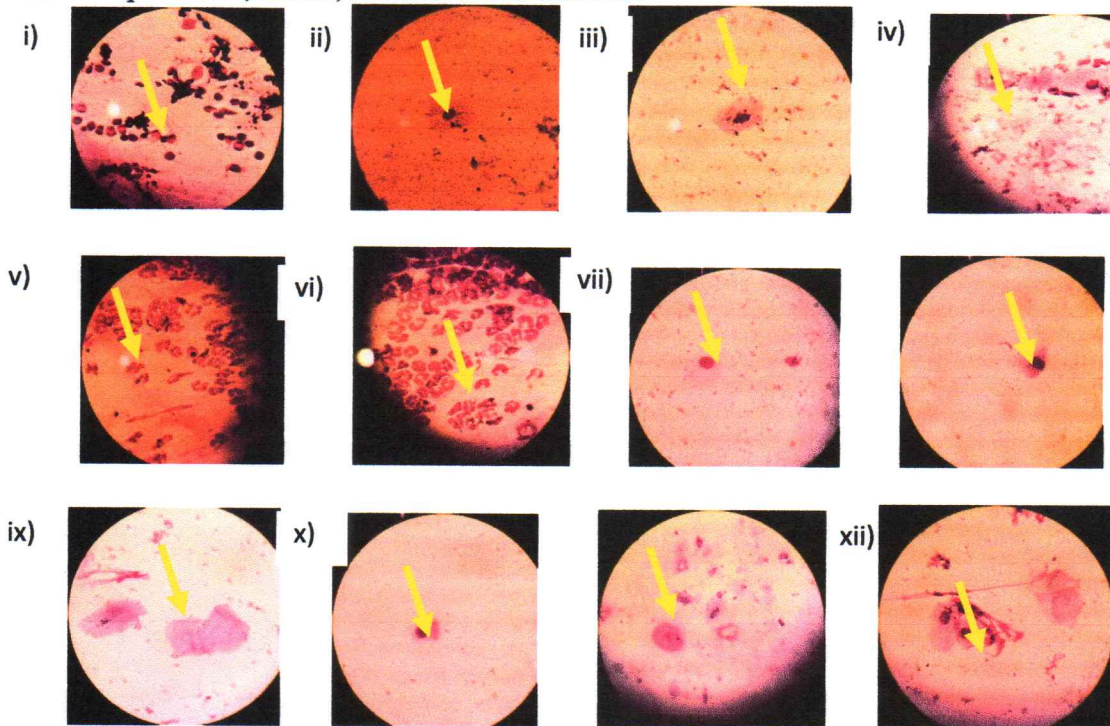
fisik dari mencit. Dari hasil tabel 1. terlihat bahwa kondisi berat badan mencit cenderung menurun dibandingkan sebelum dilakukan perlakuan.

Tabel 1. Data Pengukuran Berat Badan Mencit Pada setiap Minggu

No.	Kelompok	Minggu				
		I	II	III	IV	V
1.	A	33	21	26	26	26
2.		36	33	28	28	25
3.		33	27	25	27	20
4.		27	26	26	25	23
5.		34	43	28	28	22
6.		31	32	31	31	29
7.	B	31	35	34	33	29
8.		32	29	28	28	26
9.		24	23	21	24	20
10.		25	20	19	21	18
11.		42	32	28	28	23
12.		30	28	27	26	24

Pengamatan Hasil Ulas Vagina

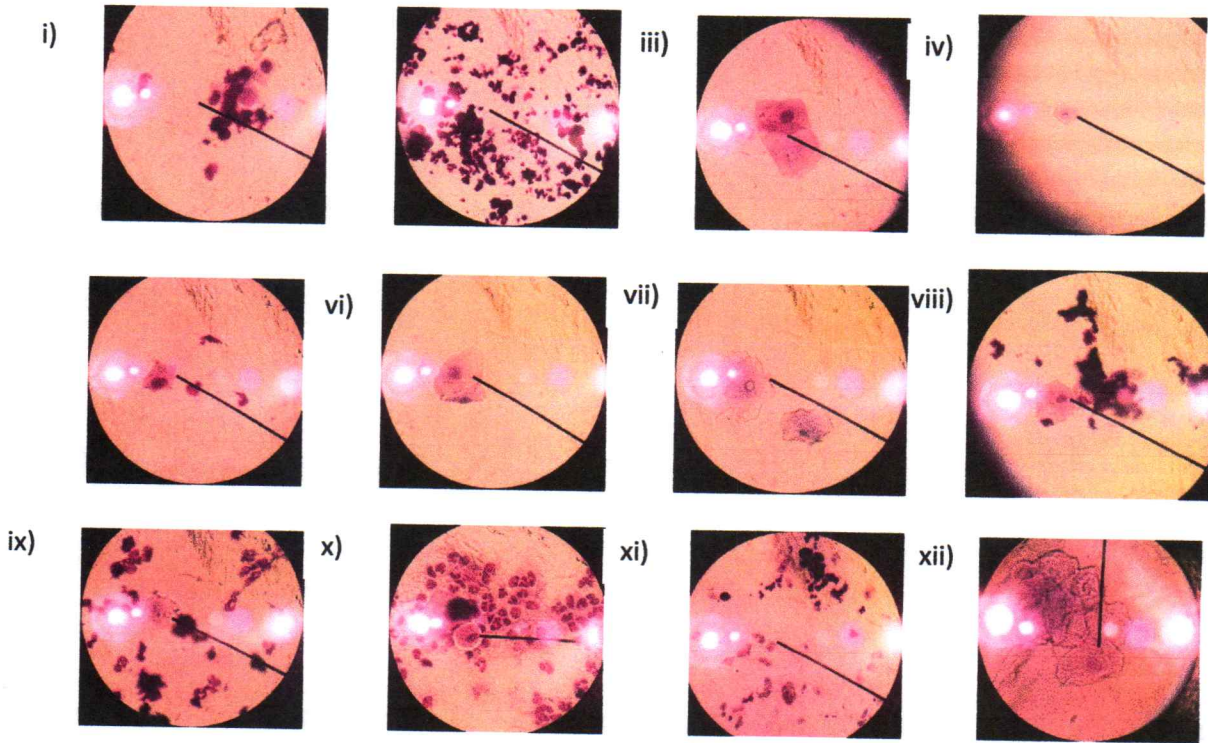
Dalam penelitian ini dibutuhkan mencit dalam kondisi menopause karena secara beriringan kondisi tersebut dapat menyebabkan pengeroposan pada tulang (osteoporosis). Pemberian deksametason terhadap mencit selama 1 bulan dapat menyebabkan terjadinya menopause karena siklus hormonnya akan terganggu dan berubah dari kondisi proestrus, estrus, metestrus dan diestrus.



Gambar 1. Hasil Pengamatan Ulas Vagina Pada Minggu ke-3, i) kontrol: proestrus; ii), iii), iv), vii), viii), ix), x), xi) dan xii) estrus; v) metestrus dan vi) diestrus

Hasil pengamatan ulas vagina mencit yang diberi perlakuan deksametason pada minggu ke-3 dapat dilihat pada gambar 2. Dari gambar tersebut terlihat bahwa sebagian mencit mengalami siklus estrus. Untuk melihat perkembangan lebih lanjut dari siklus

hormon dalam mencit, pada penelitian ini kami mencoba meneruskan pemberian deksametason sampai dengan minggu ke-5.

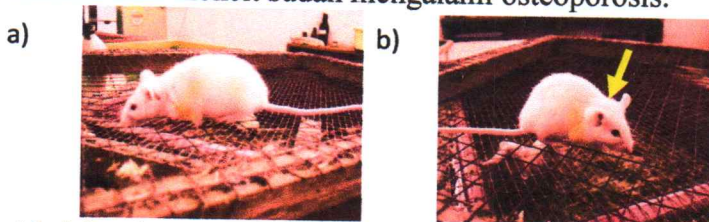


Gambar 2. Hasil Pengamatan Ulas Vagina Pada Minggu ke-5, i) kontrol: proestrus; ii) diestrus; iii), iv), v), vi), vii), viii), xi), xii) estrus; ix), dan x) metestrus

Dari hasil pengamatan ulas vagina yang diperoleh pada gambar 5.2. hampir semua mencit berada pada siklus estrus dan ada 1 ekor mencit yang mati setelah mengalami fase diestrus. Pada awal sebelum kematiannya, mencit tersebut mengalami kebengkokan pada tulang belakang. Oleh karena itu diambil kesimpulan bahwa mencit sudah memasuki masa menopause dan perlakuan terhadap sampel mulai dilakukan.

Hasil Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 70% dari tanaman landik (*Barleria lupulina*) dalam Menghambat Peningkatan Remodeling Tulang yang Disertai Latihan Fisik

Uji aktivitas ekstrak etanol 70% dari tanaman landik dilakukan setelah mencit mengalami masa menopause. Kondisi menopause ini dapat diamati dengan melakukan pemeriksaan ulas vagina. Berdasarkan hasil ulas vagina hampir semua mencit sudah memasuki siklus minimum estrus dan ditandai dengan membungkuknya bagian tengkuk dari mencit. Jadi mencit sudah mengalami osteoporosis.

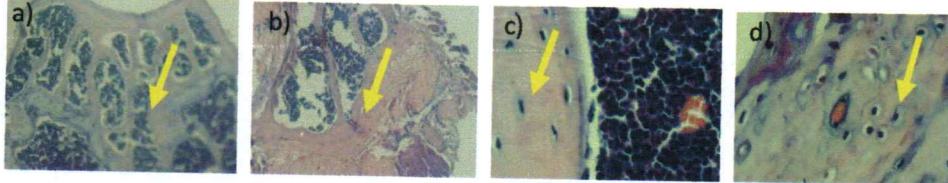


Gambar 3. (a) Mencit normal dan (b) mencit osteoporosis yang ditandai dengan kebengkokan pada tulang belakang

Kemudian dilakukan perlakuan dengan memberikan ekstrak etanol 70% *Barleria lupulina* baik yang disertai latihan fisik ataupun tidak selama 30 hari. Setelah 30 hari, tulang femur mencit dilakukan pembedahan yang kemudian tulang tersebut dilakukan dekalsifikasi dan staining untuk mempermudah pengamatan morfologi tulangnya (kerapatan tulang dan sel osteoblas).

Hasil pengamatan morfologi tulang femur:

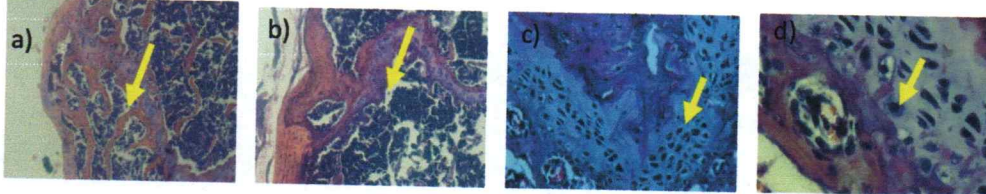
1. Kontrol negatif



Gambar 4. Morfologi tulang femur kelompok kontrol negatif: a) dan b) matriks tulang pembesaran 100x dan 400x , c) dan d) sel osteoblas

Secara morfologi tulang femur mencit kelompok kontrol negatif mengalami pengeroposan tulang akibat pemberian deksametason selama 1 bulan. Dari gambar diatas terlihat bahwa jumlah sel osteoblas sangat sedikit bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (gambar 4c dan 4d) sedangkan matriks tulang didalam tulang femur terdapat kerenggangan antar selnya (gambar 4a dan 4b).

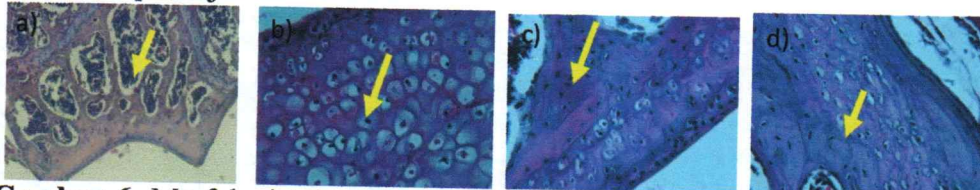
2. Kontrol positif



Gambar 5. Morfologi tulang femur kelompok kontrol positif: a) dan b) matriks tulang, c) dan d) sel osteoblas

Pada kontrol positif, hewan coba (mencit) diberi perlakuan dengan pemberian aledronate secara per-oral. Aledronate merupakan obat yang biasa digunakan pada pasien yang menderita osteoporosis. Secara morfologi matriks tulang femur pada kelompok kontrol positif ini tersusun sangat rapat (gambar 5a dan 5b). Selain itu terlihat juga bahwa jumlah sel osteoblasnya lebih banyak bila dibandingkan dengan kontrol negatif (gambar 5c dan 5d).

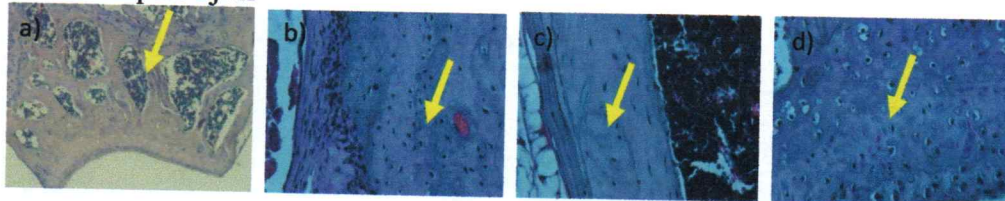
3. Kelompok Uji I



Gambar 6. Morfologi tulang femur kelompok uji I (ekstrak etanol 70% landik): a) matrik tulang, b), c) dan d) sel osteoblas

Kelompok uji I merupakan kelompok uji dengan pemberian ekstrak etanol 70% *Barleria lupulina* per oral yang pada penelitian sebelumnya diperoleh hasil mampu menstimulasi enzim alkaline fosfatase (marker dari sel osteoblas). Secara morfologi matriks tulang femur dari kelompok uji I ini tersusun secara rapat antar selnya (gambar 6a). Bila dibandingkan dengan kontrol negatif maka kelompok uji I ini mempunyai susunan yang lebih rapat, selain itu sel osteoblas juga terlihat jumlahnya banyak dibandingkan dengan kontrol negatif (hampir sama dengan kontrol positif). Sehingga bisa disimpulkan bahwa ekstrak etanol 70% *Barleria lupulina* mampu meningkatkan kerapatan tulang dan jumlah sel osteoblas secara morfologi.

4. Kelompok Uji II



Gambar 7. Morfologi tulang femur kelompok uji II (ekstrak etanol 70% landik disertai treadmill latihan fisik), a) matrik tulang, b), c) dan d) sel osteoblas

Kelompok uji II adalah kelompok uji dengan pemberian ekstrak etanol 70% *Barleria lupulina* per oral yang disertai dengan latihan fisik pada treadmill. Secara morfologi matriks tulang femur dari kelompok uji ini tersusun sangat rapat antar selnya dan selain itu jumlah sel osteoblas dari kelompok ini juga meningkat dibandingkan dengan kontrol negatif. Berdasarkan gambar 6 dan 7 secara visual bahwa jumlah sel osteoblas dari kelompok uji II lebih banyak dibandingkan dengan kelompok uji I. Jadi adanya tambahan latihan fisik memberikan dampak kerapatan pada matriks tulang dan meningkatkan jumlah sel osteoblas. Namun demikian untuk memeperkuat hasil penelitian ini perlu dilakukan penghitungan jumlah sel osteoblas secara kuantitatif dan analisa secara statistika.

KESIMPULAN

- Pemberian ekstrak etanol 70% *Barleria lupulina* yang disertai dengan kombinasi latihan fisik pada mencit mamberikan gambaran kerapatan matriks tulang dan peningkatan jumlah osteoblas secara morfologi dibandingkan dengan kontrol negatif
- Metode uji *in vivo* pada aktivitas anti-osteoporosis dilakukan dengan menginduksi mencit dengan deksametason sehingga mengakibatkan mencit memasuki siklus estrus dan tulang punggung menjadi bengkok. Hal ini mengindikasikan kondisi tulang mencit telah mengalami pengeroposan (osteoporosis)

UCAPAN TERIMA KASIH

Saya mengucapkan terima kasih kepada DP2M Dikti dan ketua LPPM Unair yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk melakukan penelitian Hibah Bersaing

DAFTAR PUSTAKA

Balbona, E.J., 2000, **Osteoporosis Screening**. Jacksonville Medicine (Supplement): 9 –

- Franceschi RT, Young J., 1990, Regulation of Alkaline Phosphatase by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and Ascorbic acid in Bone-derived Cells. **J Bone Miner Res**; 5:1157–1167
- Girotra, M., Rubin, M.R., Bilezikian, J.P., 2006, The use of parathyroid hormone in the treatment of osteoporosis. **Rev. Endocr. Metab. Disord.** 7, 113–121.
- Hanafiah, K., 2004, **Rancangan Percobaan**. Teori dan Aplikasi. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada, 5–12
- Irwan, M., 2008, **Osteoporosis**, Fakultas Kedokteran Universitas Riau. RSUD Arifin Arifin Achmad Pekanbaru.
- Jennifer, JW., 2008, **Methods in Molecular Biology. Osteoporosis Methods and Protocol**. Human Press, p 5
- Laswati, H., 2007, Kombinasi Latihan Fisik dan Pemberian Daun Semanggi Menghambat Peningkatan Ketidakseimbangan Proses Remodeling Tulang Perempuan Pascamenopause melalui Peran Reseptor Estrogen α Sel Osteoblas. **Disertasi**, Program Pascasarjana Universitas Airlangga
- Retno, W., 2009a, Chemical Constituents of *Barleria lupulina* and Their Alkaline Phosphatase Stimulatory Activity, **thesis**, University of Toyama
- Retno, W., 2009b, Uji Aktivitas Alkaline Phosphatase dari Fraksi *Graptophyllum pictum* dan *Spilanthes acmella* terhadap sel MC3T3-E1 sebagai marker diferensiasi sel osteoblast, **Laporan Dosen Muda**, Fakultas Farmasi Unair
- Stevenson, J., and Marsh, M., 2007, **An Atlas of Osteoporosis. Informa Healthcare**,
- Wanikiat, P., Panthong, A., Sujayanon, P., Yoosook, C., Rossi, A.G., Reutrakul, V., 2008, The anti-inflammatory effects and the inhibition of neutrophil responsiveness by *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans* extracts. **Journal of Ethnopharmacology** 116, 234 - 244.
- Wu, J., Wang, X.X., Chiba, H., Higuchi, M., Takasaki, M., Ohta, A., Ishimi, Y., 2003, Combined Intervention of Exercise and Genistein Prevented Androgen Deficiency-Induced Bone Loss in Mice. **J. Appl. Physiol.** 94, 335–342
- Yoosok, C., Panpisutcai, Y., Chaichana, S., Santisuk, C., Reutrakul, V., 1999, Evaluation of anti-HSV-2 activity of *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans*. **Journal of Ethnopharmacology**, 179 - 187.

C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN

Bagan Alir Penelitian (Tahun II)

