

# PROLIFERASI DAN DIFERENSIASI SEL TULANG TIKUS DALAM MEDIUM KULTUR *IN VITRO* YANG MENGANDUNG EKSTRAK BATANG *Cissus quadrangula* Salisb. (SIPATAH-PATAH)

## *The Proliferation and Differentiation Rate of Rat Bone Cells in In Vitro Culture Medium Containing Cissus quadrangula Salisb. Extract*

Ita Djuwita<sup>1</sup>, Irma Amalia Pratiwi<sup>2</sup>, Adi Winarto<sup>1</sup>, dan Mustafa Sabri<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bagian Anatomi, Histologi, dan Embriologi, Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>2</sup>Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>3</sup>Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail: djuwitawiryadi@yahoo.com

### ABSTRAK

Penelitian mengenai pengaruh ekstrak batang *Cissus quadrangula* Salisb. (sipatah-patah) terhadap tingkat proliferasi dan diferensiasi sel-sel tulang tikus (*Sprague Dawley*) prepuber umur empat minggu menggunakan sistem kultur *in vitro*. Sel-sel tulang dikultur dalam medium *dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) yang diberi tambahan *newborn calf serum* (NBCS) 10%, *non essential amino acid* (NEAA) 10%,  $\text{NaHCO}_3$ , ITS 1  $\mu\text{l/ml}$  (mengandung insulin 5  $\mu\text{g/ml}$ , transferin 10  $\mu\text{g/ml}$ , selenium 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Sigma St Louis USA), dan 50  $\mu\text{g/ml}$  gentamisin (mDMEM), dengan dan tanpa ekstrak *Cissus quadrangula* (CQ). Penelitian terdiri atas lima perlakuan yakni kontrol positif (mDMEM + deksametason  $10^{-8}$  M), kontrol negatif (mDMEM), dan tiga konsentrasi CQ: mDMEM + CQ 0,3 mg/ml; mDMEM + CQ 0,6 mg/ml; dan mDMEM + CQ 1,2 mg/ml. Kultur dilakukan dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5%, pada suhu 37° C selama tujuh hari. Parameter yang diamati adalah konsentrasi sel, komposisi, diameter osteoblas, dan diameter osteosit. Konsentrasi sel dihitung menggunakan hemositometer Neubauer. Komposisi osteoblas dan osteosit ditentukan berdasarkan pengamatan morfologi di bawah mikroskop cahaya. Diameter sel diukur menggunakan *eyepiece micrometer*. Data dianalisis menggunakan analisis varians dan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Cissus quadrangula* Salisb. pada konsentrasi 0,3 mg/ml; 0,6 mg/ml; dan 1,2 mg/ml secara signifikan dapat meningkatkan proliferasi sel tulang; dan pada konsentrasi 0,6 mg/ml mampu menginduksi diferensiasi osteoblas menjadi osteosit ( $P < 0,05$ ). Disimpulkan bahwa pemberian ekstrak *Cissus quadrangula* pada konsentrasi 0,6 mg/ml ke dalam medium kultur dapat meningkatkan proliferasi dan diferensiasi osteoblas.

Kata kunci: *Cissus quadrangula* Salisb., proliferasi, diferensiasi, osteoblas

### ABSTRACT

Research has been conducted on *in vitro* culture of four weeks old rat (*Sprague Dawley*) bone cells in *dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) containing 10% *newborn calf serum* (NBCS), 10% *non essential amino acid* (NEAA),  $\text{NaHCO}_3$ , 1  $\mu\text{l/ml}$  ITS (containing insulin 5  $\mu\text{g/ml}$ , transferin 10  $\mu\text{g/ml}$ , selenium 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Sigma St Louis USA), and 50  $\mu\text{g/ml}$  gentamycin (mDMEM), with and without *Cissus quadrangula* Salisb. extracts (CQ). The experiment was set in five groups of treatment, consisted of positive control (mDMEM + dexamethasone  $10^{-8}$  M), negative control (mDMEM), and three concentrations of *Cissus quadrangula* extracts: mDMEM+CQ 0.3 mg/mL; mDMEM + CQ 0.6 mg/mL; and mDMEM + CQ 1.2 mg/mL. Cultures were done in 5%  $\text{CO}_2$  incubator at 37° C for seven days. The parameters observed were cells concentration, composition, diameter of osteoblast, and osteocytes. Bone cells concentration were counted using Neubauer hemocytometer. Osteoblast and osteocyte were determined based on morphology after hematoxylin staining. The cells composition were observed under light microscope and the diameter were measured using *eyepiece micrometer*. Data were analyzed using statistical ANOVA and Duncan test. The results showed that *Cissus quadrangula* Salisb. extract at concentration of 0.3 mg/mL, 0.6 mg/mL, and 1.2 mg/mL increased the bone cells proliferation ( $P < 0,05$ ) and at concentration of 0.6 mg/mL induced differentiation of osteoblast to osteocyte ( $P < 0,05$ ). In conclusion, addition of *Cissus quadrangula* Salisb extract at concentration of 0.6 mg/mL into the culture medium could increase the osteoblast proliferation and differentiation rate.

Key words: *Cissus quadrangula* Salisb., proliferation, differentiation, osteoblast

### PENDAHULUAN

Tulang merupakan bagian tubuh yang memiliki fungsi utama sebagai pembentuk rangka dan alat gerak tubuh, pelindung organ-organ internal, serta tempat penyimpanan mineral (kalsium-fosfat). Proses pembentukan tulang disebut dengan osifikasi. Proses osifikasi terjadi pada masa perkembangan fetus (prenatal) dan setelah individu lahir (postnatal). Pada tulang panjang perkembangan terjadi sampai individu mencapai dewasa.

Jaringan tulang bersifat dinamis karena secara konstan mengalami pembaharuan yang dikenal dengan proses remodeling. Remodeling tulang merupakan

suatu proses yang kompleks yang melibatkan resorpsi tulang yang diikuti dengan pembentukan tulang baru. Remodeling tulang ditujukan untuk pengaturan homeostasis kalsium, memperbaiki jaringan yang rusak akibat pergerakan fisik, kerusakan minor karena faktor stres dan pembentukan kerangka pada masa pertumbuhan (Hill dan Orth, 1998; Fernandez *et al.*, 2006).

Jaringan tulang memiliki tiga tipe sel yakni osteosit, osteoblas, dan osteoklas. Proses remodeling melibatkan osteoblas dan osteoklas melalui mekanisme signal parakrin dan endokrin. Osteoklas merupakan sel dengan beberapa inti sel dan berkembang dari *hematopoietic stem cells* serta memiliki fungsi dalam meresorpsi tulang, sedangkan osteoblas memiliki

fungsi sebagai penghasil matriks organik (yang terdiri atas protein kolagen dan nonkolagen) serta mengatur proses mineralisasi (kalsium-fosfat) pembentuk osteoid. Osteoblas berkembang dari osteoprogenitor yang terdapat di bagian dalam periosteum dan sumsum tulang (Orwoll, 2003).

Ketidakeimbangan antara resorpsi dan pembentukan tulang pada proses remodeling tulang dapat mengakibatkan kepadatan tulang berkurang sehingga dapat menimbulkan penyakit metabolik tulang (Seeman, 2003). Berkurangnya kepadatan sel tulang dapat diakibatkan oleh berkurangnya jumlah osteosit atau kurangnya kadar mineral, namun keduanya dapat mengakibatkan kerapuhan tulang (Manolagas, 2000). Proses diferensiasi osteoblas merupakan salah satu faktor penting dalam proses remodeling tulang. Proses proliferasi dan diferensiasi osteoblas diatur oleh *growth factor* (faktor pertumbuhan) yang dihasilkan oleh osteoblas. *Growth factor* yang berperan diantaranya *insulin growth factor* (IGF I dan II), *bone morphogenic proteins* (BMPs), *fibroblast growth factor* (FGF), dan *platelet-derived growth factor* (PDGF) (Chen *et al.*, 2004; Asahina *et al.*, 2007) yang bekerja secara autokrin dan parakrin, serta hormon estrogen (Hofbauer *et al.*, 1999; Ogita *et al.*, 2008).

Estrogen berperan penting dalam proses remodeling tulang. Pada wanita pascamenopause berkurangnya hormon estrogen mengakibatkan terjadinya osteoporosis (Manolagas, 2000; Compston, 2001; Manolagas *et al.*, 2002; Ott, 2002). Preparat estrogen sintesis yang digunakan untuk mengatasi osteoporosis memiliki efek samping timbulnya kanker (Davison dan Davis, 2003). Alternatif yang diupayakan untuk menekan efek samping estrogen sintesis dengan penggunaan bahan alami dari tanaman yang mengandung fitoestrogen (Dewell *et al.*, 2002; WHO, 2003; Poulsen dan Kruger, 2008). Tanaman *Cissus quadrangularis* Linn. salah satu tanaman yang mengandung fitoestrogen. Di India, Malaysia, dan Srilanka tanaman *Cissus quadrangularis* Linn. banyak digunakan untuk mengatasi sakit sendi dan osteoporosis (Shirwaikar *et al.*, 2003) dan terbukti dapat meningkatkan proses osteoblastogenesis (Muthusami *et al.*, 2011).

Di Indonesia, khususnya di Aceh, tanaman serupa namun beda spesies yaitu tanaman sipatah-patah (*Cissus quadrangula* Salisb.) telah digunakan secara tradisional untuk pengobatan beberapa penyakit diantaranya rematik dan patah tulang. Namun sejauh ini kajian ilmiah mengenai *Cissus quadrangula* Salisb. masih sangat terbatas. Hasil penelitian Sabri (2011) menunjukkan bahwa ekstrak etanol batang *Cissus quadrangula* Salisb. mengandung fitoestrogen dan telah terbukti secara *in vivo* dapat mencegah osteoporosis pada tikus betina prepubertas dan mengobati osteoporosis pada tikus ovariektomi. Penelitian ini ditujukan untuk menganalisis pemberian ekstrak batang *Cissus quadrangula* (Salisb.) dalam proses proliferasi dan diferensiasi sel tulang tikus muda prepubertas dengan menggunakan sistem kultur *in vitro*.

## MATERI DAN METODE

### Persiapan Kultur Sel Tulang

Medium kultur yang digunakan adalah *dubellco's modified eagle medium* (DMEM) yang diberi tambahan asam amino non-essensial (AANE; Sigma) 10%, *newborn calf serum* (NBCS) 10%, *sodium bicarbonat* ( $\text{NaHCO}_3$ ) 3,7  $\mu\text{g/ml}$ , gentamisin 50  $\mu\text{g/ml}$ , ITS 1  $\mu\text{l/ml}$  (yang mengandung insulin 5  $\mu\text{g/ml}$ , tranferin 10  $\mu\text{g/ml}$ , selenium 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Sigma St. Louis USA), disingkat dengan mDMEM.

Batang *Cissus quadrangula* (sipatah-patah) diperoleh dari Desa Lam Nga, Kecamatan Mesjid Raya, Kabupaten Aceh Besar, provinsi Nanggroe Aceh Darussalam, namun yang dipakai pada penelitian ini adalah ekstrak (metode maserasi etanol) yang siap pakai (Sabri, 2011) sedangkan untuk kontrol positif digunakan deksametason dengan konsentrasi  $10^{-8}$  M (Beloti dan Rosa, 2005; Guzman-Morales *et al.*, 2009).

Cawan petri (Corning®) yang digunakan diberi *cover glass* (kaca penutup) pada bagian dasarnya, kemudian dilapisi dengan 1 ml gelatin 0,1% dan didiamkan pada suhu kamar selama satu jam. Kemudian gelatin dibuang dan dicuci dengan *phosphate buffered saline* (PBS) dan didiamkan selama lima menit, kemudian diisi dengan medium perlakuan.

### Isolasi dan Kultur Sel Tulang

Sel tulang diisolasi dari tulang femur, tibia, dan fibula tikus (*Sprague Dawley*) umur empat minggu. Sumsum tulang dibuang dan tulang dibilas sampai bersih. Selanjutnya tulang dicacah hingga halus dan disuspensi di dalam PBS yang diberi tambahan NBCS 0,1% dan gentamisin 50  $\mu\text{g/ml}$  (atau mPBS) menggunakan spuit 1 cc. Suspensi tulang disentrifugasi dengan kecepatan 200 G selama 10 menit; pencucian dilakukan dalam mPBS dan mDMEM masing-masing sebanyak empat dan satu kali ulangan. Sebelum dikultur, jumlah sel dihitung menggunakan hemositometer *Improved Neubauer* dengan perhitungan total sel (sel/ml) adalah jumlah sel pada 5 kotak x faktor pengenceran x  $10^4$ . Sel dengan konsentrasi  $3 \times 10^4$  sel/ml dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi medium perlakuan sebanyak 2 ml. Kultur diinkubasi di dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5% pada suhu  $37^\circ \text{C}$ . Medium kultur diganti setiap dua hari sekali dan kultur dilakukan sampai hari ketujuh.

### Evaluasi Hasil Kultur Sel Tulang

#### Tingkat proliferasi

Setelah hari ketujuh medium kultur dibuang, kemudian sel hasil kultur didisosiasi menggunakan larutan tripsin 0,1% dalam PBS sebanyak 1 ml. Sel diinkubasi selama 5 menit sampai sel terlihat soliter. Suspensi sel disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 200 G di dalam mPBS. Selanjutnya sel dihitung menggunakan hemositometer *Improved Neubauer*. Tingkat proliferasi ditentukan dengan menghitung jumlah sel pada saat sebelum dikultur dan setelah kultur tujuh hari.

### Identifikasi Diferensiasi Osteoblas dan Osteosit

Identifikasi jumlah dan diameter sel-sel tulang yang dikultur dilakukan secara pengamatan morfologi setelah sel diwarnai dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin. Setelah hari ketujuh, kultur sel yang ditumbuhkan di atas gelas penutup dicuci dengan PBS kemudian difiksasi dalam larutan bufer paraformaldehid 4% selama 24 jam. Sel dicuci dengan aquades selama 10 menit sebanyak tiga kali perendaman, kemudian direndam dalam hematoksin selama 10 menit dan dibilas dengan aquades selama 5 menit. Selanjutnya direndam dalam eosin selama 5 menit, dibilas dengan aquades selama 5 menit, dan dilakukan dehidrasi bertingkat menggunakan alkohol. Setelah itu dilanjutkan dengan perendaman pada *xylol* dua kali ulangan masing-masing selama 10 menit, kemudian gelas penutup ditempelkan dengan gelas objek dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x10. Penghitungan jumlah osteoblas dan osteosit dilakukan pada 16 lapang pandang kemudian dipersentasekan dengan total sel yang dihitung. Perhitungan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan dan kemudian dirata-ratakan. Pengukuran diameter osteoblas dan osteosit dilakukan pada 20 sel dari masing-masing perlakuan menggunakan mikrometer *eyepiece* di bawah mikroskop pada pembesaran 40x10. Perhitungan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan dan kemudian dirata-ratakan.

### Rancangan Percobaan

Terdapat lima kelompok perlakuan yang terdiri atas kontrol negatif (mDMEM), kontrol positif (mDMEM + deksametason  $10^{-8}$  M), dan tiga konsentrasi ekstrak batang *Cissus quadrangula* (CQ) yakni mDMEM + CQ 0,3 mg/ml; mDMEM + CQ 0,6 mg/ml dan mDMEM + CQ 1,2 mg/ml. Masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Parameter yang diamati yaitu tingkat proliferasi dan *population doubling time* (PDT), jumlah osteoblas dan osteosit, serta diameter osteoblas dan osteosit. *Population doubling time* adalah waktu yang diperlukan oleh populasi sel untuk menjadikan jumlahnya dua kali dari jumlah semula yang dihitung berdasarkan Davis (2011). Data PDT, jumlah osteoblas, dan osteosit, serta diameter osteoblas dan osteosit dianalisis menggunakan analisis varians dan dilanjutkan dengan uji statistik Duncan.

### Tingkat Proliferasi dan *Population Doubling Time* (PDT)

Hasil kultur *in vitro* menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak batang *Cissus quadrangula* dan kontrol positif deksametason ke dalam medium kultur sel-sel tulang secara signifikan meningkatkan jumlah sel tulang dibandingkan kontrol negatif mDMEM (Tabel 1). Hal ini ditunjukkan pula dari nilai PDT pada perlakuan *Cissus quadrangula* 0,3 mg/ml; 0,6 mg/ml, dan 1,2 mg/ml serta deksametason berturut-turut masing-masing adalah 2,18±0,12 hari, 2,39±0,25 hari, 2,55±0,35 dan 2,34±0,22 secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan kontrol negatif yaitu 3,57±0,40.

**Tabel 1.** Tingkat proliferasi dan *Population Doubling Time* (PDT) sel tulang pada kultur yang diberi ekstrak batang *Cissus quadrangula* (Salisb.)

Perlakuan	Jumlah awal (10 <sup>4</sup> )	Jumlah akhir (10 <sup>4</sup> )	PDT (hari)
Kontrol positif	3,00	27,33 ± 5,86 <sup>a</sup>	2,34 ± 0,22 <sup>a</sup>
Kontrol negatif		13,33 ± 2,31 <sup>b</sup>	3,57 ± 0,40 <sup>b</sup>
CQ 0,3		31,33 ± 4,16 <sup>a</sup>	2,18 ± 0,12 <sup>a</sup>
CQ 0,6		26,33 ± 5,51 <sup>a</sup>	2,39 ± 0,25 <sup>a</sup>
CQ 1,2		23,67 ± 6,66 <sup>a</sup>	2,55 ± 0,35 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Huruf superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan nyata ( $P < 0,05$ ). Kontrol negatif (mDMEM); kontrol positif (mDMEM + deksametason  $10^{-8}$  M); ekstrak batang *Cissus quadrangula* atau CQ) CQ 0,3 (mDMEM + CQ 0,3 mg/ml); CQ 0,6 (mDMEM + 0,6 mg/ml); CQ 0,3 (mDMEM + CQ 1,2 mg/ml).

Secara alamiah, sel tulang memiliki nilai PDT sekitar 2-4 hari (Binderman *et al.*, 1974). Dengan demikian, pada kultur sel-sel tulang dalam medium kontrol negatif menunjukkan proliferasi sel berjalan normal sedangkan perlakuan ekstrak *Cissus quadrangula* dapat mempercepat proses proliferasi sel dan secara signifikan meningkatkan jumlah sel-sel tulang. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Potu *et al.* (2009) yang membuktikan bahwa penambahan ekstrak *Cissus quadrangularis* pada kultur sumsum tulang menyebabkan terjadinya proliferasi *bone marrow mesenchymal stem cell* (MSCs).

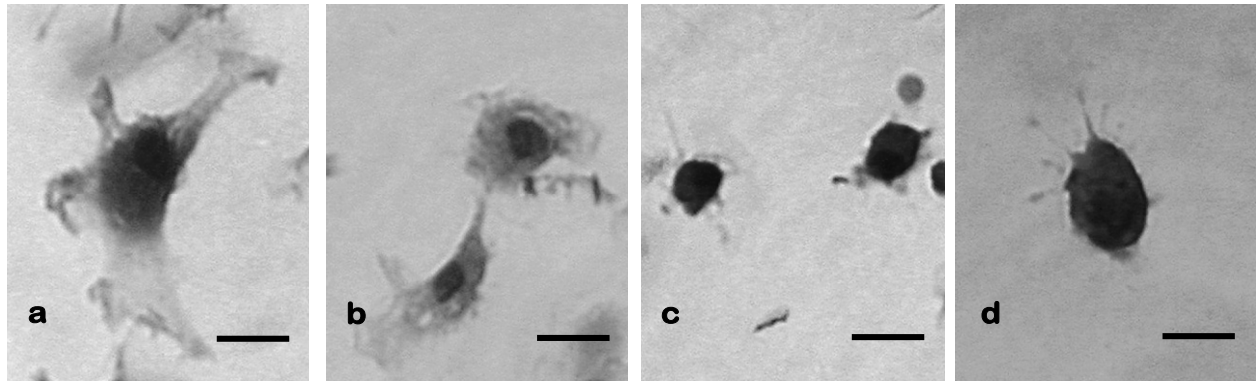
### Diferensiasi Sel Tulang

Salah satu tahapan dalam proses osteogenesis adalah proses diferensiasi (suatu proses transformasi atau perubahan sel ke dalam bentuk dan fungsi sel yang baru) yakni perubahan osteoblas menjadi osteosit. Terjadinya proses diferensiasi dapat diketahui antara lain dari perubahan morfologi dan diameter sel tulang, serta persentase jumlah osteoblas dan osteosit dalam populasi kultur sel tulang.

### Morfologi

Hasil kultur sel tulang tikus menunjukkan bahwa secara morfologi terdapat dua (2) tipe sel yakni osteoblas dan osteosit (Gambar 1A, 1D). Osteoblas memiliki morfologi poligonal, berukuran besar dengan inti yang besar; sedangkan osteosit berukuran kecil dan memiliki penjururan sitoplasma. Disamping itu terdapat pula bentuk antara osteoblas dan osteosit dengan ukuran bervariasi (Gambar 1B, 1C) yang mengindikasikan terjadinya proses diferensiasi osteoblas menjadi osteosit.

Dalam keadaan aktif, osteoblas merupakan sel yang berbentuk kubus atau kolumnar sedangkan dalam keadaan tidak aktif berbentuk pipih (Kierszenbaum, 2002). Osteosit merupakan sel dewasa yang memiliki aparatus golgi dan retikulum endoplasma kasar yang lebih sedikit tetapi memiliki jumlah lisosom yang lebih banyak serta memiliki penjururan pada sitoplasma (Stevenson dan Marsh, 1992). Transformasi osteoblas menuju osteosit melibatkan perubahan morfologi



**Gambar 1.** Morfologi sel tulang dalam medium kultur. (A) Osteoblas, (B) Osteoblas mengecil, (C) Osteosit, (D) Osteosit muda. Pewarnaan HE. Bar: 20µm.

seperti penurunan ukuran diameter sel, peningkatan proses intraseluler, dan perubahan dalam organel-organel intraseluler.

**Diameter Osteoblas dan Osteosit**

Pada kontrol negatif, diameter osteoblas dan osteosit masing-masing adalah 20,46±3,20 dan 12,33 ± 1,01 µm (Tabel 2). Ukuran tersebut sesuai dengan kisaran ukuran normal diameter osteoblas menurut Kierszenbaum (2002) yakni 20-30 µm sedangkan diameter osteosit menurut Kogianni dan Noble (2007) berukuran sekitar 9-20 µm.

**Tabel 2.** Diameter osteoblas dan osteosit yang tumbuh dalam medium yang diberi ekstrak batang *Cissus quadrangula*

Perlakuan	Osteoblas (µm)	Osteosit (µm)
Kontrol positif	19,51 ± 2,08 <sup>a</sup>	12,33 ± 1,01 <sup>b</sup>
Kontrol negative	20,46 ± 3,20 <sup>b</sup>	11,60 ± 1,84 <sup>a</sup>
CQ 0,3	19,50 ± 1,72 <sup>a</sup>	12,16 ± 1,02 <sup>b</sup>
CQ 0,6	19,24 ± 1,70 <sup>a</sup>	12,54 ± 1,25 <sup>b</sup>
CQ 1,2	19,75 ± 2,38 <sup>ab</sup>	12,56 ± 0,71 <sup>b</sup>

<sup>a, ab, b</sup> Huruf superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan nyata (P<0,05).

Dibandingkan dengan kontrol negatif, diameter osteoblast pada perlakuan CQ 0,3; CQ 0,6; dan CQ 1,2 menunjukkan terjadinya penurunan yakni masing-masing adalah 19,50±1,72; 19,24±1,70; dan 19,75±2,38 µm, sedangkan diameter osteosit pada perlakuan CQ 0,3; CQ 0,6; dan CQ 1,2 masing-masing adalah 12,16±1,02; 12,54±1,25; dan 12,56 ± 0,71 µm lebih besar dibandingkan dengan pada kontrol negatif yakni 11,60±1,84 µm. Perubahan diameter baik osteoblas maupun osteosit pada perlakuan CQ sejalan dengan pada kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa pada perlakuan penambahan ekstrak CQ dan deksametason telah terjadi proses diferensiasi yang ditunjukkan dari terjadinya perubahan diameter osteoblas dan osteosit. Namun demikian perubahan diameter ini tidak menunjukkan perbedaan signifikan karena proses diferensiasi (termasuk perubahan diameter ukuran) terjadi secara bertahap dan tidak bersamaan di antara populasi sel osteoblas tersebut.

Salah satu bentuk sel pada tahapan diferensiasi antara osteoblas menuju osteosit adalah yang disebut osteosit muda atau preosteosit. Sel ini berukuran lebih besar dibandingkan osteosit matang dan memiliki aparatus golgi yang berkembang dengan sangat baik (Dallas dan Bonewald, 2010). Beberapa studi menunjukkan bahwa ukuran osteosit berbeda-beda tergantung pada tipe tulang dan aktivitas serta ukuran dari osteoblas. Bahkan bentuk dan ukuran osteosit yang baru tertanam dalam tulang dapat bervariasi. Hal ini tergantung pada umur masing-masing osteosit dan tingkat kematangan osteosit (Dallas dan Bonewald, 2010).

**Komposisi Jumlah Osteoblas dan Osteosit**

Pemberian ekstrak pada dosis CQ 0,6 menunjukkan persentase jumlah osteoblas terendah yakni sebesar 62,90±15,93 dan persentase jumlah osteosit tertinggi sebesar 37,09±15,93 (Tabel 3). Dibandingkan dengan kontrol positif dan negatif, persentase osteoblas pada dosis CQ 0,6 secara signifikan menurun dan persentase osteosit semakin meningkat (P<0,05). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak batang *Cissus quadrangula* menginduksi terjadinya proses diferensiasi osteoblas menjadi osteosit.

**Tabel 3.** Persentase osteoblas dan osteosit yang tumbuh dalam medium yang diberi ekstrak batang *Cissus quadrangula*

Perlakuan	Osteoblas (%)	Osteosit (%)
kontrol positif	82,73 ± 4,07 <sup>b</sup>	17,27 ± 4,07 <sup>a</sup>
kontrol negatif	83,41 ± 2,91 <sup>b</sup>	16,58 ± 2,91 <sup>a</sup>
CQ 0,3	69,00 ± 11,26 <sup>ab</sup>	30,99 ± 11,26 <sup>ab</sup>
CQ 0,6	62,90 ± 15,93 <sup>a</sup>	37,09 ± 5,93 <sup>b</sup>
CQ 1,2	72,64 ± 7,19 <sup>ab</sup>	27,34 ± 7,19 <sup>ab</sup>

<sup>a, ab, b</sup> Huruf superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan nyata (P<0,05).

Osteosit merupakan sel akhir dari diferensiasi osteoblas (Kogianni dan Noble, 2007). Proporsi dari osteoblas dipengaruhi antara lain oleh spesies hewan, umur, tipe tulang, hormon, dan status penyakit (Dallas dan Bonewald, 2010).

Banyak faktor yang dapat menimbulkan ekspresi dari sifat osteoblas dalam kultur antara lain medium kultur yang digunakan, waktu kultur dan adanya komponen yang dapat menyebabkan sel berproliferasi dan berdiferensiasi. Komponen tersebut antara lain dapat berupa hormon maupun faktor pertumbuhan.

Salah satu komponen yang terkandung dalam ekstrak batang *Cissus quadrangula* adalah fitoestrogen (Sabri 2011) yang terdiri atas beberapa senyawa antara lain isoflavin, lignin, *coumestan*, triterpen, asiklik, dan *glucosides* (Jainu dan Devi, 2006). Isoflavin memiliki kemampuan dalam mengikat reseptor estrogen- $\beta$  dalam osteoblas dan menstimulasi proliferasi osteoblas (Yamaguchi 2002; Song *et al.*, 2011). Disamping itu fitoestrogen mampu meningkatkan produksi *insulin-like growth factor* (IGF-1) yang memiliki hubungan positif terhadap pembentukan massa tulang (Rahman *et al.*, 1996). *Insulin-like growth factor* merupakan protein yang menyerupai hormon insulin endogen dan berperan penting dalam pertumbuhan dan metabolisme sel. *Insulin-like growth factor* juga berperan dalam proliferasi sel dan menghambat kematian sel (Hill *et al.*, 1997). Kandungan fitoestrogen yang terdapat dalam ekstrak batang *Cissus quadrangula* dipercaya dapat meningkatkan proliferasi sel tulang.

Isoflavin yang terkandung dalam fitoestrogen akan berikatan dengan reseptor estrogen  $\beta$  yang terdapat pada osteoblas dan menginduksi terjadinya proses diferensiasi osteoblas melalui aktivasi *transforming-growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) (Kim *et al.*, 1998). *Transforming-growth factor  $\beta$*  merupakan salah satu protein yang berfungsi sebagai faktor pertumbuhan yang berperan dalam proliferasi, determinan, diferensiasi, motilitas, dan kematian sel. *Transforming-growth factor  $\beta$*  *transforming-growth factor  $\beta$*  akan mempengaruhi kerja enzim tirosin kinase yang merupakan enzim penting dalam pertumbuhan dan diferensiasi sel (Massague, 1998). Menurut Pradel *et al.* (2008), kandungan vitamin C dapat mengoptimalkan peningkatan diferensiasi sel tulang yang dikultur. Oleh karena itu, kandungan isoflavin dan vitamin C yang terdapat dalam ekstrak tanaman sipatah-patah dapat menginduksi terjadinya proses diferensiasi osteoblas menjadi osteosit pada kultur. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Potu *et al.* (2009), bahwa penambahan ekstrak *Cissus quadrangularis* Linn. ke dalam kultur MSCs dapat menstimulasi proliferasi dan diferensiasi MSCs menjadi osteoblas. Diferensiasi MSCs menjadi osteoblas melalui jalur Wnt-LRP- $\beta$ -catenin. *Wnt-signaling pathway* merupakan protein yang berperan dalam perkembangan embrio dan diferensiasi sel bekerja sama dengan *low density lipoprotein receptor related protein 5* (LRP5) dan  $\beta$ -catenin (Akiyama, 2000).

Berdasarkan data-data yang diperoleh, pemberian ekstrak *Cissus quadrangula* dapat meningkatkan proliferasi dan diferensiasi terhadap sel tulang tikus yang dikultur. Kandungan fitoestrogen yang berasal dari ekstrak dapat meningkatkan proliferasi osteoblas dan meningkatkan diferensiasi osteoblas menjadi

osteosit sehingga pembentukan tulang dapat terjadi dengan cepat dan diharapkan kepadatan tulang juga akan semakin meningkat.

## KESIMPULAN

Penambahan ekstrak batang *Cissus quadrangula* (Salisb.) dengan konsentrasi 0,6 mg/ml ke dalam medium kultur dapat meningkatkan proliferasi dan menginduksi terjadinya diferensiasi osteoblas menjadi osteosit.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akiyama, T. 2000. Wnt/beta-batenin signaling. **Cytokine Growth Factor Rev.** 11(4):273-283.
- Asahina, A.H., Y. Yamazaki, M. Uchida, Y. Shinohara, M.J. Honda, H. Kagami, and M. Ueda. 2007. Effective bone engineering with periosteum-derived cells. **J. Dental. Res.** 86(1):79-83.
- Beloti, M.M. and A.I.Rosa. 2005. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. **Braz. Dent. J.** 16(2):156-161.
- Binderman, I., D. Duksin, A. Harell, E. Katzir, and L. Sachs. 1974. Formation of bone tissue in culture from isolated bone cells. **J. Cell Biology** 61:427-439.
- Chen, D., M. Zhao, and G.R. Mundy. 2004. Bone morphogenetic proteins. **Growth Factors** 22: 233-241.
- Compston, J.E. 2001. Sex steroids and bone. **Physiol. Rev.** 81:419-447.
- Dallas, S.L. and L.F. Bonewald. 2010. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. **NIH Public Access** 1192:437-443.
- Davison, S. and S.R. Davis. 2003. Hormone replacement therapy: Current controversies. **Clin Endocrinology** 58:249-261.
- Davis, J.M. 2011. Basic techniques and media, the maintenance of cell lines, and safety. In **Animal Cell Culture Essential Methods**. John M.D. (Ed). John Wiley and Sons Ltd. UK.
- Dewell A., B.H. Clarie, and B. Bonnie. 2002. The effect of soy-derived phytoestrogens on serum lipids and lipoprotein in moderately hypercholesterolemic postmenopausal women. **J. Clin. Endocrin. Metab.** 87(1):118-121.
- Fernandez, I., M.A.A. Gracia, M.C. Pingarron, and L.B. Jerez. 2006. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. **Med, Oral Patol, Cir, Bucal.** 11:E151-157.
- Guzman-Morales, J., H. El-Gabalawy, M.H. Pham, N. Tran-Khanh, M.D. McKee, W. Wu, M.Centola, and C.D. Hoemann. 2009. Effect of chitosan particles and dexamethasone on human bone marrow stromal cell osteogenesis and angiogenic factor secretion. **J. Elsevier bone** (45): 617-626.
- Hill, P.A., A. Tumbler, and M.C. Meikle. 1997. Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. **Endocrinology** 138:3849-3858.
- Hill, P.A. and M. Orth. 1998. Bone remodelling. **British Journal of Orthodontic** 25:101-107.
- Houfbauer, L.C., S. Khosla, C.R. Dunstn, D.L. Lacey, T.C. Spelsberg, and B.L. Riggs. 1999. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. **Endocrinology** 140:4367-4370.
- Jainu, J.M, and C.S.S Devi. 2006. Gastroprotective effect of *Cissus quadrangularis* extract in rats with experimentally induced ulcer. **Indian J. Med. Res.** 123:799-806.
- Kierszenbaum, A.L. 2002. **Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology**. Mosby. Inc. An Affiliate of Elsevier. St. Louis
- Kim, H., T.G. Peterson, and S. Barnes. 1998. Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: Emerging role for its effects via transforming growth factor  $\beta$  signaling pathways. **Am. J. Clin. Nutr.** 68:1418S-25S.
- Kogianni, G. and B.S. Noble. 2007. The biology of osteocytes. **Current Medicine Group LLC** 5:81-86.
- Manolagas, S.C. 2000. Birth and death of bone cells; basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocrine Review** 21(2):115-137.

- Manogalas, S.C., S. Kousteni and R.L. Jilka. 2002. Sex steroids and bone. **Recent Prog. Horm. Res.** 57:385-409.
- Massague, J. 1998. TGF- $\beta$  signal transduction. **Annu. Rev. Biochem.** 67:753-91.
- Muthusami, S., K. Senthilkumar, C. Vignesh, R. Ilangovan, J. Stanley, N. Selvamurugan, and N. Srinivasan. 2011. Effects of *Cissus quadrangularis* on the proliferation, differentiation and matrix mineralization of human osteoblast like SaOS-2 cells. **Journal of Cellular Biochemistry** 112:1035-1045.
- Ogita, M., M.T. Rached, E. Dworakowski, J.P. Bilezikian, and S. Kousteni. 2008. Differentiation and proliferation of periosteal osteoblast progenitors are differentially regulated by estrogens and intermittent parathyroid hormone administration. **Endocrinology** 149(11):5713-5723.
- Orwoll, E.S. 2003. Toward an expanded understanding of the role of the periosteum in skeletal health. **J. Bone Miner. Res.** 18:949-954.
- Ott, S.M. 2002. Osteoporosis and bone physiology. **J. Am. Medic.** 228:334-341.
- Poulsen, R.C. and M.C. Kruger. 2008. Soy phytoestrogens: impact on postmenopausal bone loss and mechanism of action. **Nutrition Reviews** 66(7):359-374.
- Potu, B.K., M.R. Bhat Kumar, M.S. Rao, G.K. Nampurath, M.R. Chamallamudi, S.R. Nayak, and M.S. Muttigi. 2009. Petroleum ether extract of *Cissus quadrangularis* (Linn.) enhances bone marrow mesenchymal stem cell proliferation and facilitates osteoblastogenesis. **Clinical Science** 64(10):993-8.
- Pradel, W., R. Mai, T. Gedrange, and G. Lauer. 2008. Cell passage and composition of culture medium effects proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells from facial bone. **J. Physiol. Pharmacol.** 59(5):47-58.
- Rachman, I.A., A. Baziad, T.Z. Jacob, and H. Isbagio. 1996. Pengobatan estrogen dan progesterone pada osteoporosis pascamenopause. **Majalah Osbtetri dan Ginekologi Indonesia** 20(2):121-127.
- Sabri, M. 2011. Aktivitas Ekstrak Etanol Batang Sipatah-patah (*Cissus quadrangula Salisb.*) sebagai Antiosteoporosis pada Tikus (*Rattus norvegicus*). **Disertasi**. Pascasarjana IPB. Bogor
- Seeman, E. 2003. The structural and biochemical basis of the gain and loss of bone strength in women and men. **Endocrinol. Mrtab. Clin. Orth. Am.** 32:25-38.
- Shirwaikar, A.N., S. Khan, and S. Malini. 2003. Antiosteoporotic effect of ethanol extract of *Cissus quadrangularis* Linn. on ovariectomized rat. **J. Ethnopharmacol.** 89:245-250.
- Stevenson, J.S. and M.S. Marsh. 1992. **An Atlas of Osteoporosis**. New Jersey: Parthenon Publishing Group.
- Song, L., X. Zhang, and Y. Zhou. 2011. A synergistical role of 1,25-dihydroxy vitamin D and 17 $\beta$ -estradiol in proliferation and differentiation of osteoblasts. **Eur. J. Pharmacol.** 659(2-3):273-280.
- [WHO] World Health Organization. 2003. **Prevention and Management of Osteoporosis**. Geneva.
- Yamaguchi, M. 2002. Isoflavone and bone metabolism: its cellular mechanism prevention role in bone loss. **J. Health Sci.** 48(3):209-220.