



ADMINISTRATION'S EFFECTS OF ETHANOL EXTRACT OF *Cissus quadrangularis* Salisb ON GROWTH OF LUMBAL BONE IN OVARECTOMIZED RATS

Mustafa Sabri

Laboratorium Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala Darussalam
23111, Banda Aceh

Abstract. *Cissus quadrangularis* Salisb is a medicinal plant which has been used traditionally to cure bone fracture by Acehnese. This study was carried out to investigate the administration effects of *Cissus quadrangularis* Salisb extract (CQSE) on the histology of lumbar bone in ovariectomized rats. There were 16 female rats (*Rattus norvegicus*) as samples and were then divided into 4 groups of treatment, with 4 replications each. K0 consisted of ovariectomized rats without CQSE supplementation, whereas K1, K2 and K3 consisted of ovariectomized rats administered with 300, 500 and 700 mg/kg body weight CQSE for 60 days, respectively. On the day 61st, all rats were euthanized with chloroform and their fourth lumbar bones were collected for histological preparation. Parameters observed were densities of active osteoblast, passive osteoblast and osteoclast. The results of this study showed that density of active osteoblast of rats in K3 (27.25 ± 2.75) was significantly higher ($P < 0.01$) than rats in K0 (1.75 ± 1.25), K1 (4.00 ± 1.41), and K2 (8.50 ± 7.40), respectively. There was no significant difference ($P > 0.05$) of passive osteoblast density among rats in K0 (16.50 ± 6.13), K1 (41.00 ± 6.48), K2 (44.50 ± 16.34), and K3 (39.00 ± 15.23). Osteoclast density of rats in K0 (85.25 ± 25.91) was significantly higher ($P < 0.05$) than that of rats in K1 (52.50 ± 16.66), K2 (51.00 ± 7.16), and K3 (50.75 ± 9.20). In conclusion, consecutive administration of 700 mg/kg body weight of CQSE extract for 60 days might increase active osteoblast density in ovariectomized rats.

Keywords: *Sipatah-patah* (*Cissus quadrangularis* Salisb), ovariectomized rats, Lumbar Bone.

I. INTRODUCTION

Pada manusia normal puncak kepadatan tulang dicapai pada usia tiga puluhan. Setelah itu terjadi penurunan gradual kepadatan tulang, tanpa atau disertai dengan kerusakan arsitektur tulang. Akibatnya kekuatan tulang menurun dan kerapuhan tulang meluas seiring pertambahan usia, suatu kondisi yang dikenal sebagai osteoporosis. Kondisi ini lazim dijumpai pada manusia lanjut usia, terutama wanita [7]. Osteoporosis ditemukan pada satu dari tiga wanita yang berusia lebih dari 55

tahun dan pada satu diantara 12 pria berusia sama. Osteoporosis pasca menopause terjadi karena penurunan kepadatan tulang yang disebabkan oleh penurunan kadar estrogen [1]. Beberapa faktor yang mempengaruhi penurunan kepadatan tulang diantaranya adalah umur, ras, dan berat badan serta kurangnya paparan sinar matahari dan asupan kalsium. Faktor lainnya adalah gaya hidup yang tidak sehat seperti merokok, mengonsumsi alkohol, dan kurangnya latihan fisik serta penggunaan obat kortiko steroid jangka panjang [8]. Studi epidemiologi menunjukkan cedera pada

penderita osteoporosis terutama terjadi pada ossa *vertebrae*, ossa *coxae*, dan *collum femoris* [4].

Di Indonesia untuk kasus patah tulang selain berobat di pusat kesehatan masyarakat atau rumah sakit, masyarakat juga sering berobat secara tradisional. *Cissus quadrangularis* Linn merupakan tanaman yang lazim digunakan sebagai obat tradisional [13]. Tanaman semak belukar yang banyak ditemukan di India, Sri Lanka, Malaysia, Indonesia (Jawa) dan Afrika Barat ini memiliki batang segi empat yang tebal dan dapat dimakan [14].

Sipatah-patah (*Cissus quadrangularis* Salisb) merupakan tanaman khas daerah Aceh yang secara tradisional digunakan sebagai obat luar patah tulang. Penggunaannya dengan cara menempelkan daunnya di sekeliling bagian tubuh yang mengalami patah tulang. Hasil analisis fitokimia menunjukkan bahwa tanaman sipatah-patah mengandung senyawa alkaloid, triterpenoid, flavonoid, dan tanin. Mineral utama yang terkandung dalam tanaman ini adalah kalsium dan fosfat [10].

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa tulang tibia-fibula dari tikus yang diberikan ekstrak etanol daun sipatah-patah dengan dosis 750 mg/kg BB selama 150 hari memiliki densitas osteoblas yang lebih tinggi, namun kepadatan osteoklas yang lebih rendah dibanding dengan tikus kelompok lain yang diberikan ekstrak sipatah-patah dengan dosis lebih rendah [11].

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak sipatah-patah berbagai dosis terhadap kepadatan tulang lumbar tikus putih yang diovariectomi. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan tambahan informasi mengenai pengaruh pemberian ekstrak tanaman sipatah-patah terhadap kepadatan tulang tikus yang diovariectomi.

II. MATERIALS AND METHODS

Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi, Kandang Percobaan, Laboratorium Klinik, Laboratorium Anatomi, dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh dari bulan Januari sampai Mei 2012. Sampel Penelitian adalah 16 ekor tikus laboratorium betina (*Rattus norvegicus*) berumur 5 bulan dengan berat sekitar 200 g.

Bahan dan Alat

Alat yang digunakan adalah timbangan digital, *vacuum rotary evaporator* (Heidolph), erlenmeyer 100 ml, spuit 3 cc, sonde lambung, wadah stok, kertas saring, scalpel, gunting, jarum, benang *cat gut*, *needle holder*, klem arteri, tampon, *cover glass*, *object glass*, *microtome rotary*, botol spesimen, *waterbath*, mikroskop cahaya dan kamera digital. Bahan penelitian adalah serbuk sipatah-patah, ketamin, xylazin, pakan standar (pelet), formalin 10%, asam nitrat 5%, alkohol, silol, acid alkohol, parafin blok, albumin telur, Hematoksilin Eosin (HE), giemsa, balsem Kanada, etanol 96%, CMC (*Carboxy Methyl Celulosa*).

Metode Penelitian

a. Rancangan Penelitian

Penelitian eksperimental ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) searah yang terdiri dari 4 kelompok perlakuan dengan 4 ulangan. Seluruh tikus dalam kelompok dilakukan ovariectomi. K0 adalah kelompok kontrol tanpa pemberian ekstrak tanaman sipatah-patah (ESP), sedangkan K1, K2 dan K3 adalah kelompok perlakuan yang diberikan ESP dengan dosis berturut-turut 300, 500, dan 700 mg/kg berat badan [12]. Parameter yang diamati adalah kepadatan osteoblas aktif, osteoblas pasif dan osteoklas.

b. Pembuatan Ekstrak sipatah-patah

Ekstrak tanaman sipatah-patah (*Cissus quadrangula* Salisb) dibuat di Laboratorium Farmakologi Universitas Syiah Kuala Banda Aceh menggunakan metode maserasi. Sebanyak 700 gr serbuk tanaman sipatah-patah direndam dengan etanol 96% selama 3 hari, dengan sesekali diaduk dan kemudian disaring. Hasil cairan perendaman dievaporator pada suhu 65°C hingga terbentuk ekstrak kental sebanyak 121,8 gr. Ekstrak tersebut selanjutnya dicampur dengan bahan pengikat CMC 1% dengan perbandingan sesuai dengan dosis perlakuan.

c. Persiapan hewan coba dan perlakuan tikus ovariektomi

Ovariektomi dilakukan melalui sayatan kulit daerah abdomen. Premedikasi dengan atropin 0,05 mg/kg BB subkutan diberikan sebelum pembedahan. Anastesi dilakukan dengan menggunakan campuran Xylazin dosis 10 mg/kg BB dan Ketamin dosis 75 mg/kg BB secara intraperitoneal [1]. Penyayatan pada ulit lebih kurang 1-2 cm, jaringan subkutan dan lemak dikuakkan, dan saluran tuba Fallopii dan kornua uteri ditarik keluar.

Selanjutnya ovarium kiri dan kanan diambil, tuba Fallopii dan kornua uteri dikembalikan ke dalam rongga abdomen, dan dilakukan penjahitan. Pemberian antibiotik secara topikal dilakukan selama 10 hari masa penyembuhan.

d. Perlakuan pemberian ekstrak sipatah-patah (*Cissus quadrangula* Salisb)

Ekstrak sipatah-patah (ESP) diberikan dengan dosis 0 (K0, kontrol), 300 mg/Kg BB (K1), 500 mg/Kg BB (K2), dan 700 mg/Kg BB (K3) selama 60 hari. Pemberian ekstrak dilakukan peroral dengan volume pemberian masing-masing 0,5 ml.

e. Pembuatan preparat histology

Pada akhir masa perlakuan (hari ke 61) semua tikus dieuthanasia dengan menggunakan

klorofom. Pengambilan tulang lumbal ke-4. dilakukan dengan cara penyayatan bagian dorsal, selanjutnya pada bagian muskulus dipreparir. Tulang lumbal difiksasi dengan larutan formalin 10% dan dilakukan dekalsifikasi dalam larutan asam nitrat 5%.

Pembuatan preparat histologi diawali dengan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat, *clearing* dalam silol, *infiltrasi* dalam paraffin cair, dan *embedding* dalam paraffin block, sediaan dipotong dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 μ m dan dilakukan pewarnaan hematoksin dan eosin (HE). Selanjutnya *mounting* menggunakan balsem Kanada, ditutup dengan *cover glass* lalu diamati dibawah mikroskop [3].

III. RESULTS AND DISCUSSION

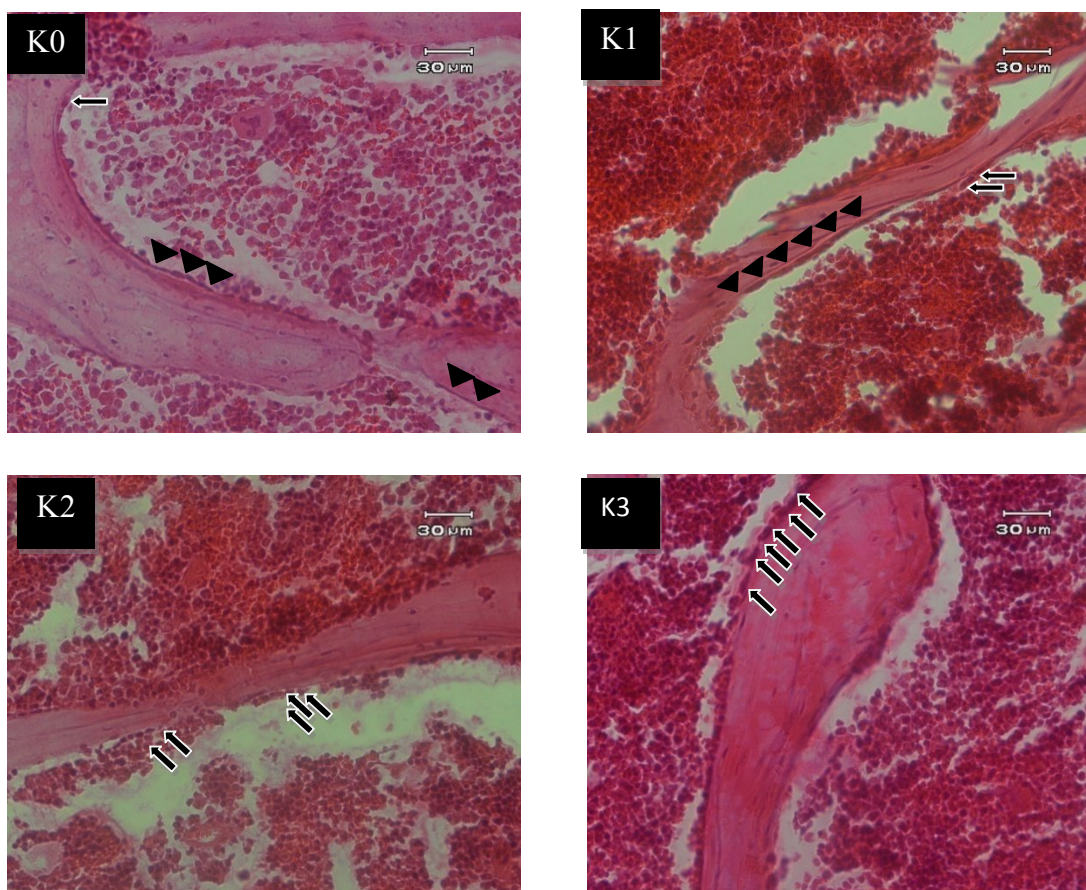
Pertumbuhan tulang secara mikroskopis dapat dilihat berdasarkan densitas osteoblas dan osteoklas. Osteoblas dan osteoklas dapat dijadikan petunjuk kondisi apakah terjadi proses modeling atau remodeling. Hasil pemeriksaan densitas osteoblas (aktif dan pasif) dan osteoklas tulang lumbal tikus yang diovariektomi diperlihatkan pada tabel 1.

Pada kelompok K1 dan K2 osteoblas aktif sedikit lebih tinggi dibanding kelompok K0 sedangkan osteoblas pasif terlihat jelas berbentuk pipih mengalami peningkatan dibandingkan kelompok kontrol. Pada gambaran histologi kelompok perlakuan K3 menunjukkan densitas osteoblas aktif yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan K1, K2, dan kontrol K0. Pertumbuhan tulang secara mikroskopis dapat dilihat berdasarkan densitas osteoblas dan osteoklas. Osteoblas dan osteoklas dapat dijadikan petunjuk kondisi apakah terjadi proses modeling atau remodeling.

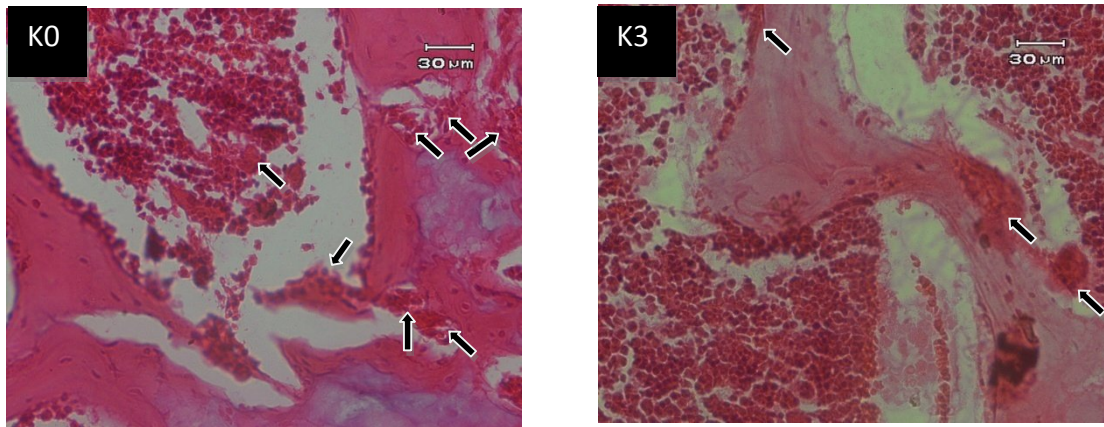
Tabel 1. Hasil pemeriksaan densitas osteoblas (aktif dan pasif) dan osteoklas tulang lumbal tikus yang diovariectomi

KELOMPOK	Osteoblas		Osteoklas
	Aktif	Pasif	
K0	$1,75 \pm 1,25^a$	$16,5 \pm 6,13^b$	$85,25 \pm 25,91^b$
K1	$4 \pm 1,41^a$	$41 \pm 6,48^a$	$52,5 \pm 16,66^a$
K2	$8,50 \pm 7,40^a$	$44,5 \pm 16,34^a$	$51 \pm 7,16^a$
K3	$27,25 \pm 2,75^b$	$39 \pm 15,23^a$	$50,75 \pm 9,20^a$

Keterangan: Superskrip huruf kecil yang berbeda pada kolom atau baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf ($P < 0,05$). K0 = tikus diovariectomi tanpa diberikan ESP (kontrol), K1 = tikus diovariectomi dan diberikan 300 mg/kg BB, K2 = tikus diovariectomi dan diberikan ESP 500 mg/kg BB, K3 = tikus diovariectomi dan diberikan ESP 700 mg/kg BB.



Gambar 1. Osteoblas aktif (tanda panah) dan osteoblas pasif (tanda segitiga) pada tulang lumbal. K0: tikus kontrol, tikus diberikan ESP selama 60 hari dengan dosis 300 mg/kg BB (K1), 500 mg/kg BB (K2), dan 700 mg/kg BB (K3) (400x) (HE). Bar: 30µm.



Gambar 2: Osteoklas (tanda panah) pada tulang lumbal. K0: tikus kontrol, K3 pemberian ESP selama 60 hari dosis 700 mg/kg BB (400x) (HE). Bar: 30μm.

Data hasil densitas osteoklas (Tabel 1) pada K0 lebih tinggi dibanding kelompok perlakuan K1, K2, dan K3, hal ini menunjukkan bahwa proses remodeling yang terjadi tidak diikuti oleh distribusi osteoblas aktif untuk memperbaiki tulang yang telah diresorpsi oleh osteoklas. Kandungan fitoestrogen yang tinggi pada tanaman sipatah-patah dapat berikatan lebih banyak pada reseptor estrogen sehingga menstimulasi osteoblas untuk mensekresikan faktor pertumbuhan (*Growth factor*/GF) pada tulang yang mengakibatkan proliferasi osteoblas [1].

Efek fitoestrogen dari kandungan sipatah-patah terhadap tulang juga diketahui sebagai antiosteoporosis [12]. Estrogen merangsang *transforming growth factor-β* (TGF- β) pada sel osteoblas yang akan menghambat penyerapan tulang dan meningkatkan apoptosis dari sel osteoklas [5]. Defisiensi estrogen yang menyebabkan terjadinya osteoklastogenesis akibat peningkatan sekresi sitokin seperti:

Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) dan *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α), merupakan sitokin yang berfungsi dalam penyerapan tulang [6]. Peningkatan sekresi sitokin tersebut dapat dihambat oleh estrogen sehingga apabila kadar estrogen rendah maka aktifitas osteoblas akan dihambat dan akan mengakibatkan peningkatan jumlah osteoklas [8].

Densitas osteoblas aktif yang lebih tinggi disebabkan karena adanya proses modeling dan remodeling yang masih berjalan akibat pengaruh fitoestrogen dalam ekstrak sipatah-patah yang berpengaruh pada aktifitas osteoblas dan osteoklas [9].

Kandungan senyawa fitoestrogen dalam tanaman sipatah-patah diduga berfungsi menggantikan aktifitas estrogen dalam tubuh pada saat kadar estrogen rendah [15] sehingga aktifitas tersebut dapat menghambat kerja osteoklas dalam meresorpsi tulang secara berlebihan.

Pascasarjana Universitas Udayana
(Disertasi).

CONCLUSION

Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak etanol sipatah-patah pada dosis yang tinggi dapat meningkatkan osteoblas dan dapat menurunkan pembentukan osteoklas.

AKNOWLEDGMENT

Ucapan terimakasih kami kepada Dwi Febrianti yang telah membantu penelitian ini sejak pengambilan sampel sampai di akhir penelitian ini

REFERENCES

1. W, Anggraini, 2008, Fitoestrogen Sebagai Alternatif Alami Terapi Sulih Hormon untuk Pengobatan Osteoporosis Primer pada Wanita Pascamenopause. M.I. Kedokteran Gigi. 1(23):25-31
2. Ariani, 1998, Perbandingan Densitas Tulang pada Wanita Pasca Menopause dalam Terapi Hormonal Pengganti yang Melakukan Olah Raga Teratur dan yang tidak Teratur. Tesis. Program Pascasarjana Ilmu Kedokteran Olah Raga. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
3. Asmawati, 2011. Kajian Morfologi Proses Persembuhan Kerusakan Segmental Pada Tulang Domba yang Diimplan dengan Komposit Hidrosiapatit-Kitosan (HA-K). Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bogor
4. M.J. Favus, 1993, Primary on the Metabolic Bone Disease and Disorder of mineral Metabolism. New York : Raven 3-9 and 34-40.
5. S.I.K. Kawiya, 2009, Interleukin-6 dan RANK-ligand yang tinggi sebagai faktor risiko terhadap kejadian osteoporosis pada wanita pascamenopause defisiensi estrogen. Program Studi Ilmu Kedokteran Pascasarjana Universitas Udayana (Disertasi).
6. D. Masyitha, 2006, Struktur Mikroskopik Tulang Mandibula pada Tikus Ovariectomi dan Pemberian Pakan Rasio Fosfat/Kalsium Tinggi. Media kedokteran hewan. 2(22).
7. S.M. Ott, 1990, Attainment of peak bone mass. J Clin Endocrin Metab 323 (2):73-79.
8. I.A. Rachman, 2006, Osteoporosis primer (Post menopause osteoporosis). In:Osteoporosis. Edisi I. Editor: Suherman SK, Tobing S Dohar AL. Perhimpunan osteoporosis Indonesia. Indomedika:1-6.
9. M. Sabri, 2011, Aktivitas ekstrak etanol batang sipatah-patah *Cissus quadrangularis* Salisb sebagai antiosteoporosis pada tikus (*Rattus norvegicus*). Disertasi. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
10. M. Sabri, S.K. Nurhidayat, B.P. Priosoeryanto, W. Manalu, 200, Analysis of phytochemical and mineral content of Sipatah-patah Plant (*Cissus quadrangularis* Salisb) from Aceh as osteoporosis premedication. J Rona Lingkungan 2:109-117.
11. P.E. Sharp, M.C. la Regina, 1998, The Laboratory Rat. CRC Press. Amerika.
12. A. Shirwaikar, S. Khan, S. Malini, 2003, Antiosteoporotic effect of ethanol extract of *Cissus quadrangularis* Linn.on ovariectomized rat. J Ethnopharmacol 89: 245-250.
13. V.A.H.M. Swamy, T.A.H.M. Hippeswamy, D.V. Manjula, C.B.M. Cumar, 2006, Some Neuropharmacological effects of the methanolic root extract of *Cissus quadrangularis* in mice. Afr J Biomed Res 9:69-75.

14. K.N. Udupa, G.N. Chartuvedim, S.N. Tripathi, 1970, Advences in Research in Indian Medicine. Banaras Hindu University, Varanasi. (12).
15. E.S. Wirakusumah, 2003, Tips dan solusi gizi untuk tetap sehat, cantik dan bahagia di masa menopause dengan terapi estrogen alami. Jakarta: Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama.