

Suplementasi *Calcitriol* Menurunkan Risiko Osteoporosis Tikus Ovariectomi

Calcitriol Supplementation Dcreased Osteoporosis Risk in Ovariectomized Rats

Hartiningsih, Devita Anggraeni

Departemen Ilmu Bedah dan Radiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada
Jl. Fauna No. 2 Karangmalang, Jogjakarta 55281
Email: hartiningsih56@yahoo.com

Abstract

Calcitriol supplementation might contribute to bone formation, however, it increased bone resorption. The objective of the research was to study the efectivity of *calcitriol* in reducing osteoporosis risk in ovariectomized Wistar rats. Fifteen female *Wistar* rats at 8 weeks of age were randomly divided into three groups (sham operated rats/KN, ovariectomized rats/KOV, ovariectomized rats+*calcitriol* supplementation/OVD₁₀₀) of five each. After 8 weeks of treatment, blood samples were taken from plexus orbitalis medialis for estrogen analysis. All rats were then euthanized, left femur was taken for histopathological examination using hematoxylin and eosin stain. The results showed that estradiol levels of KOV were significantly decreased compared with KN, meanwhile estradiol levels of OVD₁₀₀ were not significantly different compared with KOV. Histopathological figure of distal femur epiphysis in OVD₁₀₀ were shown more trabecular bone speculum in epiphysis and had less adipocyte in the bone marrow of epiphysis compared with KOV. In conclusion, calcitriol 100ng/day supplementation in ovariectomized rats for 8 weeks reduced osteoporosis risk.

Key words : Bone, calcitriol, osteoporosis, ovariectomized

Abstrak

Suplemen *calcitriol* memicu pembentukan tulang, namun juga meningkatkan resorpsi tulang. Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji efektivitas *calcitriol* dalam menurunkan risiko osteoporosis tikus ovariektomi. Lima belas tikus Wistar betina umur delapan minggu, dibagi tiga kelompok (kontrol normal KN, kontrol ovariektomi KOV, dan ovariektomi+ *calcitriol* OVD₁₀₀) dan diberi perlakuan selama delapan minggu. Pada akhir perlakuan, dilakukan pengambilan darah melalui pleksus retroorbitalis untuk pemeriksaan estradiol, selanjutnya semua tikus dietanasi menggunakan campuran ketamin10% dengan xylaxine 2%. Femur kiri diambil untuk pemeriksaan histopatologis. Hasil analisis menunjukkan tikus KOV mempunyai konsentrasi estradiol yang secara signifikan lebih rendah dibandingkan tikus KN, dan tikus OVD₁₀₀ mempunyai konsentrasi estradiol tidak berbeda signifikan dibanding tikus KOV. Gambaran histopatologis epifisis tulang femur distalis tikus OVD₁₀₀ terlihat mempunyai lebih sedikit jaringan adiposit dan lebih banyak spikulum trabekula dibanding tikus KOV. Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa suplementasi *calcitriol* 100ng/hari selama delapan minggu pada tikus ovariektomi menurunkan risiko osteoporosis.

Kata kunci : tulang, *Calcitriol*, osteoporosis, ovariektomi

Pendahuluan

Osteoporosis atau rapuh tulang menyebabkan tulang cenderung mudah patah meskipun hanya terkena trauma ringan (Potu *et al.*, 2011). Osteoporosis pasca menopause terjadi karena ketidakseimbangan antara resorpsi tulang oleh osteoklas dan pembentukan tulang oleh osteoblas (Strait *et al.*, 2008). Rendahnya estrogen karena faktor alami atau akibat ovariektomi merupakan salah satu penyebab osteoporosis (Shiud *et al.*, 2009). Estrogen berperan menekan resorpsi tulang (Teitelbaum, 2000; Hughes *et al.*, 1996), dan meningkatkan pembentukan tulang (Qu *et al.*, 1998). Terapi sulih hormon menggunakan hormon estrogen dapat menghambat resorpsi tulang, meningkatkan densitas tulang, dan menurunkan risiko patah tulang (Anderson *et al.*, 2004; Rossouw *et al.*, 2002; Rodan and Martin, 2000), namun meningkatkan risiko kanker ovarium dan kanker endometrium (Zarate *et al.*, 2014; Hartiningsih dan Anggraeni, 2013).

Vitamin D₃ dapat menurunkan risiko kanker endometrium (Mohr *et al.*, 2007; Salazar-Martinez *et al.*, 2005). Suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ memicu pembentukan tulang (Chang *et al.*, 2013; Anderson *et al.*, 2006) namun juga meningkatkan resorpsi tulang (Chang *et al.*, 2013). Suplementasi *calcitriol* 8 ng/tikus selama enam minggu pada tikus ovariektomi menurunkan estradiol dan menyebabkan osteoporosis (Hartiningsih *et al.*, 2012). Hal yang sama terjadi pada tikus ovariektomi yang diberi suplementasi *calcitriol* 20 ng/tikus selama delapan minggu (Hartiningsih dan Anggraeni, 2013). Apakah suplementasi *calcitriol* 100 ng/tikus selama delapan minggu efektif menurunkan osteoporosis belum pernah dilaporkan. Untuk mengukur efektifitas *calcitriol* dalam

menurunkan risiko osteoporosis dilakukan pemeriksaan estradiol, parameter adiposit sebagai petanda aktivitas osteoklas meresorpsi tulang, dan spikulum trabekula sebagai petanda aktivitas osteoblas membentuk tulang. Hasil penelitian ini diharapkan bahwa suplementasi *calcitriol* efektif menurunkan risiko osteoporosis.

Materi dan Metode

Dalam penelitian ini digunakan 15 tikus Wistar betina umur 8 minggu, diberi pakan standar yang mempunyai kandungan protein 20%, Ca 0,6%, P 0,4% dengan komposisi pakan (g/100 g pakan) terdiri dari 78% jagung, 20% ikan teri tawar, 0,3% CaCO₃, 0,7% molase, dan 1,0% vitamin mineral. Tikus ditempatkan dalam kandang individu dengan suhu ruang berkisar 22-25°C. Tikus diberi pakan standar dan air minum aquabidestilata secara *ad libitum*. Tikus dibagi 3 kelompok (kontrol normal KN, kontrol ovariektomi KOV, ovariektomi+*calcitriol* 100 ng/hari/tikus secara oral OVD₁₀₀, masing-masing 5 tikus. Seminggu pasca adaptasi pakan, dilakukan operasi ovariektomi *bilateral* (pengambilan ovarium kiri dan kanan) melalui sayatan *caudal midline*. Sebagai anestetiknya digunakan campuran ketamin 10% (dosis 50 mg/kg, Pantex Holland) dan xylazine 2% (dosis 5 mg/kg, Pantex Holland) intramuskuler. Hal yang sama dilakukan pada tikus kontrol meskipun tidak dilakukan pengambilan ovarium (operasi semu). Satu minggu pascaoperasi, semua tikus diberi perlakuan selama delapan minggu.

Pada akhir perlakuan, tikus dianestesi dengan campuran ketamin 10% (dosis 50 mg/kg) dan xylazine 2% (dosis 5 mg/kg), darah diambil melalui pleksus retroorbitalis untuk pemeriksaan estradiol,

selanjutnya tikus dietanasi dengan campuran ketamin 10% (dosis 50 mg/kg) dan xylazine 2% (dosis 5 mg/kg), tulang femur kiri diambil dan difiksasi dalam formalin 10% untuk pemeriksaan histopatologis. Estradiol diperiksa dengan ELISA (kit komersial produksi Omega Laboratorium).

Data estradiol dianalisis dengan ANOVA pola searah yang dilanjutkan dengan uji Duncan's. Histopatologis tulang dianalisis secara diskriptif.

Hasil dan Pembahasan

Tikus KOV mempunyai konsentrasi estradiol

(10,34±0,31pg/ml) lebih rendah signifikan dibanding tikus KN (12,94±1,08pg/ml) (Tabel 1). Dilaporkan Verma *et al.* (2002) dan Justesen *et al.* (2001) bahwa turunnya konsentrasi estrogen mengganggu proliferasi dan aktivitas estrogenik dalam sumsum tulang dan menyebabkan lebih tingginya konversi sel stroma menjadi adiposit dibanding menjadi osteoblas. Menurut Weisberg *et al.* (2003) adiposit dalam rongga sumsum tulang tidak hanya menekan pembentukan tulang dengan menghambat osteoblastogenesis tetapi juga meningkatkan resorpsi tulang.

Tabel 1. Rerata konsentrasi estradiol (pg/ml) pada tikus *Wistar* yang diberi suplementasi *calcitriol* 100 ng/hari/tikus selama delapan minggu

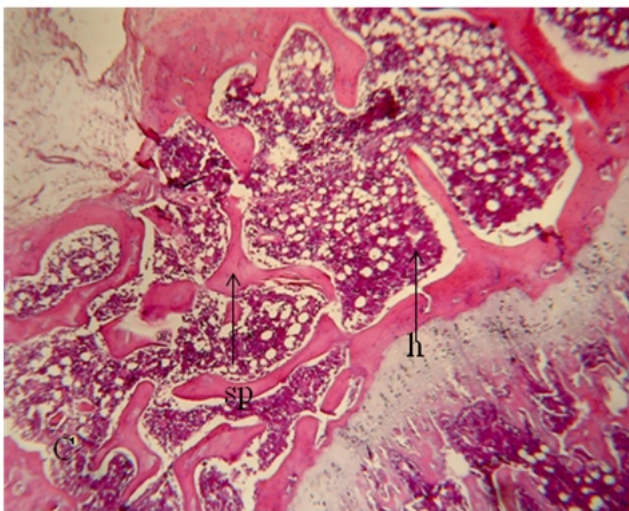
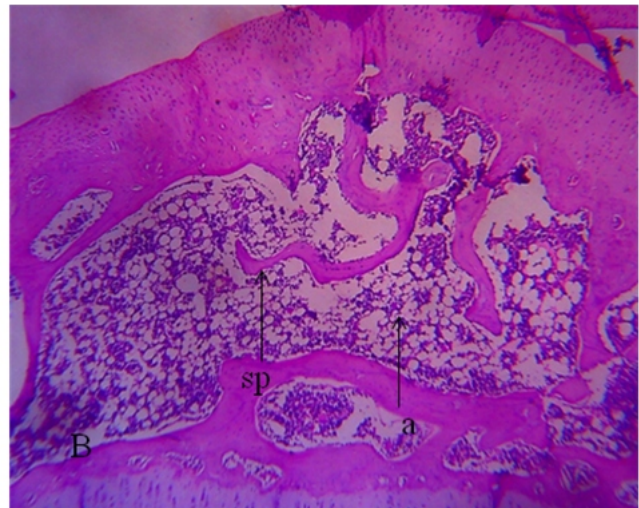
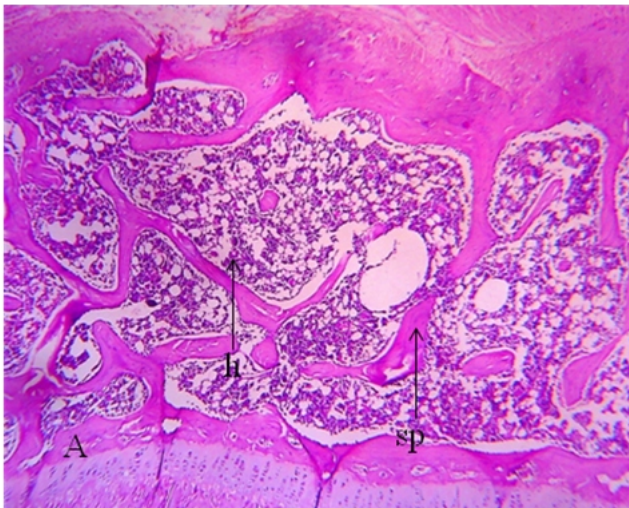
Kelompok	Kontrol normal NK	Kontrol ovariektomi KOV	Ovariektomi + <i>calcitriol</i> 100 OVD ₁₀₀
Estradiol	12,94±1,08 ^a	10,34±0,31 ^b	10,08±0,59 ^b

Keterangan :

Angka dalam baris yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda signifikan

Histopatologis epifisis tulang femur distalis tikus KOV terlihat dominasi jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang dan lebih sedikit spikulum trabekula (Gambar B) dibanding tikus KN (Gambar A). Dominasi jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang tikus KOV memberi gambaran meningkatnya aktivitas osteoklas meresorpsi tulang yang diduga terkait dengan turunnya estradiol. Turunnya spikulum trabekula tikus KOV memberi gambaran turunnya pembentukan tulang. Dilaporkan Cigiela *et al.* (2012), bahwa ovariektomi menurunkan spikulum trabekula dan rongga sumsum tulang menjadi lebih luas. Penggunaan spikulum trabekula sebagai petanda aktivitas osteoblas membentuk tulang adalah sesuai laporan Shiraishi *et al.* (2000) bahwa rekrutmen, diferensiasi osteoblas dan pembentukan tulang oleh

osteoblas ditandai dengan banyak dan tebal spikulum trabekula. Menurut Nakamura *et al.* (2003) dalam keadaan normal, tulang mempertahankan Ca darah dalam kisaran normal melalui keseimbangan antara resorpsi tulang oleh osteoklas dan pembentukan tulang baru oleh osteoblas. Dalam penelitian ini, meningkatnya resorpsi tulang dan menurunnya pembentukan tulang pada tikus ovariektomi KOV memberi gambaran terjadi osteoporosis. Menurut beberapa peneliti, tidak seimbang proses resorpsi dan pembentukan tulang (Karsdal *et al.*, 2007; Seeman *et al.*, 2006; Martin dan Sims, 2005; Teitelbaum dan Ross, 2003; Goltzman, 2002), laju resorpsi tulang lebih aktif dari pada pembentukan tulang menyebabkan osteoporosis (Palmer, 1993).



Histopatologis epifisis tulang femur distalis tikus KN (Gambar A) terlihat mempunyai struktur normal, spikulum trabekula normal (sp) dan rongga sumsum tulang didominasi jaringan hematopoietik (h). Pada tikus KOV (Gambar B) terlihat penurunan spikulum trabekula (sp), rongga sumsum tulang didominasi jaringan adiposit (a). Pada tikus OVD_{100} (Gambar C) terlihat lebih banyak spikulum trabekula (sp) dan rongga sumsum tulang didominasi jaringan hematopoietik (h) (Hematoxilin dan eosin 100x).

Dalam penelitian ini, tikus OVD_{100} mempunyai konsentrasi estradiol ($10,08 \pm 0,59 \text{ pg/ml}$) tidak berbeda dengan tikus KOV (Tabel 1), namun pada pemeriksaan histopatologis epifisis tulang femur distalis tikus OVD_{100} (Gambar C) terlihat mempunyai lebih sedikit jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang dan lebih banyak spikulum trabekula dibanding tikus KOV. Dilaporkan Zhou *et al.* (2006), Kong dan Li (2006), Sun dan Zemel (2004) bahwa 1,25-dihidroksivitamin D_3 menginduksi apoptosis adipogenesis dan menghambat adipogenesis dalam sel. Menurut Weisberg *et al.* (2003), adiposit dalam sumsum tulang meningkatkan resorpsi tulang. Lebih sedikitnya jaringan adiposit tikus OVD_{100} dibanding

tikus KOV memberi gambaran bahwa suplementasi *calcitriol* pada tikus OVD_{100} menyebabkan lebih rendahnya aktivitas osteoklas meresorpsi tulang, dan lebih banyaknya spikulum trabekula tikus OVD_{100} dibanding tikus KOV memberi gambaran meningkatnya pembentukan tulang. Dilaporkan Zhou *et al.* (2006) bahwa 1,25-dihidroksivitamin D_3 bekerja langsung pada osteoblas untuk meningkatkan pembentukan tulang. Anderson *et al.* (2006) juga melaporkan bahwa suplemen 1,25-dihidroksivitamin D_3 memicu pembentukan tulang dan meningkatkan densitas tulang dengan mempromotori sintesis osteokalsin oleh osteoblas. Dalam penelitian ini, tidak berbedanya konsentrasi estradiol tikus OVD_{100} dengan tikus KOV memberi

gambaran bahwa suplementasi *calcitriol* 100ng/tikus pada tikus ovariektomi menurunkan resorpsi tulang yang ditandai lebih sedikit jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang dan meningkatkan pembentukan tulang epifisis tulang femur distalis yang ditandai lebih banyak spikulum trabekula.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa suplementasi *calcitriol* 100 ng/hari/tikus selama delapan minggu pada tikus ovariektomi menurunkan risiko osteoporosis epifisis tulang femur distalis.

Daftar Pustaka

- Anderson, G.L., Chlebowski, R.T. and Rossouw, J.E. (2006) Prior hormone therapy and breast cancer risk in the women's health initiative randomized trial of estrogen plus progestin. *Maturitas*. 55: 103-115.
- Anderson, G.L., Limacher, M. and Assaf, A.R., et al. (2004) Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 291: 1701-1712.
- Chang, K.L., Hu, Y.C., Hsieh, B.S., Cheng, H.L., Hsu, H.W., Huang, L.W. and Su, S.J. (2013) Combined effect of soy isoflavones and vitamin D3 on bone loss in ovariectomized rats. *Nutrition*. 29: 250-257.
- Cigiela, U., Folwarczna, J., Pytlik, M. and Zgorka, G. (2012) Effect of extracts from *Trifolium medium L* and *Trifolium pratense L*. on development of estrogen deficiency-induced osteoporosis in rats. Hindawi Publishing Corporation. Based Complementary and Alternative Medicine. *Article ID*. 921684.
- Goltzman, D. (2002) Discoveries, drugs and skeletal disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 1: 784-796.
- Hartiningasih dan Anggraeni, D. (2013) Kombinasi *calcitriol* dan *ethynil ethyl estradiol* untuk mencegah osteoporosis tikus ovariektomi. Penelitian pengembangan bagian 2013 Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.
- Hartiningasih, Anggraeni, D. dan Aji, D. (2012) Respon metafisis tulang femur distalis tikus ovariektomi yang mengkonsumsi kalsitriol. *J. Kedokteran Hewan* 6: 92-98.
- Hughes, D.E., Dai, A., Tiffie, J.C., Li, H.H., Mundy, G.R. and Boyce, B.F. (1996) Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med*. 2: 1132-1136.
- Justesen, J., Stenderus, K., Ebbesen, E.N., Mosekilde, L., Steinche, T. and Kassem, M. (2001) Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontolog*. 2(3): 165-171.
- Karsdal, M.A., Martin, T.J., Bollerslev, J., Christiansen, C. and Henriksen, K. (2007) Are nonresorbing osteoclasts sources of bone anabolic activity? *J. Bone Miner. Res*. 22: 487-494.
- Kong, J. and Li, Y.C. (2006) Molecular mechanism of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 290: E916-E924.
- Martin, T.J. and Sims, N.A. (2005) Osteoclast derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trend. Mol. Med*. 11: 76-81.
- Mohr, S.B., Garland, C.F., Gorham, E.D., Grant, W.D. and Garland, F.C. (2007) Is ultraviolet B irradiance inversely associated with incidence rates of endometrial cancer: an ecological study of 107 countries. *Prev. Med*. 45: 327-331.
- Nakamura, M., Udagawa, N., Matsuura, S., Mogi, M., Nakamura, H., Horiuchi, H., Saito, N., Hiraoka, B.Y., Kobayashi, Y., Takaoka, K., Ozawa, H., Miyazawa, H. and Takahashi, N. (2003) Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. *Endocrinology*. 144: 5441-5449.

- Palmer, N. (1993) Bones and Joints. *In Pathology of domestic animals*. Jubb, KVF., Kennedy PC, and Palmer N. *ed.* Academic Press, Inc, Harcourt Brace Jovanovich publishers, San Diego: 1-181.
- Potu, B.K., Nampurath, G.K., Chamallamudi, M.R., Prasad, K., Nayak, S.R., Dharmavarapu, P.K., Kedage, V. and Bath, K.M. (2009) Evidence-based assesment antiosteoporotic activity of petrolium ether extract of *ossus quadrangularis linn* : on ovariectomy-induced osteoporosis. *Ups. J. Med. Sci.* 114: 140-148.
- Qu, Q., Perala-Heape, M., Kapanen, A., Dahllund, J., Salo, J., Vaananen, H.K. and Harkonen, P. (1998) Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone*. 22: 201-209.
- Rodan, G.A. and Martin, T.J. (2000) Therapeutic approaches to bone diasease. *Science*. 289: 1508-1514.
- Rossouw, J.E, Anderson, G.L., Prentilce, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., Jackson, R.D., Beresford, S.A., Howard, B.V., Johnson, K.C., Kotchen, J.M. and Ockene, J. (2002) Risk and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women:principal results from the Women's Health Inisiative randomized controlled trial. *JAMA*. 288: 321-333.
- Salazar-Martinez, E., Lazcano-Ponce, E., Sanchez-Zamorano, L. M., Gonzales-Lira, G., Escudero-DE Los R.P. and Hernandez-Avila, M. (2005) Dietary factors and endometrial cancer risk. Results of a case-control study in Mexico. *In J. Gynecol. Cancer*. 15: 938-945.
- Seeman, E., Vellas, B., Benhamou, C., Aquino, J.P., Semler, J., Kaufman, J.M., Hozowski, K., Varela, A.R., Fiore, C., Brixen, K., reginster, J.Y. and Boonen, S. (2006) Strontium ranelate reduce the risk of vertebral and nonvertebral fractures in women eighty years of age and older. *J. Bone Miner. Res.* 21: 1113-1120.
- Shiraishi, A., Takeda, S., Masaki, T., Higuchi, Y., Uchiyama, Y., Kubodera, N., Sato, K., Ikeda, K., Nakamura, T., Matsumoto, T. and Ogata, E. (2000) Alfacalcidol inhibits bone resorption and stimulates formation in an ovariectomized rat model of osteoporosis: distinct actions from estrogen. *J. bone Miner. Res.* 15: 235-244.
- Shuid, A.N., Ping, L.L., Muhammad, N. and Soelaiman, I.N. (2011) The effects of *labisia pumila var alata* on bone markers and bone calcium in a rat model of post-menopausal osteoporosis. *Ehnopharmacol.* 133(2): 538-542.
- Strait, K.Y., Li, Y., Dillehay, D.L. and Weitzmann, M.N. (2008) Supression of NF-Kappa B activation blocks osteoclastic bone resorption during estrogen deficiency. *Int. J. Mol. Med.* 21(4): 521-525.
- Sun, X. and Zemel, M.B. (2004) Role of uncoupling protein 2 (UCP2) expression and 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in modulating adipocyte apoptosis. *Faseb. J.* 18: 1430-1432.
- Teitelbaum, S.L. (2000) Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 289: 1504-8
- Teitelbaum, S.L. and Ross, F.P. (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet.* 4: 638-649.
- Verma, S., Rajaratnam J.H., Denton J., Hoyland J.A. and Byers R.J. (2002) Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. *J. Clin. Pathol.* 55: 693-698.
- Weisberg, S.P. McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L. and Ferrante, A.W. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112(12): 1785-1808.
- Zarate, A., Hernandez-Valencia, M., Saucedo, R., Basurto, L. and Manuel-Apolinar, L. (2014) Current position about the use of estrogen therapy in women during the menopause period. *Rev. Med. Inst.* 52(1): 66-69.
- Zhou, Y.S., Liu, Y.S. and Tan, J.G. (2006) Is 1, 25-dihydroxyvitamin D3 an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells *in vitro*? *Chin. Med. J. (Engl)*. 119: 1278-1286.