

PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN E TERHADAP KADAR HORMON ESTROGEN DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI TULANG ALVEOLAR MENCIT (*MUS MUSCULUS L*) YANG MELAKUKAN LATIHAN FISIK MAKSIMAL

(EFFECT OF VITAMIN E ADMINISTRATION TO THE LEVEL OF ESTROGEN HORMONE AND HISTOPATHOLOGY OF ALVEOLAR BONE OF THE MICE (*MUS MUSCULUS L*) WITH MAXIMAL PHYSICAL EXERCISE)

Kesuma Wardani*, Yasmeini Yazir**, Syafruddin Ilyas**

* Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Sumatera Utara
Jl. Sisingamangaraja No. 2A Medan
** Departemen Fisiologi

Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatera Utara
** Departemen Biologi

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sumatera Utara
Jl. Alumni No 2 Kampus USU Medan

Abstract

Free radical is an atom or molecule that has no pair of electron and can damage the essential molecules for cellular function. In oxidative stress conditions, free radical will cause lipid peroxidation of cell membrane and damage cell membrane organization. Administration of antioxidants in the form of vitamin E is proposed to reduce the effects of free radicals in the body. The aim of this study was to know the effects of vitamin E on the level of estrogen and the alveolar bone structure of mice caused by free radicals. The subjects were 50 (*Mus musculus L.*) female mice divided into 6 groups, each group consisted of 5 repetitions: P0= given no treatment (control group); P1= maximal physical exercise every day for 30 days; P2= vitamin E for 30 days; P3= maximum physical exercise for 15 days, then 15 days more vitamin E, P4= vitamin E for 15 days, then 15 days again maximal physical exercise; P5= maximal physical exercise and vitamin E for 30 days. At the end of experiment of each group, the level of estrogen and the alveolar bone structure of mice. The results showed that vitamin E levels of the hormone estrogen effected significantly on adult females mice who performed maximal physical exercise and vitamin E also affected significantly alveolar bone structure of adult female mice who performed maximal physical exercise ($p<0.05$). In conclusion, vitamin E affect get estrogen levels and alveolar bone structures of (*Mus musculus L.*) adult females mice who exercise maximumly ($p<0.05$).

Key words: estrogen, vitamin E, free radical, physical exercise

Abstrak

Radikal bebas merupakan suatu atom atau molekul yang tidak mempunyai pasangan elektron dan dapat merusak molekul-molekul penting untuk fungsi seluler. Pada kondisi stres oksidatif, radikal bebas akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid membran sel dan merusak organisasi membran sel. Pemberian asupan antioksidan berupa vitamin E dapat menurunkan efek radikal bebas dalam tubuh. Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat apakah ada pengaruh pemberian vitamin E terhadap kadar estrogen dan struktur tulang alveolar mencit akibat radikal bebas. Mencit (*Mus musculus L.*) betina dibagi dalam 6 kelompok, tiap kelompok terdiri atas 5 ekor, P0= tidak diberi perlakuan (kelompok kontrol); P1= latihan fisik maksimal setiap hari selama 30 hari; P2= vitamin E selama 30 hari; P3= latihan fisik maksimal selama 15 hari, selanjutnya 15 hari lagi vitamin E; P4= vitamin E selama 15 hari, selanjutnya 15 hari lagi latihan fisik maksimal; P5= latihan fisik maksimal dan vitamin E selama 30 hari. Pada akhir perlakuan sesuai dengan kelompok, dilakukan pemeriksaan terhadap kadar estrogen dan terhadap struktur tulang alveolar mencit. Hasil penelitian ini menunjukkan vitamin E berpengaruh terhadap kadar hormon estrogen mencit (*Mus musculus L.*) betina dewasa yang melakukan latihan fisik maksimal secara bermakna ($p<0,05$), dan vitamin E juga berpengaruh terhadap struktur tulang alveolar mencit (*Mus musculus L.*) betina dewasa yang melakukan latihan fisik maksimal secara bermakna ($p<0,05$). Sebagai kesimpulan, vitamin E berpengaruh terhadap kadar hormon estrogen dan struktur tulang alveolar mencit (*Mus musculus L.*) betina dewasa yang melakukan latihan fisik maksimal secara bermakna ($p<0,05$).

Kata kunci: estrogen, vitamin E, radikal bebas, latihan fisik

PENDAHULUAN

Latihan fisik yang secara teratur memberikan banyak manfaat bagi kesehatan termasuk mengurangi risiko penyakit kardiovaskuler, osteoporosis, dan penyakit diabetes, sedangkan latihan fisik maksimal dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif pada tikus¹ dan manusia² sehingga terjadi kerusakan membran sel. Latihan fisik maksimal juga dapat mengurangi kadar estrogen, yang akhirnya mengakibatkan osteoporosis.³ Pada keadaan stres oksidatif, radikal bebas akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid membran sel dan merusak organisasi membran sel. Membran sel ini sangat penting bagi fungsi reseptor dan fungsi enzim, karena terjadinya peroksidasi lipid membran sel oleh radikal bebas, dapat mengakibatkan hilangnya fungsi seluler secara total.⁴ Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan,⁵ dan stres oksidatif adalah suatu keadaan produksi radikal bebas melebihi antioksidan sistem pertahanan seluler.

Peningkatan radikal bebas (ROS) menyebabkan rusaknya sel pembentuk estrogen melalui peroksidasi lipid pada membran selnya, sehingga estrogen yang dihasilkan juga menjadi berkurang. Estrogen dibentuk pada sel granulosa folikel dan sel lutein korpus luteum ovarium,⁷ sehingga rusaknya sel pembentuk estrogen menyebabkan kadar estrogen menjadi sangat rendah. Kekurangan estrogen ini akan menyebabkan meningkatnya aktivitas osteoklastik pada tulang, berkurangnya matriks tulang, dan berkurangnya deposit kalsium dan fosfat tulang. Pada beberapa wanita, efek ini sangat hebat sehingga menyebabkan osteoporosis.⁸

Di dalam sel terdapat berbagai antioksidan non-enzimatik dan enzimatis yang berfungsi sebagai sistem pertahanan bagi organel-organel sel dari efek reaksi radikal bebas. Kandungan antioksidan ini dapat bersumber dari diet berupa vitamin dan mineral antioksidan. Vitamin E merupakan salah satu vitamin antioksidan yang utama. Selain dari diet, senyawa antioksidan juga diproduksi secara endogen oleh tubuh seperti glutathion.^{4,5} Belum sepenuhnya diketahui apakah antioksidan natural tubuh yang berperan sebagai sistem pertahanan dapat mengatasi peningkatan radikal bebas pada saat latihan atau apakah diperlukan suplemen tambah.⁵

Berdasarkan uraian di atas dapat disimpulkan bahwa latihan fisik maksimal dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Oleh karena antioksidan berupa vitamin E diharapkan dapat mengurangi aktivitas radikal bebas, maka dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian vitamin E terhadap kadar hormon estrogen dan struktur tulang alveolar

mencit betina dewasa yang melakukan latihan fisik maksimal.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi FMIPA USU Medan, Laboratorium Klinik Pramita Medan, dan Laboratorium Biomedik FK USU Medan. Penelitian dilakukan pada bulan Januari-bulan Mei 2011.

Bahan biologis yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit betina (*Mus musculus* L.) yang berumur 12 bulan dengan berat badan 30-45 gram yang diperoleh dari FMIPA Biologi Universitas Sumatera Utara. Jumlah hewan uji perkelompok ditentukan dengan rumus $(t-1)(n-1) \geq 15$. Jika t adalah jumlah perlakuan (6 kelompok) dan n adalah jumlah ulangan perkelompok, maka jumlah n yang diharapkan secara teoritis adalah 4 sehingga di dapat jumlah keseluruhan hewan coba yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah 50 ekor yang dipilih dari hasil pembiakan untuk keperluan penelitian.

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang didisain mengikuti rancangan acak lengkap (RAL). Penelitian ini terdiri atas 6 perlakuan, yaitu: a. P0= terdiri atas 8 ekor mencit betina dewasa yang tidak diberi perlakuan (kelompok kontrol); b. P1= terdiri atas 8 ekor mencit betina dewasa yang diberi perlakuan latihan fisik maksimal setiap hari selama 30 hari; c. P2= terdiri atas 8 ekor mencit betina dewasa yang diberi vitamin E selama 30 hari; d. P3= terdiri atas 8 ekor mencit betina dewasa yang diberi perlakuan latihan fisik maksimal selama 15 hari, selanjutnya 15 hari berikutnya diberi vitamin E; e. P4= terdiri atas 8 ekor mencit betina dewasa yang diberi vitamin E selama 15 hari, selanjutnya 15 hari berikutnya diberi perlakuan latihan fisik maksimal; f. P5= terdiri atas 8 ekor mencit betina dewasa yang diberi perlakuan latihan fisik maksimal dan vitamin E selama 30 hari. Mencit ditempatkan ke dalam kelompok secara random.

Mencit betina dewasa ditempatkan di dalam kandang yang terbuat dari bahan plastik (ukuran 30 x 20 x 10cm) yang ditutup dengan kawat kasa. Dasar kandang dilapisi dengan sekam padi setebal 0,5-1 cm dan diganti setiap tiga hari. Cahaya ruangan dikontrol selama 12 jam terang (pukul 06.00 sampai dengan pukul 18.00), dan 12 jam gelap (pukul 18.00 sampai dengan pukul 06.00), sedangkan suhu dan kelembaban ruangan dibiarkan berada pada kisaran alamiah. Pakan (pelet komersial) dan air minum (air PAM) disuplai setiap hari secara berlebih. *Ethical clearance* diperoleh dari Komisi Penelitian Hewan Biologi FMIPA Universitas Sumatera Utara Medan.

Latihan fisik maksimal dilakukan dengan cara berenang sampai kelelahan.^{9,10} Mencit berenang di dalam wadah kaca (ukuran 100 x 50 x 80 cm) yang diisi dengan air setinggi 60 cm, tidak ada jalan keluar. Sebagai usaha untuk keluar dari wadah, tikus akan berenang, menyelam dan memanjat dinding wadah dengan sekuat tenaga. Saat mencit menghentikan segala gerakannya, kecuali gerakan untuk bertahan hidup (mempertahankan kepala tetap berada di permukaan air), hal ini dianggap mencit sudah melakukan latihan fisik maksimal. Segera setelah itu, mencit dikeluarkan dari wadah, dikeringkan dengan handuk kering, dan dikembalikan ke dalam kandang.

Vitamin E yang diberikan adalah DL- α -tokoferol asetat yang dilarutkan dalam akuades. Dosis vitamin E yang diberikan adalah 0,4mg/hari per oral. Dosis tersebut hasil dari konversi dosis manusia ke mencit yang merupakan metode modifikasi.¹¹

Setelah 30 hari perlakuan, masing-masing hewan coba dikorbankan dengan cara dislokasi leher dan selanjutnya dibedah. Setelah itu dilakukan pengamatan sebagai berikut: pengamatan dilakukan pada hari ke 30 pada semua kelompok baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan. Kadar estrogen (estradiol) diperiksa dengan metode ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*). *Solid Phase Receptacle* (SPR) yang digunakan pada pemeriksaan ini merupakan fase solid seperti pipet. Reagensia pada pemeriksaan ini siap pakai dan tersimpan dalam satu bungkus reagensia strip. Semua tahap pemeriksaan ini dilakukan secara otomatis di dalam alat. Sampel dimasukkan ke dalam *well* yang berisi *Alkaline phosphatase* berlabel Estradiol (Konjugat). Sampel dan konjugat dicampur masuk dan keluar SPR pada waktu tertentu dan kecepatan reaksi tertentu.

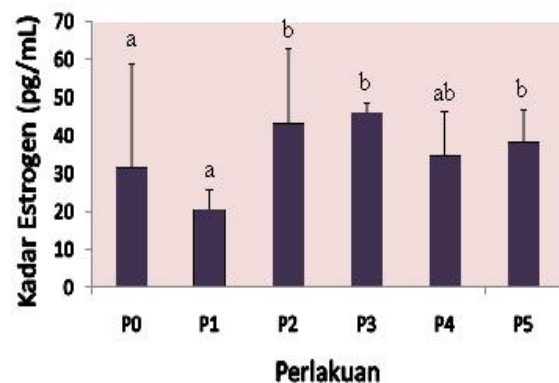
Komponen yang tidak terikat akan dihilangkan pada saat pencucian. Pada langkah akhir reaksi substrat (*4-Methyl-umbelliferyl phosphate*) akan berputar masuk dan keluar SPR. Enzim konjugat katalisator akan menghidrolisa substrat menjadi *product fluorescent* (*4-Methyl-umbelliferone*). Fluoresensi ini diukur pada panjang gelombang 450 nm. Intensitasnya sebanding dengan konsentrasi estrogen (estradiol) dalam serum.¹²

Pengamatan gambaran histopatologi tulang alveolar mandibula mencit, dibuat sediaan histologis dengan metode parafin, menggunakan pewarnaan HE (Hematoksilin Eosin). Pengamatan gambaran kerusakan tulang alveolar mandibula dengan pembesaran 400x.

Dilakukan uji normalitas dan homogenitas data. Data berdistribusi normal dan homogen kemudian dilakukan uji ANOVA. Untuk melihat perbedaan antar kelompok kontrol dan masing-masing perlakuan dilakukan dengan uji Post Hoc.

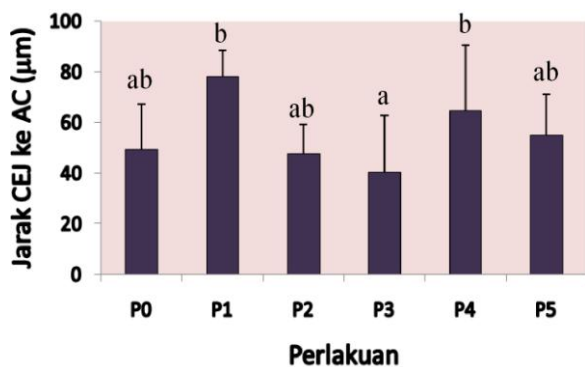
HASIL

Rerata hasil analisis data kadar estrogen dalam darah mencit betina (*Mus musculus* L.) ditunjukkan pada Gambar 1. Hasil uji didapati bahwa kadar estrogen yang tertinggi terdapat pada P3 ($46,01 \pm 2,52$ pg/mL), yang berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan P0 ($31,41 \pm 27,51$ pg/mL) dan P1 ($20,39 \pm 5,44$ pg/mL), tetapi tidak berbeda nyata dengan P2 ($42,94 \pm 19,79$ pg/mL), P4 ($34,42 \pm 12,05$ pg/mL) dan P5 ($38,22 \pm 8,64$ pg/mL). Kadar estrogen terendah terdapat pada P1 ($20,39 \pm 5,44$ pg/mL), yang berbeda nyata dengan P2, P3, dan P5, tetapi tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan P0 dan P4.

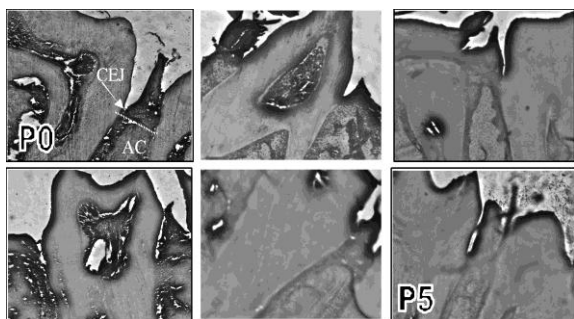


Gambar 1. Kadar estrogen dalam darah (pg/mL). Keterangan; Grafik histogram pada perlakuan berbeda yang diikuti oleh huruf kecil yang sama berbeda tidak nyata pada taraf uji 5%

Rerata hasil analisis jarak dari *cementum enamel junction alveolar crest* ditunjukkan pada Gambar 2 dan gambaran histopatologi tulang alveolar pada Gambar 3. Hasil uji terhadap jarak CEJ ke AC yang terpanjang/terjauh terdapat pada P1 ($78,14 \pm 10,15$ μ m), yang berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan P3 ($40,13 \pm 22,64$ μ m), tetapi tidak berbeda nyata ($p > 0,5$) dengan P0 ($49,48 \pm 17,94$), P2 ($47,56 \pm 11,66$ μ m), P4 ($64,53 \pm 25,83$ μ m) dan P5 ($54,77 \pm 14,03$ μ m). Sedangkan jarak CEJ ke AC terendah/terdekat terdapat pada P3 ($40,13 \pm 22,64$ μ m), yang berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan P1 dan P4, tetapi tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan P0, P2 dan P5.



Gambar 2. Jarak dari *cementum enamel junction* ke *alveolar crest* (puncak alveolar). Grafik histogram pada perlakuan berbeda yang diikuti oleh huruf kecil yang sama berbeda tidak nyata pada taraf uji 5%



Gambar 3. Jarak dari *cementum enamel junction* (CEJ) ke *alveolar crest/AC* (puncak alveolar) (µm). Pembesaran 400x

PEMBAHASAN

Tingginya kadar estrogen pada P3 (latihan fisik maksimal selama 15 hari, selanjutnya 15 hari lagi vitamin E) (Gambar 1), mungkin disebabkan oleh adanya pemberian vitamin E yang dapat menekan oksidan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang timbul setelah latihan fisik maksimal. Hal ini terbukti ketika dibandingkan dengan kadar estrogen yang didapatkan pada P1 atau latihan fisik maksimal setiap hari selama 30 hari, yang lebih rendah secara nyata ($p < 0,05$) dibandingkan dengan P3. Pengaruh vitamin E terhadap kadar estrogen mencit betina terlihat jelas jika dilihat pada perlakuan lainnya yang ada penambahan vitamin E (P2, P4 dan P5). Latihan fisik dapat meningkatkan pembentukan ROS dalam otot rangka.¹³ Latihan fisik maksimal dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif pada tikus.¹ Pemberian vitamin E 2 mg/hari per oral selama 45 hari mampu meningkatkan aktivitas enzim *superoxide dismutase*, *glutathione peroxidase*, dan *catalase*, serta menurunkan kadar MDA testis mencit yang dipaparkan aflatoxin 25 g/hari per oral selama 45 hari.¹⁴

Rusaknya sel pembentuk estrogen pada kelompok P1 menyebabkan kadar estrogen menjadi sangat rendah ($p < 0,05$) dibanding dengan latihan fisik maksimal yang diberi asupan vitamin E (P2-P5). Peningkatan metabolisme aerobik selama latihan merupakan sumber potensial stres oksidatif.¹⁵ Sel permukaan ovarium dapat terkena inflamasi bahan kimia atau radikal bebas. Folikel menjadi pecah sehingga jadi rusak dan tidak dapat diperbaiki serta mengalami apoptosis. Penggunaan vitamin E dapat mencegah kerusakan epitel ovarium domba oleh adanya oksidan.¹⁶

Gambaran histopatologi tulang alveolar ditentukan dengan mengukur jarak dari *Cementum Enamel Junction/CEJ* ke *Alveolar Crest/AC*). Jarak yang semakin jauh, cenderung memperparah kondisi patologinya, begitu juga sebaliknya, atau semakin berkurangnya tulang alveolar. Jarak CEJ ke AC yang paling tinggi terdapat pada P1 ($78,14 \pm 10,15$ µm) karena aktifitas fisik maksimal yang dilakukan dan tidak diberi asupan vitamin E. Selain timbulnya radikal bebas/oksidan yang memperparah kerusakan ovarium (sumber utama estrogen), juga tidak adanya antioksidan yang ditambahkan (vitamin E). Akibatnya kadar estrogen rendah (Gambar 1) dan berdampak pada tingginya jumlah osteoklas dari pada osteoblas. Hal ini menyebabkan tingginya histopatologi tulang alveolar.

Pendeknya jarak antara CEJ ke AC menandakan semakin kuatnya kondisi gigi atau makin panjangnya tulang alveolar tempat gigi tertanam (Gambar 3). Seperti pada P3 ($40,13 \pm 22,64$ µm) dilakukan latihan fisik maksimal awalnya dan kemudian diberi asupan vitamin E. Penambahan vitamin ini memicu bertambahnya estrogen dan menghalangi radikal bebas hasil latihan fisik maksimal yang merusak ovarium pembentuk utama estrogen. Vitamin E sebagai antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif. Peningkatan produksi estrogen inilah yang dapat memicu pertumbuhan tulang alveolar sehingga jarak antara AC ke CEJ semakin pendek. Estrogen menghambat aktivitas osteoklas dan dengan sendirinya menghambat resorpsi tulang dan secara bersamaan estrogen mengaktifkan osteoblas, sehingga laju pergantian tulang menjadi normal. Estrogen bekerja baik secara langsung melalui reseptor yang berada di tulang maupun secara tidak langsung dengan bantuan sitokin dan faktor pertumbuhan. Pada proses pemugaran tulang juga berperan faktor-faktor lain yang berada di bawah pengaruh estrogen.¹⁷ Suplemen vitamin E dapat meningkatkan struktur

tulang sehingga tulang menjadi kuat. Oleh karena itu, vitamin E berpotensi digunakan sebagai bahan untuk mengobati osteoporosis atau sebagai suplemen tulang pada orang dewasa muda dalam mencegah osteoporosis dikemudian hari.¹⁸

Dapat disimpulkan bahwa vitamin E berpengaruh terhadap kadar hormon estrogen dan stuktur tulang alveolar mencit (*Mus musculus* L.) betina dewasa yang melakukan latihan fisik maksimal ($p < 0,05$).

Daftar Pustaka

1. Senturk UK, Gunduz F, Kuru O, Aktekin MR, Kipmen D, Yalcin O, et al. Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. *J Appl Physiol* 2001; 91: 1999-2004.
2. Senturk UK, Gunduz F, Kuru O, Kocer G, Ozkaya YG, Yesilkaya A, et al. Exercise-induced oxidative stress leads hemolysis in sedentary but not trained humans. *J Appl Physiol* 2005, 99: 1434-41.
3. Power SK, Howley ET. *Exercise Physiology: Theory and application to fitness and performance*. Mc Graw Hill International Ed., 2007; 87-9.
4. Evans WJ. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 647S-52S.
5. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 637S-46S.
6. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004; 142: 231-55.
7. Laksmi DNDI. Glutathion meningkatkan kualitas tubulus seminiferus pada mencit yang menerima pelatihan fisik berlebihan. *Buletin Veteriner Udayana* 2010; 3: 719-21.
8. Jawi IM, Suprpta DN, Subawa AAN. Ubi jalar ungu menurunkan kadar MDA dalam Darah dan hati mencit setelah aktivitas fisik maksimal. *J Veteriner* 2008; 9(2), 65-72.
9. Ilyas S. Azoospermia dan pemulihannya melalui regulasi apoptosis sel spermatogenik tikus (*Rattus* sp) pada penyuntikan kombinasi testosteron undekanoat (TU) dan depot medroksiprogesteron asetat (DMPA), Disertasi. Fak. Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta, 2007; 71.
10. Biomerieux® SA. Vidas et SPR sont des marques utilisees, REF 30 431, France, 2008; 1-4.
11. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 2008; 88: 1243-76.
12. Verma RJ, Nair A. Ameliorative effect of vitamin E on aflatoxin-induced lipid peroxidation in the testis of mice. *Asian J Androl* 2001; 3: 217-21.
13. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *current medicinal chemistry* 2001; 8: 829-38.
14. Murdoch WJ, Martinchicky JF. Oxidative damage to DNA of ovarian surface epithelial cells affected by ovulation: arcinogenic Implication and Chemopreven-Exp. *Biol. Med* 2004; 229: 546-52.
15. Baziad A. *Menopause dan andropause*. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo, 2003; 81.
16. Hafilah NH, Jaarin K, Abdullah S, Omar M. Palm vitamin E and glucosamine sulphate in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Saudi Med J* 2009; 30(11): 1432-8.