

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk menguji efek estrogenik ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. pada densitas tulang tikus yang diovariectomi. Sebelum dilakukan pembuatan ekstrak umbi *Dioscorea alata* L., dilakukan identifikasi taksonomi umbi *Dioscorea alata* L. di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada. Hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya kesalahan dalam mengambil obyek uji. Umbi *Dioscorea alata* L. yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari daerah Kulonprogo, Yogyakarta. Setelah didapatkan umbi *Dioscorea alata* L. yang tepat, dimulailah proses ekstraksi umbi *Dioscorea alata* L. Proses ekstraksi yang dipilih adalah maserasi karena merupakan metode yang paling mudah dan murah untuk dilakukan. Metode maserasi tidak memerlukan alat-alat khusus sehingga menambah kepraktisan.

Umbi *Dioscorea alata* L. disiapkan sebanyak 10 kilogram, dikupas untuk menghilangkan kotoran dan dipotong kecil-kecil kemudian dikeringkan dalam oven 60-70°C hingga kering. Pematangan umbi *Dioscorea alata* L. ditujukan untuk mempercepat proses pengeringan (Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2014).

Sedangkan pengeringan potongan umbi *Dioscorea alata* L. bertujuan untuk mengurangi kadar air agar umbi tidak ditumbuhi jamur. Pengeringan dengan menggunakan oven lebih dipilih daripada dengan mengeringkan di bawah cahaya matahari langsung karena selain prosesnya cepat dan lebih menjamin

pengeringan yang merata, pengeringan melalui oven tidak dipengaruhi oleh musim dan cuaca. Selain itu, sinar ultraviolet pada cahaya matahari dapat menimbulkan kerusakan kandungan kimia bahan. Pengeringan dengan menggunakan aliran udara tidak dipilih karena aliran udara di tempat penelitian dilakukan tidak stabil dan sangat bergantung pada musim serta cuaca (Pramono, 2005 *cit.* Ma'mun, 2006).

Umbi *Dioscorea alata* L. yang sudah kering dihaluskan dengan *blender* menjadi partikel-partikel kecil atau disebut sebagai simplisia. Penghalusan umbi *Dioscorea alata* L. dengan menggunakan *blender* ditujukan untuk memperluas permukaan simplisia sehingga akan lebih banyak terekstraksi dengan sari (Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2014). Didapatkan 3 kilogram simplisia yang kemudian dimaserasi berulang kali dalam toples kaca dengan pelarut etanol 70%. Etanol merupakan pelarut polar tetapi pada etanol 70%, etanol menjadi pelarut yang semi polar. Dengan menggunakan pelarut semi polar, diharapkan kandungan dari umbi *Dioscorea alata* L. yang bersifat baik polar maupun non polar akan keluar (saponin, flavonoid, dan 1-feruloylglicerol) (Praniarda, 2013). Pada ekstraksi dengan pelarut etanol memiliki keunggulan yaitu ekstrak yang terbentuk tidak akan mudah ditumbuhi kapang (Pratiwi, 2010). Selain itu, pelarut etanol dipilih dalam penelitian ini karena telah terbukti bahwa ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. dengan pelarut etanol dapat menimbulkan aktivitas antiosteoporosis pada tikus galur Wistar yang diovariectomi yaitu dalam meningkatkan diferensiasi osteoblast dan mineralisasi matriks (Chen, 2008). Sedangkan pelarut lain seperti metanol dalam ekstrak metanol umbi *Dioscorea*

*alata* L. pada penelitian Cheng (2007) tidak menunjukkan adanya aktivasi  $ER_{\alpha}$  maupun  $ER_{\beta}$ . Bila digunakan pelarut bersifat polar saja atau non polar saja maka fraksi yang keluar akan menjadi polar saja atau non polar saja. Hal ini terjadi pada pelarut air yang bersifat nonpolar sehingga pelarut air hanya akan menarik senyawa yang bersifat nonpolar saja (Praniarda, 2013). Selain itu sari dengan pelarut air lebih mudah untuk ditumbui kapang serta memerlukan waktu lebih lama untuk memekatkan ekstrak (Voight, 1994 *cit* Pratiwi, 2010).

Pencampuran simplisia dengan penyari etanol 70% kemudian didiamkan selama 4 hari sambil sesekali diaduk. Pengadukan bertujuan agar semakin luas permukaan simplisia untuk berkontak dengan penyari sehingga didapatkan senyawa yang diinginkan. Kemudian, ekstrak etanol disaring dengan kain saring dan ditampung pada toples kaca. Penyaringan bahan ini ditujukan agar pada proses ekstraksi didapatkan larutan ekstraknya saja tanpa pengetornya. Sisa bahan penyaringan direndam lagi dengan etanol sama seperti perendaman yang dilakukan sebelumnya (remaserasi). Proses remaserasi ini dimaksudkan untuk menyari lagi sisa-sisa zat aktif dalam simplisia yang belum tersari pada proses maserasi sebelumnya. Setelah remaserasi, bahan disaring lagi dan hasilnya digabung dengan bahan yang sebelumnya sudah disaring. Bahan yang sudah disaring kemudian diuapkan untuk menghilangkan kandungan etanol dalam bahan ekstrak pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$  dalam *water bath* menggunakan *vacum pump evaporator*. Penguapan ini bertujuan untuk meningkatkan jumlah zat aktif terlarut yang diinginkan dengan cara mengurangi jumlah pelarutnya (Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2014). Dari hasil penguapan tersebut didapatkan ekstrak

kental seberat 1000 gram. Maka didapatkanlah ekstrak kental umbi *Dioscorea alata* L. dengan rendemen 10% ( $\frac{1000}{10000}$ ).

Penelitian ini menggunakan tikus Sprague-Dawley betina berusia 8 minggu yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Selain karena terdapat banyak kemiripan secara fisiologis dengan manusia, ukuran *Rattus novergicus* cukup besar dengan harga yang cukup murah dibandingkan hewan uji lainnya. Sedangkan pemilihan tikus *Rattus novergicus* dengan galur Sprague-Dawley mempertimbangkan beberapa karakteristik tikus galur tersebut jika dibandingkan galur yang lainnya. Tikus Sprague-Dawley tidak agresif jika dibandingkan dengan galur Wistar sehingga akan lebih mudah dalam proses perlakuan penelitian (Ridwan, 2013). Kemudian pemilihan usia tikus 8 minggu dikarenakan pada usia tersebut tikus telah dewasa sehingga organ reproduksinya telah berfungsi sempurna (Peng, 2011).

Berat badan awal relatif sama atau homogen antara 151-280 g. Homogenitas ini ditunjukkan dengan hasil Test of Homogeneity of Variances  $p = 0,387$  ( $p > 0,05$ ). Berat badan tikus yang homogen ini diharapkan dapat mengurangi terjadinya bias pada penelitian, sehingga segala perubahan yang terjadi pada tikus hanya disebabkan oleh perlakuan (ovariektomi atau menopause dan pemberian ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. peroral melalui sonde). Sebanyak 40 tikus diadaptasi selama 1 minggu (*National Research Council*, 2011). Adaptasi ini ditujukan untuk mempersiapkan tikus secara fisik dan fisiologis terhadap lingkungan baru dan perlakuan yang akan diterimanya nanti. Dengan adanya proses adaptasi, tikus akan menjadi lebih siap terhadap perlakuan dan terhindar

dari stress jangka panjang (*Institute of Laboratory Animal Research Commission on Life Sciences*, 2010 *cit.* Ridwan, 2013). Kemudian tikus dibagi menjadi 6 kelompok secara simple random sampling, yaitu N, OVX, OVX-DA 116, OVX-DA 232, OVX-DA 463, dan OVX-Estradiol.

Setelah dilakukan adaptasi tikus selama 1 minggu, ovariektomi dilakukan pada 35 tikus dari kelompok OVX, OVX-DA 116, OVX-DA 232, OVX-DA 463, dan OVX-Estradiol. Ovariektomi ini membuat tikus tidak lagi memiliki ovarium yang merupakan penghasil utama estrogen. Estrogen merupakan hormon yang menjaga siklus kesuburan tikus betina. Sehingga dengan tidak adanya estrogen yang dihasilkan di dalam tubuh tikus, siklus kesuburan tidak akan terjaga dan kemudian tikus menopause (Nurrochmad, 2010). Tikus diovariektomi dengan diinjeksikan anestesi ketamin terlebih dahulu dengan dosis 40 mg/kgBB (Santoso, 2013). Ketamin adalah salah satu bentuk sediaan anestesi umum yang bekerja pada reseptor NMDA yang berada di sistem saraf pusat dan menimbulkan anestesi disosiasi. Anestesi umum dilakukan untuk tindakan bedah besar, salah satu contohnya adalah ovariektomi. Salah satu permasalahan utama pada anestesi umum adalah timbulnya efek samping berupa depresi pernafasan. Namun, ketamin merupakan agen anestesi yang memiliki ciri khas berupa efek sampingnya yang tidak menyebabkan gangguan pernafasan karena tonus otot pernafasan masih terkontrol dengan baik dan refleks saluran nafas yang tidak terganggu. Hal ini menunjukkan bahwa ketamin merupakan agen yang efisien untuk digunakan sebagai anestesi umum untuk hewan uji dalam percobaan ini (Katzung, 2012).

Setelah tikus teranastesi, di bagian perut dicukur untuk mempermudah proses pembedahan, lalu proses ovariektomi dimulai dengan membuat sayatan pada bagian perut dengan menggunakan gunting bedah lalu dicari ovariumnya kemudian diovariektomi. Luka bedah diolesi dengan povidon iodine untuk mencegah infeksi pasca pembedahan dan dijahit dengan menggunakan benang larut kulit (*catgut*) (Santoso, 2013). Tikus yang telah diovariektomi diberi injeksi ampisilin untuk mencegah terjadinya infeksi akibat pembedahan. Ampisilin merupakan antibiotik golongan beta laktam yang berpektrum luas. Keuntungan pemberian ampisilin dibandingkan dengan antibiotik lainnya adalah aktifitasnya kuat terhadap organisme gram positif dan juga memiliki efektivitas terhadap organisme gram negatif. Selain itu, keuntungan ampisilin lainnya adalah memiliki efektivitas tinggi terhadap pneumokokus yang resisten terhadap penisilin dan shigelosis, sehingga sering digunakan untuk mengobati infeksi berat karena organisme rentan penisilin (Katzung, 2012). Setelah ovariektomi, tikus hanya diberi pakan dan minum sembari menunggu proses penyembuhan luka akibat ovariektomi dan munculnya efek ovariektomi selama 20 hari.

Intervensi pemberian ekstrak etanol Umbi *Dioscorea alata* L. dan estradiol dilakukan sesuai dengan kelompok tikus selama 30 hari. Dalam penelitian ini, estradiol digunakan sebagai kontrol positif untuk membandingkan apakah efek ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. dapat setara jika dibandingkan dengan estrogen sintetis yang selama ini telah digunakan sebagai HRT untuk osteoporosis pada menopause. Estradiol dipilih dalam penelitian ini karena merupakan sintetis yang mirip dengan estrogen utama yang dihasilkan oleh tubuh,

estradiol-17 $\beta$ , E<sub>2</sub> (Katzung, 2012). Estradiol diberikan pada kelompok OVX-  
Estradiol dengan dosis 252  $\mu\text{g}/\text{kgBB}/\text{hari}$  peroral. Pemilihan dosis tersebut  
didasarkan pada didasarkan pada rumus konversi perhitungan dosis antar jenis  
hewan yaitu (Laurense & Bacharach, 1964 *cit.* Trisnarizki, 2007) :

**Tabel 2. Konversi Perhitungan Dosis antar Jenis Hewan (Laurense & Bacharach, 1964 *cit.* Trisnarizki, 2007)**

	20 g Mencit	20 g Mencit	400 g Marmut	1,5 kg Kelinci	2 kg Kucing	4 kg Kera	12 kg Anjing	70 kg Manusia
20 g Mencit	1,0	7,0	12,29	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
200 g Tikus	0,14	1,0	1,74	3,3	4,2	9,2	17,8	56,0
400 g Marmut	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
1,5 kg Kelinci	0,04	0,25	0,44	1,0	1,06	2,4	4,5	14,2
2 kg Kucing	0,03	0,23	0,42	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
4 kg Kera	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
12 kg Anjing	0,008	0,06	0,10	0,022	0,24	0,52	1,0	3,1
70 kg Manusia	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,013	0,16	0,32	1,0

Konversi dosis manusia (70 kg) ke tikus (200 g) = 0,018

Dosis efektif estradiol pada manusia (50 kg) = 2 mg

Dosis efektif estradiol pada manusia (70 kg) =  $2 \text{ mg} \times \frac{70}{50}$

= 2,8 mg

Dosis konversi dari manusia ke tikus =  $2,8 \times 0,018$

= 0,0504 mg/200 g BB

= 0,000252 mg/g BB

= 0,252 mg/kgBB

Jadi, dosis estradiol yang digunakan = 252  $\mu\text{g}/\text{kgBB}$

Sedangkan dosis ekstrak Umbi *Dioscorea alata* L. yang diberikan pada penelitian ini adalah 116 mg/kgBB/hari, 232 mg/kgBB/hari, dan 463 mg/kgBB/hari. Dosis ini diperoleh dari perhitungan dosis berdasarkan konsumsi perhari Umbi *Dioscorea alata* L. sebanyak 50 gram. Sebelum diberikan, ekstrak Umbi *Dioscorea alata* L. dihomogenkan dengan CMC Na 0,5%. CMC Na ini berfungsi untuk mendispersikan partikel yang tidak larut, meningkatkan viskositas, mencegah penurunan partikel, serta mencegah penggumpalan resin dan bahan berlemak (Rowe, 2009).

Selama perlakuan, tikus ditimbang setiap minggunya untuk mengetahui perkembangan berat badan. Secara umum berat badan tikus mengalami laju perkembangan berat badan yang berbeda-beda. Berat badan tikus mengalami peningkatan setelah tikus diovariectomi. Hal ini konsisten dengan penelitian terhadap hewan uji model menopause yang telah dilakukan sebelumnya (Chen, 2008). Peningkatan berat badan pada keadaan menopause disebabkan oleh beberapa hal. Pada keadaan tua, komposisi antara otot dan lemak berubah. Komposisi lemak dalam tubuh menjadi lebih banyak dibandingkan dengan jumlah otot dalam tubuh. Selain itu, estrogen berperan dalam pendistribusian lemak. Lemak oleh estrogen biasanya akan didistribusikan ke daerah pinggang. Namun dengan berkurangnya estrogen dalam tubuh, lemak kemudian didistribusikan ke daerah perut. Kapasitas perut dalam penyimpanan lemak hampir tidak terhingga sehingga akan terdapat banyak lemak yang dapat disimpan di daerah perut. Hal ini kemudian akan menimbulkan perubahan pola perilaku menuju perilaku malas untuk bergerak. Kurang bergerak inilah yang membuat peningkatan berat badan



pada keadaan menopause (Jilian, 2014). Data lengkap mengenai berat badan tikus tertera pada lampiran. Selain dilakukan penimbangan berat badan setiap minggunya, sekam dan kandang tikus pun dibersihkan. Pembersihan kandang tikus ini merupakan salah satu bentuk memperlakukan hewan uji dengan manusiawi atau *refinement* dimana membebaskan hewan uji dari rasa tidak nyaman (Ridwan, 2013).

Setelah 30 hari pemberian intervensi, semua tikus dalam percobaan dikorbankan. Organ yang diambil adalah tulang femur, tibia, serta fibulanya pada ekstremitas bawah kanan dan kiri karena densitas tulang akan lebih mudah diukur pada tulang-tulang besar tubuh tikus seperti femur, tibia, dan fibula (Nurrochmad, 2010).

Tulang yang diambil tersebut dikeringkan dalam suhu ruangan selama 2 minggu (Chen, 2008). Setelah tulang kering, tulang diukur massanya menggunakan timbangan analitik Mettler Toledo. Kemudian tulang diukur volumenya dengan menggunakan pletismometer. Setelah didapatkan angka massa dan volume tulang, angka tersebut dimasukkan ke dalam rumus densitas secara umum untuk mendapatkan berapa densitas tulang tersebut (Nurrochmad, 2010).

Rumus tersebut adalah :

$$\rho = \frac{m}{V}$$

$\rho$  : densitas ( $\text{kg/m}^3$  atau  $\text{g/cm}^3$ )

$m$  : massa (kilogram atau gram)

$V$  : volume ( $\text{m}^3$  atau  $\text{cm}^3$ )

Dari perhitungan rumus diatas akan didapatkan data densitas tulang dimana rerata densitas tulang femur, tibia, dan fibula pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada Tabel3.

**Tabel 3. Nilai Rerata Densitas Femur, Tibia, dan Fibula Tikus ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )**

No.	Kelompok	Nilai Rerata Densitas Tulang Femur, Tibia, dan Fibula ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )
1	N	$1,92 \pm 0,24^a$
2	OVX	$1,44 \pm 0,20^b$
3	OVX-Estradiol	$1,41 \pm 0,15^{b,c}$
4	OVX-DA 116	$1,53 \pm 0,19^{a,b,c}$
5	OVX-DA 232	$1,63 \pm 0,12^{a,b,c}$
6	OVX-DA 463	$1,81 \pm 0,42^{a,b}$

Keterangan :  
a,b,c

: angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak beda secara signifikan.

Berdasarkan Tabel 3 tersebut, didapatkan densitas tulang tertinggi adalah kelompok N yaitu sebesar  $1,92 \text{ mg}/\text{cm}^3$ . Sedangkan densitas tulang terendah adalah kelompok OVX-Estradiol yaitu sebesar  $1,41 \text{ mg}/\text{cm}^3$ .

Data densitas tulang yang didapat kemudian dianalisis menggunakan program SPSS. Uji normalitas data yang dilakukan dengan metode analitik Saphiro-Wilk menunjukkan kenormalan distribusi data sehingga dapat dilanjutkan menggunakan uji One Way ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95% (CI:95%). Uji normalitas yang dipilih adalah Saphiro Wilk karena jumlah sampel  $\leq 50$ . Hasil uji One Way ANOVA menunjukkan terdapat perbedaan bermakna rata-rata densitas tulang femur, tibia, dan fibula yang bermakna di antara kelompok tersebut, yaitu  $p=0,002$  ( $p<0,05$ ). Setelah diketahui ada perbedaan bermakna di antara keenam kelompok tersebut, selanjutnya dilakukan uji Post Hoc Tukey

untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna (Aminah, 2014).

Pada Tabel 3 tersebut dapat diketahui bahwa densitas tulang kelompok N lebih tinggi dan berbeda secara bermakna dengan kelompok OVX. Hal ini menunjukkan bahwa tikus yang diovariectomi mengalami penurunan densitas tulang yang bermakna jika dibandingkan tikus yang tidak diovariectomi. Pada tikus yang tidak diovariectomi, keadaan fisiologis tubuhnya masih berfungsi secara normal termasuk normalnya fungsi folikel ovarium dalam memproduksi estrogen. Hormon estrogen tersebut memiliki fungsi primer menimbulkan proliferasi sel dan pertumbuhan jaringan organ-organ kelamin dan jaringan lain yang berkaitan dengan reproduksi. Salah satu jaringan lain yang berkaitan dengan efek estrogen adalah tulang rangka. Estrogen menghambat aktivitas osteoklas dalam tulang yang berfungsi dalam mereabsorpsi tulang sehingga densitas tulangnya tetap terjaga (Guyton, 2008). Sedangkan pada tikus yang diovariectomi, tikus tidak lagi memiliki ovarium yang dapat menghasilkan estrogen. Hal ini mengganggu keseimbangan hormonal tubuh yang menjaga masa subur tikus sehingga tikus masuk dalam keadaan menopause ini (Northrup, 2006 *cit.* Sulistiany, 2013). Ketiadaan estrogen dalam tubuh juga kemudian meniadakan hal-hal yang merupakan fungsi dari estrogen, termasuk diantaranya menjaga densitas tulang. Maka pada tikus yang diovariectomi tidak adanya estrogen dalam tubuhnya menyebabkan aktivitas osteoklas meningkat dalam mereabsorpsi tulang. Tulang yang tereabsorpsi tersebut lama-kelamaan akan kehilangan kepadatannya dan terjadilah osteoporosis (Sabri, 2011 *cit.* Prasetya, 2012).

Perbandingan densitas tulang kelompok kontrol positif OVX-Estradiol dengan OVX tidak menimbulkan peningkatan densitas tulang pada kelompok OVX-Estradiol dibanding kelompok OVX. Menurut penelitian Peng tahun 2011, penurunan yang terjadi disebabkan oleh inkonsistensi kimia. Inkonsistensi kimia ini bisa disebabkan karena beberapa faktor dengan mempertimbangkan faktor adsorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi obat. Faktor yang paling mempengaruhinya adalah faktor adsorpsi obat. Tablet estradiol dalam penelitian ini diberikan dengan cara digerus, tikus tidak dipuasakan, dan diberikan secara peroral. Pemberian estradiol secara peroral dapat menyebabkan bioavailabilitas sistemiknya menjadi minimal, yaitu antara 2% sampai 10%. Bioavailabilitas yang minimal ini menjadikan estradiol tidak dapat memberikan efek sesuai dengan yang diharapkan dalam meningkatkan densitas tulang tikus ovariektomi (O'Connel, 1995). Penurunan bioavailabilitas ini disebabkan karena estradiol tidak dapat diabsorpsi secara maksimal oleh mukosa lambung. Setelah estradiol diserap dari traktus gastrointestinal, estradiol akan melewati *first pass metabolism* di hepar yang menyebabkan bioavailabilitasnya semakin berkurang karena estradiol akan diubah menjadi metabolit estron yang sebagian tidak memiliki efek fisiologis. Pemberian obat yang mengandung hormon steroid paling baik diberikan secara bukal karena dengan cara ini akan mencegah obat rusak oleh asam lambung atau hanya dapat diserap dengan sedikit dari sistem pencernaan dan menghindari *first pass metabolism* hepar (Aloba, 2009).

Densitas tulang pada kelompok perlakuan OVX-DA 116, OVX-DA 232, dan OVX-DA 463 mengalami kenaikan secara bertahap dibandingkan dengan

densitas tulang kelompok OVX seperti yang dapat dilihat dalam Tabel 3. Kenaikan densitas ini dikarenakan efek pemberian fitoestrogen yang terkandung dalam umbi *Dioscorea alata* L. sebagai pengganti estrogen endogen yang produksinya berkurang pada tikus yang diovariectomi.

*Dioscorea alata* L. memiliki beberapa senyawa fitoestrogen yang memiliki efek serupa dengan estrogen dalam tubuh manusia. Senyawa tersebut salah satunya adalah diosgenin. Secara umum, di dalam tubuh, diosgenin memiliki efek mensupresi inflamasi, yaitu dengan mekanisme menghambat produksi *Tumor Necrosis Factor* (TNF). TNF menginduksi osteoklastogenesis, yaitu menginduksi diferensiasi monosit menjadi osteoklas yang berperan dalam proses pengeroposan tulang. Dengan adanya diosgenin, efek inflamasi akan tertekan yaitu dengan mekanisme penekanan produksi TNF sehingga osteoklas yang berperan dalam pengeroposan tidak terbentuk dan osteoporosis dapat dicegah (Shishodia, 2006).

Umbi *Dioscorea alata* L. juga memiliki senyawa fitoestrogen lainnya yaitu 1-feruloylglycerol yang memiliki cara kerja mirip isoflavon di dalam tubuh yaitu dapat berikatan dengan  $ER_{\beta}$ . Dengan berikatannya 1-feruloylglycerol dengan  $ER_{\beta}$  maka akan menimbulkan efek serupa estrogen endogen yang mengaktifkan reseptor estrogen di beberapa bagian tubuh, salah satunya adalah reseptor estrogen di tulang (Cheng, 2007). Aktifnya  $ER_{\beta}$  ini menyebabkan terjadinya *remodelling* tulang (Ishida, 1998). *Remodelling* tulang yang diinduksi oleh senyawa estrogenik akan mengakibatkan menurunnya sekresi kalsitonin dan sitokin seperti IL-1, IL-6, dan  $TNF_{\alpha}$  yang berfungsi dalam penyerapan tulang.

Efek *remodelling* lain pada osteoklas adalah menekan diferensiasi dan aktivasi sel osteoklas dewasa. Sekresi  $TGF\beta$  yang merupakan mediator untuk menarik sel osteoblas ke daerah tulang yang mengalami penyerapan oleh osteoklas akan meningkat jumlahnya dan kemudian terjadilah pembentukan tulang oleh osteoblas tersebut (Onoe, 1997).

Kenaikan densitas pada kelompok OVX-DA 116, OVX-DA 232, dan OVX-DA 463 tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok OVX. Ada beberapa hal yang menunjukkan ketidaksignifikan kenaikan densitas tulang tersebut. Hal yang pertama adalah dosis ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. yang kurang sehingga tidak cukup mampu untuk menaikkan densitas tulang secara signifikan. Pada penelitian Chen dkk tahun 2008 mengenai efek ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. terhadap densitas tulang tikus yang diovariectomi menunjukkan bahwa dosis efektif adalah ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. dosis 750 mg/kgBB/hari dan dosis 1500 mg/kgBB/hari. Pada penelitian tersebut, ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. dosis 250 mg/kgBB/hari dan 500 mg/kgBB/hari terbukti tidak dapat menaikkan densitas tulang secara signifikan (Chen, 2008). Selain itu, sebab lain yang menyebabkan ketidaksignifikanan tersebut adalah diosgenin sebagai steroid primer ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. Pada penelitian mengenai isolasi senyawa ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. menunjukkan bahwa diosgenin merupakan senyawa fitoestrogen yang aktivitas estrogeniknya lebih rendah daripada isoflavon. Sehingga pada ekstrak umbi *Dioscorea alata* L. dibutuhkan dosis lebih tinggi untuk menimbulkan suatu efek estrogenik (Cheng, 2007). Penelitian oleh Zhang pada tahun 2014 menyatakan bahwa diosgenin dapat

memberikan efek antiosteoporosis pada dosis 96 mg/kgBB/hari. Sedangkan pada penelitian ini, jumlah umbi *Dioscorea alata* L. yang dipakai adalah 50 gram. Pada penelitian, 100 gram umbi *Dioscorea alata* L. hanya mengandung dengan 82,39 mg diosgenin (Rachman, 2014 cit Mar'atirrosyidah, 2015). Oleh karena itu pemberian ekstrak etanol umbi *Dioscorea alata* L. pada penelitian ini belum cukup mampu menimbulkan kenaikan densitas tulang tikus yang diovariectomi secara signifikan.