

Efek Kapsul Ekstrak Etanol Kulit Buah Delima (*Punica granatum L.*) terhadap Penanda Pembentukan dan Kualitas Tulang pada Wanita Pascamenopause

The Effect of Pomegranate Peel Ethanol Extract (*Punica granatum L.*) on Marker of Bone Formation and Bone Quality in Postmenopausal Woman

Nur Hayati Dwi Handayani^{1,3*}, Anton Bahtiar¹, Melva Louisa²

¹ Program Magister Herbal, Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia

² Departemen Farmakologi dan Terapeutik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

³ Center for Ageing Studies Universitas Indonesia

*E-mail: hayati.handayani@gmail.com

Diterima: 26 Februari 2017

Direvisi: 13 Juni 2017

Disetujui: 24 Juli 2017

Abstrak

Kulit buah delima (*Punica granatum L.*) yang diketahui mengandung asam elagat, telah diteliti dapat meningkatkan kadar osteoblas, kalsium, dan fosfor pada tikus ovariektomi, tetapi belum diketahui apakah memberikan efek pada wanita pascamenopause. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi apakah sediaan komersil kapsul ekstrak kulit buah delima memiliki efek terhadap modulasi penanda pembentukan tulang dan kualitas tulang pada wanita pascamenopause. Penelitian ini merupakan *pilot study* uji klinik fase 1 dengan desain paralel, acak, berpembanding plasebo, dan tersamar ganda, dengan 30 subjek. Subjek dipilih secara acak untuk mendapatkan sediaan komersil kapsul ekstrak etanol kulit buah delima 2 × 1100 mg/ hari atau plasebo selama 8 minggu. Sebelum dan sesudah perlakuan, subjek diperiksa kadar osteokalsin, kalsium, dan fosfornya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian sediaan cenderung menghambat laju perombakan tulang dengan menghambat peningkatan kadar osteokalsin sebagai salah satu penanda laju perombakan tulang (4,129±5,66 ng/mL pada plasebo, 1,79±5,04 ng/mL pada punica, p=0,245), tidak memengaruhi kadar kalsium (9,13±0,36 mg/dL pada plasebo, 9,21±0,39 mg/dL pada punica, p=0,379), dan tidak memengaruhi kadar fosfor (3,93±0,38 mg/dL pada plasebo, 4,12±0,41 mg/dL pada punica, p=0,138), tidak memengaruhi fungsi hati dan fungsi ginjal, serta dapat ditoleransi dengan baik. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa sediaan aman dikonsumsi, berpotensi menghambat peningkatan penanda pembentukan tulang dalam darah dan meningkatkan kualitas tulang wanita pascamenopause.

Kata kunci: *Punica granatum L.*; Wanita pascamenopause; Osteokalsin; Kalsium; Fosfor.

Abstract

Studies of pomegranate peel (Punica granatum L.), which contain ellagic acid, suggest its ability to increase osteoblast, calcium, and phosphorus in ovariectomized rats. The effects of the pomegranate peel extracts on postmenopausal women was not known. This study was aimed to evaluate the effect of pomegranate peel ethanol extract capsules in the modulation of bone formation and bone quality markers in postmenopausal women. This study is a pilot study of 1st phase of clinical trial using parallel, randomized, double-blind, and placebo controlled design, with 30 subjects. Subjects were randomized to receive commercial capsules of pomegranate peel ethanol extract 2 × 1100 mg/ day or placebo, for 8 weeks. Levels of osteocalcin, calcium, and phosphorus were examined before and after treatment. This study showed that administration of the capsules in postmenopausal women tends to reduce blood osteocalcin level (4,129±5,66 ng/mL on placebo group versus 1,79±5,04 ng/mL on punica group, p=0,245), has not significant on blood calcium level (9,13±0,36 mg/dL placebo group versus 9,21±0,39 mg/dL punica group, p=0,379), has not significant on blood phosphorus level (3,93±0,38 mg/dL placebo group versus 4,12±0,41 mg/dL on punica group, p=0,138), does not affect the function of liver and kidney, and was well tolerated. In conclusion, the commercial capsules is safe, potentially reduce marker of bone formation serum level, and increase bone quality on postmenopausal women.

Keywords: *Punica granatum L.*; Postmenopausal women; Osteocalcin; Calcium; Phosphorus.

PENDAHULUAN

Wanita menopause akan mengalami defisiensi estrogen yang menyebabkan ketidakseimbangan antara pembentukan tulang dan penyerapan tulang sehingga berdampak negatif pada mikroarsitektur tulang, menurunkan massa tulang, dan meningkatkan risiko patah tulang. Defisiensi estrogen juga akan meningkatkan laju perombakan tulang dan menurunkan aktivitas osteoblas yang diketahui mensintesis osteokalsin, yang merupakan salah satu penanda perombakan tulang sehingga mengakibatkan osteoporosis.¹

Pemberian terapi sulih hormon pada dosis tertentu secara klinis merupakan cara efektif mencegah pengeroposan tulang pada wanita menopause dan mengurangi kejadian osteoporosis. Akan tetapi, penggunaan terapi sulih hormon untuk jangka panjang menyebabkan beberapa efek samping yang tidak diinginkan, seperti adanya peningkatan risiko terjadinya kanker payudara dan endometrium.² Fitoestrogen telah diteliti sebagai alternatif yang potensial dan relatif aman untuk pengobatan terapi sulih hormon.³ Fitoestrogen adalah salah satu alternatif alami yang potensial untuk mencegah pengeroposan tulang. Fitoestrogen merupakan senyawa non-steroid dari tanaman yang secara struktural mirip dengan estrogen dan memiliki efek estrogenik lemah dan antiestrogenik.⁴ Penelitian pada hewan menunjukkan bahwa fitoestrogen memiliki efek perlindungan terhadap kehilangan tulang akibat kekurangan estrogen.³

Salah satu tanaman yang mengandung beberapa fitoestrogen alami adalah delima (*Punica granatum* L). Delima yang termasuk dalam suku Lythraceae, telah dikenal dan digunakan sebagai obat tradisional.⁵ Delima mengandung senyawa asam elagat yang telah diteliti memiliki aktivitas sebagai *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERMs). Asam elagat dapat memengaruhi aktivitas subtipe reseptor estrogen ER α dan ER β . Aktivitas estrogenik asam elagat bekerja pada ER α ,

sedangkan aktivitas antiestrogenik bekerja pada ER β . Asam elagat memiliki aktivitas antiestrogenik pada sel payudara. Asam elagat memiliki aktivitas estrogenik dengan menginduksi nodul mineralisasi pada sel osteoblas. Tidak terdapat aktivitas estrogen/ antiestrogen asam elagat pada sel endometrium.⁶ Kulit buah delima memiliki efek meningkatkan kadar fosfor dan osteoblas pada tikus yang diovariectomi⁷. Data toksisitas akut fraksi polar kulit delima yaitu LD₅₀ pada tikus (oral) sebesar 12.579,4 mg/ kg BB, sedangkan toksisitas kronik fraksi polar kulit buah delima menunjukkan tidak ada efek karsinogenik, mutagenik, dan teratogenik.⁷ Efek fitoestrogen secara klinis yang terkandung dalam kulit buah delima terhadap penanda pembentukan tulang dan kualitas tulang pada manusia belum diteliti. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efek pemberian ekstrak kulit buah delima terhadap penanda pembentukan tulang (osteokalsin), kalsium dan fosfor pada wanita pascamenopause, serta keamanannya.

METODE

Penelitian ini merupakan *pilot study* uji klinik fase 1, menggunakan desain paralel, tersamar ganda, dengan pembandingan plasebo. Kegiatan yang dilakukan adalah pemberian kapsul komersial ekstrak kulit buah delima kepada subjek, melakukan pemeriksaan kadar osteokalsin darah, serta memonitor fungsi hati, fungsi ginjal, dan kejadian tidak diinginkan.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Cobas e601, sedangkan bahan uji adalah serum 20 μ L dan reagen N-MID Osteocalcin untuk menganalisis kadar osteokalsin serum menggunakan metode *Elecsys N-MID Osteocalcin Assay* (ECLIA) dengan hasil dalam satuan ng/mL. Analisis kalsium serum dilakukan menggunakan metode *O-cresolphthalein complexone*. Analisis fosfor serum dilakukan menggunakan metode

Phosphomolybdate colorimetric. Analisis fungsi hati dilakukan dengan mengukur kadar SGOT dan SGPT menggunakan metode *IFCC without pyridoxal-5-phosphate activation* (P5P). Analisis fungsi ginjal dilakukan dengan mengukur kadar ureum menggunakan metode *Enzymatic UV test "Urease-GLDH"* sedangkan kadar kreatinin menggunakan metode *Colorimetri Enzymatic*.

Bahan kapsul uji berupa kapsul komersil yang diperoleh dari PT. XX dan plasebo. Kapsul komersil berisi ekstrak etanol 70% kulit buah delima. Dosis yang diberikan kepada subjek sebesar 2×1100 mg per hari sesuai yang tertera pada kemasan produk komersil. Plasebo menggunakan maltodextrin. Kapsul uji dianalisis kandungan asam elagat dengan menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

Subjek penelitian ini adalah wanita pascamenopause sehat, berusia ≥ 50 tahun, mengalami menopause ≥ 1 tahun, BMI (*Body Mass Index*) ≤ 27 , memiliki anak ≥ 2 , fungsi hati dan ginjal dalam batas normal berdasarkan anamnesis, pemeriksaan fisik, dan pemeriksaan laboratorium, bersedia mengikuti prosedur penelitian dan menandatangani lembar persetujuan. Subjek penelitian dengan riwayat merokok, mengkonsumsi alkohol; mendapatkan terapi sulih hormon, memiliki riwayat penyakit Diabetes Mellitus, hipertensi *grade II*, penyakit jantung, dan masalah reproduksi tidak diikutsertakan dalam penelitian ini.

Prosedur Kerja

Kapsul uji

Kapsul komersil ekstrak kulit buah delima diolah dari simplisia kering kulit buah delima yang diekstraksi menggunakan metode perkolasi dengan pelarut etanol 70%. Selanjutnya, ekstrak dikeringkan dengan metode *vacuum bed dryer*.

Prosedur KCKT

Sampel yang dianalisis menggunakan KCKT adalah standar asam elagat dan ekstrak etanol kulit buah delima. Fase gerak berupa metanol dan air.⁸ Kondisi KCKT yang digunakan pada analisis ini mencakup fase gerak metanol-air 65:35, volume injeksi 20 μ L, dan waktu elusi selama 15 menit.

Standar 100 ppm disiapkan dengan melarutkan 6,6 mg asam elagat dalam 66 mL metanol, kemudian disonikator selama 15 menit.

Serbuk kering ekstrak etanol kulit buah delima ditimbang sebanyak 50 mg, diencerkan dengan 50 mL metanol kemudian disonikator selama 1 jam. Sampel yang dianalisis merupakan campuran asam elagat dan ekstrak etanol kulit buah delima dengan perbandingan 75% : 25%

Pengukuran kadar serum osteokalsin, kalsium, fosfor, fungsi hati, dan fungsi ginjal

Sebanyak 5 ml sampel darah vena diambil dari subjek, disentrifuse pada putaran 3000 rpm selama 10-15 menit. Setelah terjadi pemisahan, serum diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang bersih dan kering.

Pengukuran kadar osteokalsin serum menggunakan alat Cobas e601, sedangkan bahan uji adalah serum 20 μ L dan reagen *N-MID Osteocalcin* dengan metode *Elecsys N-MID Osteocalcin Assay* (ECLIA) dengan hasil dalam satuan ng/mL. Analisis kalsium serum dilakukan menggunakan metode *O-cresolphthalein complexone*. Analisis fosfor serum menggunakan metode *Phosphomolybdate colorimetric*.

Pengukuran fungsi hati (kadar serum SGOT/SGPT) menggunakan metode *IFCC without pyridoxal-5-phosphate activation* (P5P). Analisis fungsi ginjal dengan mengukur kadar ureum dan kreatinin masing-masing dilakukan menggunakan metode *Enzymatic UV test "Urease-*

GLDH” dan metode *Colorimetri Enzymatic*.

Perlakuan Subjek Penelitian

Subjek diperoleh dengan melakukan skrining setelah diberikan penjelasan dan menandatangani lembar persetujuan. Pada subjek yang lolos skrining, dilakukan pembagian secara acak untuk mendapatkan kapsul uji atau plasebo selama 8 minggu per subjek. Sebelum dan setelah perlakuan, diperiksa kadar serum osteoklasin, kalsium dan fosfor, serta kejadian tidak diinginkan (anamnesis, pemeriksaan fisik, pemeriksaan laboratorium fungsi hati dan fungsi ginjal). Pemantauan kepatuhan minum obat dilakukan setiap hari dengan dikontrol oleh kader posyandu lansia yang telah diberikan pelatihan. Pemeriksaan kesehatan kepada subjek dilakukan seminggu sekali. Apabila terdapat subjek yang sakit sewaktu-waktu selama penelitian, subjek dapat menghubungi peneliti untuk mendapatkan pengobatan.

Subjek akan dikeluarkan dari penelitian jika kepatuhan < 80%, tidak rutin meminum kapsul uji atau plasebo sesuai aturan minum yang telah ditetapkan, pindah dari wilayah penelitian selama penelitian berlangsung, dan mengundurkan diri dari penelitian karena sebab apapun. Penelitian ini dilakukan di wilayah kerja Posyandu Lansia binaan Center for Ageing Studies Universitas Indonesia.

Persetujuan Kaji Etik

Protokol uji klinik ini telah diajukan dan mendapat persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia-Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo, Jakarta dengan nomor 592/UN2.F1/ETIK/2014.

Analisis Data

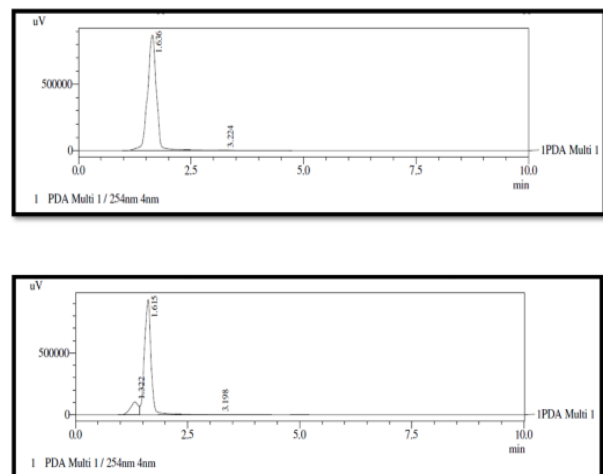
Data yang diperoleh diolah secara statistik menggunakan SPSS 18. Analisis yang dilakukan adalah normalitas (uji Kolmogorov Smirnov) dan uji homogenitas (uji Levene). Jika data terdistribusi normal dan homogen, maka

untuk melihat hubungan antara kelompok perlakuan digunakan uji T-independen. Namun, jika data tidak terdistribusi normal dan homogen, maka digunakan uji Mann Whitney.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penetapan Kadar menggunakan KCKT

Identifikasi dengan KCKT dilakukan menggunakan fase gerak metanol dan air dalam bejana terpisah.⁹ Perbandingan metanol dan air adalah 65:35. Sampel yang disiapkan adalah asam elagat (AE, sebagai standar) dan campuran asam elagat dengan ekstrak etanol kulit delima (AE+EE). Hasil KCKT (Gambar 1) menunjukkan kromatogram asam elagat (standar) 100 ppm memiliki waktu retensi 1.636 menit dan luas area kurva 12074941; sedangkan kromatogram asam elagat-ekstrak etanol kulit (75:25) memiliki waktu retensi 1,615 menit dan luas area kurva 9691982.



Gambar 1. Hasil KCKT standar asam elagat (atas) dan campuran asam elagat-ekstrak etanol kulit buah delima perbandingan 75:25 (bawah)

Hasil KCKT menunjukkan bahwa pada campuran AE+EE memiliki puncak yang sama dengan AE pada waktu retensi 1,6 menit. Hal ini menandakan bahwa dalam ekstrak etanol kulit delima memiliki kandungan asam elagat, yang kemudian dihitung kadarnya untuk menetapkan kadar

asam elagat yang didapatkan subjek pada penelitian ini.

Penetapan Kadar Asam Elagat

Telah diketahui bahwa kulit buah delima mengandung asam elagat.⁷ Perhitungan untuk mengetahui kadar asam elagat yang terkandung dalam kapsul uji dilakukan dengan cara membandingkan luas area kurva kromatogram standar dan sampel.

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka tiap subjek penelitian yang mendapatkan kapsul uji, mengkonsumsi asam elagat 46,64 mg/ hari.

Karakteristik Subjek

Sebanyak 169 calon subjek yang menjalani skrining, didapatkan 33 subjek lulus skrining dan selanjutnya dilakukan randomisasi untuk mendapatkan kapsul komersil ekstrak etanol kulit buah delima 2 × 1100 mg/ hari atau plasebo selama 8 minggu. Sebanyak 30 subjek mengikuti penelitian hingga selesai. 3 subjek keluar dari penelitian dengan alasan bosan, minum herbal lain, dan pindah rumah tanpa ada nomor telpon yang dapat dihubungi. Karakteristik subjek pada kelompok punica dan plasebo dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil Pemeriksaan Osteokalsin, Kalsium, dan Fosfor

Hasil pemeriksaan osteokalsin, kalsium, dan fosfor sebelum dan setelah perlakuan serta perubahan kadarnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Osteokalsin

Pada Tabel 2 diketahui adanya peningkatan osteokalsin pada kelompok plasebo (4,129±5,66 ng/dL) dan punica (1,79±5,04 ng/dL), tetapi tidak berbeda bermakna (p=0,245). Kelompok plasebo mengalami peningkatan lebih besar daripada kelompok punica. Peningkatan osteokalsin pada wanita pascamenopause yang merupakan subjek penelitian ini sejalan dengan hasil pengukuran osteokal-

Tabel 1. Karakteristik subjek

Parameter	Plasebo (n=16)	Punica (n=14)	Nilai p
	Rerata±SB	Rerata±SB	
Umur (tahun)	55,56±3,75	56,29±3,68	0,600 ¹
IMT (kg/ M ²)	24,78±2,12	24,17±2,17	0,160 ²
Jumlah anak	3,75±1,12	3,6±1,2	0,195 ²
Usia Menarche (tahun)	13,13±1,54	13,42±1,8	0,834 ²
Lama periode menopause (tahun)	5,91±3,13	8,64±4,86	0,113 ²
TD sistol (mmHg)	122,19±8,36	120,71±13,85	0,240 ²
TD diastol (mmHg)	78,75±6,19	78,57±6,63	0,830 ²
Kolesterol total (mg/ dl)	186,88±30,77	189,5±24,15	0,737 ²
Gula darah sewaktu (mg/ dl)	102,69±17,83	111,21±25,63	0,294 ¹
SGOT (u/l)	18,75±3,64	20,14±2,3	0,830 ¹
SGPT (u/l)	13,44±4,3	14,57±4,9	0,550 ¹
Ureum (mg/dL)	26,56±5,68	26,00±3,46	0,910 ¹
Kreatinin (mg/dL)	0,68±0,10	0,63±0,1	0,722 ²
Urea N (mg/dL)	12,44±2,55	10,35±2,02	0,830 ²

Keterangan: SB= simpangan baku; jumlah sampel (n) pada kelompok plasebo =16; jumlah sampel (n) pada kelompok punica =14; 1: uji t-independent; 2: uji Mann whitney; (*) signifikan jika nilai p < 0,05

sin yang meningkat signifikan pada tikus yang telah diovariectomi dibandingkan dengan SHAM.¹ Penelitian ini juga menyatakan bahwa kadar osteokalsin semakin meningkat signifikan pada kelompok wanita osteoporosis pasca menopause dibandingkan dengan kelompok wanita pascamenopause tanpa osteoporosis (p<0.001).

Diketahui bahwa osteokalsin merupakan protein matrik tulang yang disintesis oleh osteoblas dewasa, yang ter-

Tabel 2. Osteokalsin, kalsium, dan fosfor

Parameter (Nilai normal dan satuan)	Osteokalsin (15-46 ng/ ml)		Nilai P	Kalsium (9-11 mg/ dl)		Nilai p	Fosfor (2,5-4,5 mg/ dl)		Nilai p
	Plasebo	Punica		Plasebo	Punica		Plasebo	Punica	
Sebelum perlakuan	29,58±9,76	30,43±10,34	0,819 ¹	9,79±0,53	9,95±1,16	0,118 ²	4,33±0,45	4,57±0,54	0,212 ¹
Setelah perlakuan	33,71±11,46	32,22±10,74	0,618 ²	9,13±0,36	9,21±0,39	0,379 ²	3,93±0,38	4,12±0,41	0,138 ²
Perubahan Sebelum dan setelah perlakuan	4,129±5,66	1,79±5,04	0,245 ¹	-0,66±0,62	-0,75±0,90	0,453 ²	-0,40±0,49	-0,44±0,42	0,830 ¹

Keterangan: 1: uji t-independent; 2: uji mann whitney; (*) signifikan jika nilai p<0,05

diri dari 15% protein nonkolagen.¹ Osteokalsin merupakan salah satu penanda pembentukan tulang yang menunjukkan peningkatan laju perombakan tulang terkait dengan usia.^{1,10} Penanda perombakan tulang berguna dalam memperkirakan risiko kekurangan massa tulang, resiko fraktur akibat osteoporosis, atau untuk memantau keefektifan pemberian terapi antiresorpsi tulang. Pada menopause, laju perombakan tulang meningkat akibat defisiensi estrogen.^{1,10}

Pemberian ekstrak etanol kulit buah delima 2 × 1100 mg, selama 8 minggu pada penelitian ini, memiliki kecenderungan menghambat peningkatan kadar serum osteokalsin (p=0,245). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit buah delima yang termasuk dalam fitoestrogen berpotensi menurunkan kadar penanda laju perombakan tulang, sehingga memiliki efek perlindungan terhadap kehilangan tulang karena kekurangan estrogen pada wanita pascamenopause seperti yang dinyatakan.^{3,9}

Pada uji praklinik pemberian fraksi polar kulit buah delima 200 mg/ kg bb pada tikus OVX, terdapat peningkatan kadar estradiol dan kadar osteoblast, setara dengan kelompok SHAM.⁷ Sartika dkk (2015) mengevaluasi pengaruh pemberian ekstrak kulit buah delima 2 × 1100 mg selama 8 minggu terhadap kadar estradiol pada wanita pascamenopause mendapatkan hasil bahwa terdapat peningkatan kadar

estradiol pada kelompok punica sebesar 3,74±5,39 mg/dL, sedangkan pada kelompok plasebo sebesar 2,75±2,72 mg/dL (p = 0,898).¹³

Telah dinyatakan bahwa osteoblas mensintesis osteokalsin yang merupakan protein matrik tulang.¹ Defisiensi estrogen pada wanita pascamenopause menurunkan aktivitas osteoblas.¹ Hormon estrogen menghambat kerja osteoklas meresorpsi tulang dan meningkatkan kerja osteoblas, yang mensintesis osteokalsin.¹⁴ Penurunan resorpsi tulang menyebabkan osteokalsin tidak dilepas ke dalam sirkulasi, sehingga kadar osteokalsin dalam darah tidak.¹

Kalsium

Kadar kalsium pada subjek penelitian ini ditampilkan pada Tabel 2. Pada penelitian ini, rerata kadar kalsium subjek sebelum perlakuan pada kelompok plasebo sebesar 9,79±0,53 mg/dL sedangkan pada kelompok punica sebesar 9,95±1,16 mg/dL, tidak terdapat perbedaan bermakna (p=0,118). Rerata kadar kalsium setelah perlakuan pada kelompok plasebo sebesar 9,13±0,36 mg/dL, sedangkan pada kelompok punica sebesar 9,21±0,39 mg/dL, tidak berbeda bermakna (p=0,379). Rerata perubahan kadar kalsium pada kelompok plasebo sebesar -0,66±0,62 mg/dL sedangkan pada kelompok punica sebesar -0,75 ±0,90 mg/dL, tidak ada perbedaan bermakna antara kedua kelompok (p=0,453). Kadar kalsium dalam batas normal (8,4-10,2 mg/dL).

Hasil ini sejalan dengan penelitian Martin dkk (2009) yang menunjukkan bahwa pada kelompok wanita pascamenopause sehat memiliki rerata kadar serum kalsium sebesar 9,4 mg/dL.¹⁵ Atalay dkk (2012) melaporkan bahwa kadar kalsium pada wanita pascamenopause dengan lama menopause 5-10 tahun dalam batas normal (9.7 ± 0.4 mg/dl) tidak berbeda bermakna dengan kadar kalsium pada kelompok kontrol, yaitu wanita usia 25-34 tahun (9.7 ± 0.3 mg/dl, $p=0,089$).¹¹ Dapat disimpulkan bahwa pada pemberian ekstrak kulit delima 2×1100 mg ekstrak etanol kulit buah delima selama 8 minggu tidak memengaruhi kadar kalsium subjek.

Fosfor

Pada Tabel 2, diketahui rerata kadar fosfor serum subjek kelompok plasebo sebelum perlakuan sebesar $4,33 \pm 0,45$ mg/dL sedangkan subjek kelompok punica sebelum perlakuan sebesar $4,57 \pm 0,54$ mg/dL, dan tidak terdapat perbedaan bermakna ($p=0,212$). Setelah 8 minggu perlakuan, rerata kadar fosfor anorganik pada kelompok plasebo sebesar $3,93 \pm 0,38$ mg/dL, sedangkan pada kelompok punica sebesar $4,12 \pm 0,41$ mg/dL, dan tidak ada perbedaan bermakna pada kedua kelompok ($p=0,138$). Rerata perubahan kadar fosfor anorganik sebelum dan setelah perlakuan pada kelompok plasebo sebesar $-0,40 \pm 0,49$ mg/dL, sedangkan pada kelompok punica sebesar $-0,44 \pm 0,42$ mg/dL, dan tidak berbeda bermakna ($p=0,830$).

Temuan ini tidak jauh berbeda dengan penelitian Atalay dkk (2012) yang melaporkan bahwa kadar fosfor wanita pascamenopause sebesar $3,5 \pm 0,3$ mg/dL.¹¹ Demikian juga yang dilaporkan oleh Fazlini dkk (2013) bahwa rerata kadar fosfor pada subjek usia 50-65 tahun pada penelitian ini dalam batas normal ($2,5-4,5$ mg/dl).¹⁶

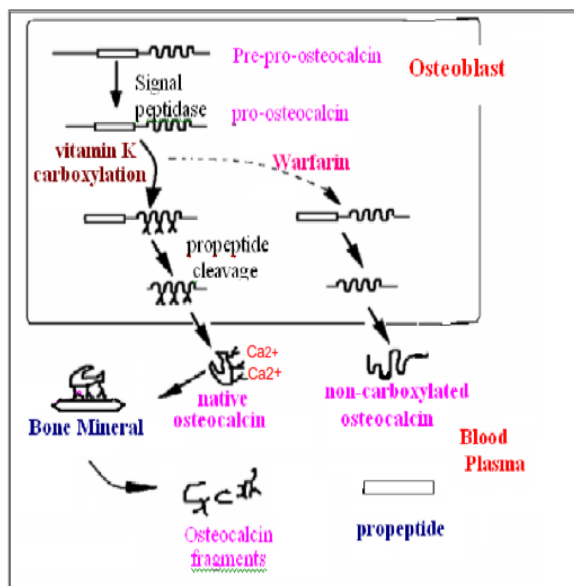
Telah dinyatakan bahwa kadar kalsium dan fosfor dalam darah selalu dijaga dalam keadaan rasio yang seimbang oleh mekanisme homeostasis.¹⁸ Atalay dkk

(2012) melaporkan bahwa kadar fosfor serum pada kelompok wanita pascamenopause dengan lama menopause 5-10 tahun tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol, yaitu kelompok wanita pramenopause (25-34 tahun) dan dalam batas normal ($3,5 \pm 0,3$ mg/dL versus $3,6 \pm 0,4$ mg/dL, $p=0,838$).¹¹ Kadar fosfor pada kelompok wanita pascamenopause dengan osteoporosis tidak berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol ($3,6$ [$3,0-3,8$] mg/dL versus $3,6$ [$3,4-3,9$] mg/dL, $p=0,818$), walaupun kadar kalsium pada wanita pascamenopause dengan osteoporosis mengalami peningkatan ($10,0$ [$9,7-10,2$] mg/dL versus $9,7$ [$9,4-9,9$] mg/dL, $p=0,08$)¹¹. Dapat disimpulkan bahwa pada pemberian ekstrak kulit delima 2×1100 mg selama 8 minggu tidak memengaruhi kadar fosfor. Kadar fosfor dalam batas normal.

Hubungan antara Osteokalsin, Kalsium, dan Fosfor

Osteokalsin merupakan protein matrik tulang yang disintesis oleh osteoblas dewasa, yang terdiri dari 15% protein nonkolagen. 80-90% osteokalsin berikatan dengan hidroksiapatit tulang, sedikit yang dilepaskan dalam sirkulasi.¹²

Osteokalsin memiliki afinitas yang tinggi dengan kalsium. Kalsium bersama fosfor membentuk hidroksiapatit. Osteokalsin mengikat hidroksiapatit dan meningkatkan penyerapan hidroksiapatit dalam matriks tulang pada proses mineralisasi tulang.¹ Gambar 2 menunjukkan struktur ikatan osteokalsin dengan kalsium.¹ Wanita pascamenopause mengalami penurunan hormon estrogen yang menyebabkan terjadinya peningkatan resorpsi tulang. Selama resorpsi tulang, osteokalsin dilepaskan dari matrik tulang ke sirkulasi, sehingga kadar serum osteokalsin meningkat.¹ Peningkatan osteokalsin juga menunjukkan terjadinya peningkatan laju perombakan tulang.¹¹



Gambar 2. Struktur Ikatan Osteokalsin dengan Kalsium¹

Hormon estrogen juga merupakan inhibitor resorpsi kalsium di dalam tulang, bekerja pada ginjal untuk reabsorpsi kalsium di dalam tubulus ginjal, dan melakukan penyerapan kalsium di dalam duodenum.¹⁹ Penurunan hormon estrogen mengakibatkan terjadinya peningkatan resorpsi kalsium dan fosfor dalam tulang, penurunan absorpsi kalsium di duodenum, dan penurunan reabsorpsi kalsium di ginjal sehingga kadar kalsium dalam darah menurun dan meningkatkan resorpsi tulang oleh osteoklas.¹⁹ Peningkatan osteokalsin

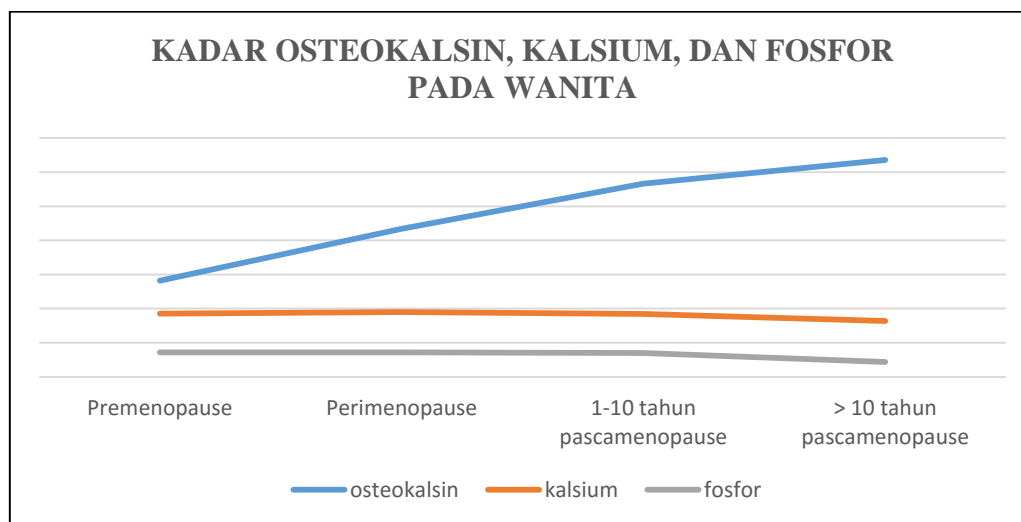
dan penurunan kalsium fosfor menyebabkan peningkatan laju perombakan tulang dan merupakan faktor risiko terjadinya osteoporosis.²⁰

Gambar 3 menunjukkan kadar osteokalsin, kalsium, dan fosfor serum pada wanita sejak masa premenopause hingga pasca menopause lebih dari 10 tahun.

Subjek penelitian ini memiliki lama menopause berkisar 5 tahun pada kelompok plasebo dan 8 tahun pada kelompok punica.

Pada wanita pascamenopause 1-10 tahun, terjadi peningkatan osteokalsin, sedangkan kalsium dan fosfor cenderung menurun. Jika kadar osteokalsin meningkat dalam sirkulasi dan kadar kalsium-fosfor serum menurun, terjadi peningkatan laju *turnover* tulang dan penurunan proses mineralisasi tulang yang menyebabkan menurunnya kualitas tulang; tulang keropos dan mudah patah.¹

Pada pemberian ekstrak kulit buah delima 2×1100 mg selama 8 minggu, kadar estradiol yang cenderung meningkat ($3,74 \pm 5,39$ mg/dL versus $2,75 \pm 2,72$ mg/dL, ($p > 0,05$))¹⁷ sehingga cenderung menekan peningkatan kadar osteokalsin pada kelompok punica ($1,79 \pm 5,04$ ng/mL versus $4,129 \pm 5,66$ ng/mL) dan mempertahankan kadar kalsium-fosfor serum dalam batas normal.



Gambar 3. Kadar Osteokalsin, Kalsium, dan Fosfor pada Wanita^{1, 4, 20}

Tabel 3. Parameter Keamanan (Fungsi Hati dan Fungsi Ginjal)

Parameter	Nilai Normal	Sebelum Perlakuan (Rerata±SB)		Nilai p	Setelah Perlakuan (Rerata±SB)		Nilai p
		Plasebo	Punica		Plasebo	Punica	
Fungsi Hati							
SGOT (u/ L)	5-35	18,75±3,64	20,14±2,3	0,830 ¹	19,31±3,22	20,43±3,5	0,291
SGPT (u/ L)	5-35	13,44±4,3	14,57±4,9	0,550 ¹	15±5,07	15,57±4,07	0,337
Fungsi Ginjal							
Ureum (mg/ dl)	10-50	26,56±5,68	26,00±3,46	0,910 ¹	22,87±3,34	22,00±4,15	0,528
Kreatinin (mg/ dl)	0,6-1,3	0,68±0,10	0,63±0,1	0,722 ²	0,60±0,10	0,63±0,09	0,477

Keterangan: 1: uji t-independen, 2: uji Mann whitney; (*) signifikan jika nilai p < 0,05

Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kulit buah delima 2 × 1100 mg selama 8 minggu cenderung menekan peningkatan laju perombakan tulang, meningkatkan konformasi osteokalsin dengan hidroksiapatit, dan meningkatkan penyerapan hidroksiapatit dalam matriks tulang pada proses mineralisasi tulang seperti yang telah dinyatakan Jagtap dkk.¹

Kejadian Tidak Diinginkan (KTD)

Pemeriksaan pada subjek berupa anamnesis dan pemeriksaan fisik dilakukan setiap satu minggu sekali, selama 8 minggu perlakuan. Selama pemberian kapsul, tidak ditemukan gejala klinik yang dikeluhkan oleh para subjek penelitian yang disebabkan oleh pemberian kapsul.

Hasil pemeriksaan fungsi hati dan fungsi ginjal menunjukkan bahwa kadar SGOT/ SGPT serta ureum/ kreatinin pada kelompok plasebo dan punica setelah perlakuan tidak berbeda bermakna (p>0,05) dan dalam batas normal (Tabel 3).

KESIMPULAN

Pemberian kapsul ekstrak etanol kulit buah delima 2 x 1100 mg selama 8 minggu cenderung memperbaiki kualitas tulang dengan menurunkan laju perombakan tulang dan mempertahankan proses mineralisasi tulang, serta tidak memengaruhi fungsi hati dan fungsi ginjal.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kemenristek Dikti selaku pemberi dana hibah penelitian ini dan kepada semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR RUJUKAN

1. Jagtap VR, Ganu JV, Nagane NS. BMD and serum intact osteocalcin in postmenopausal osteoporosis women. *Indian Journal Clinical Biochemistry*. 2011; 26: 70-73.
2. Lacey Jr JV, Mink PJ, Lubin JH, Sherman ME, Troisi R, Hartge P, et al. Menopausal hormone replacement therapy and the risk of ovarian cancer. *JAMA*. 2002; 288: 334-41.
3. Al-Anazi AF, Qureshi VF, Javaid Kh, Qureshi Sh. Preventive effects of phytoestrogens against postmenopausal osteoporosis as compared to the available therapeutic choices: An overview. *J Nat Sci Biol Med*. 2011 Jul-Dec; 2(2): 154-63.
4. Purdie D. *Postmenopausal osteoporosis: hormones and other therapies*. London: Taylor Francis Group; 2013
5. Sreekumar, Thankayyan, Santhosh, Baddireddi, Sreeharshan. Pomegranate extract demonstrate a selective estrogen receptor modulator profile in human tumor cell lines and in vivo models of estrogen deprivation. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013; 23: 725-32.
6. Lim TK. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. London: Springer; 2012.
7. Bahtiar A, Sunarmi, Razalifha, Qomariah N, Wuyung, Arsianti. *Polar Fraction of*

- Punica granatum* L. peel extract increased osteoblast number on ovariectomized rat bone. *International Journal of Herbal Medicine*. 2014; 2 (1): 65-70
8. Patel RK, Patel VR, Patel MG. Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous determination of Embelin, Rottlerin and Ellagic Acid in *Vidangadi churna*. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2012; 2 (5): 366-71
 9. Lee J, Vasikaran S. Current recommendations for laboratory testing and use of bone turnover markers in management of osteoporosis. *Annals Laboratory Medicine*. 2012; 32: 105-12.
 10. Civitelli R, Armamento-Villareal R, Napoli N. Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice. *Osteoporosis international*. 2009 Jun 1;20(6):843-51.
 11. Atalay S, Elci A, Kayadibi H, Onder C, Aka. Diagnostic utility of osteocalcin, undercarboxylated osteocalcin, and alkaline phosphatase for osteoporosis in premenopausal and postmenopausal women. *Annals of Laboratory Medicine*. 2012; 32: 23-30.
 12. Arifin Z, Hestiantoro A, Baziad A. Pemberian susu yang difortifikasi kalsium kadar tinggi vitamin D dalam memperbaiki perombakan tulang perempuan pasca-menopause. *Majalah Obstetri Ginekologi Indonesia*. 2010; 34: 31-8.
 13. Siddiqui S, Arshad M. Osteogenic potential of *punica granatum* through matrix mineralization, cell cycle progression and *runx2* gene expression in primary rat osteoblasts. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014 Nov 20;22(1):72.
 14. Kini U, Nandeesh BN. *Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg; 2012.
 15. Martin E, Miller M, Krebsbach L, Beal JR, Schwartz GG, Sahmoun AE. Serum calcium levels are elevated among women with untreated postmenopausal breast cancer. Springer Science Business; 2009.
 16. Fazlini MF, Suriah AR, Zaitun Y, Kandiah M, Chee WS, Chan YM, Chan SP. Calcium supplementation amongst postmenopausal women: Effect on serum calcium, phosphorus and magnesium level. *International Food Research Journal*. 2013; 20 (1): 477-80
 17. Hamdi RA. Evaluation of serum osteocalcin level in iraqi postmenopausal women with primary osteoporosis. *Journal Faculty of Medicine Baghdad*. 2013; 55 (2): 166-9
 18. Sherwood L. *Fundamentals of Human Physiology*. Jakarta: EGC; 2011.
 19. *Herbalism, Phytochemistry, and Ethnopharmacology*. New York: Science Publisher; 2011.
 20. Media Hannemann A, Friedrich N, Ittermann T, Nauck M. Reference intervals for serum osteocalcin concentrations in adult men and women from the study of health in Pomerania. *BMC Endocrine Disorders*. 2013; 13 (11): 1-9.