



**EFEKTIVITAS PEMBERIAN EKSTRAK TAMARINDUS
INDICA TERHADAP JUMLAH SEL OSTEOLAS
TULANG FEMUR TIKUS WISTAR
JANTAN YANG DIINDUKSI
ALUMINIUM**

SKRIPSI

Oleh

**Indah Pratiwi
NIM 162010101127**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2020**



**EFEKTIVITAS PEMBERIAN EKSTRAK TAMARINDUS
INDICA TERHADAP JUMLAH SEL OSTEOLAS
TULANG FEMUR TIKUS WISTAR
JANTAN YANG DIINDUKSI
ALUMINIUM**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Ilmu Kedokteran (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

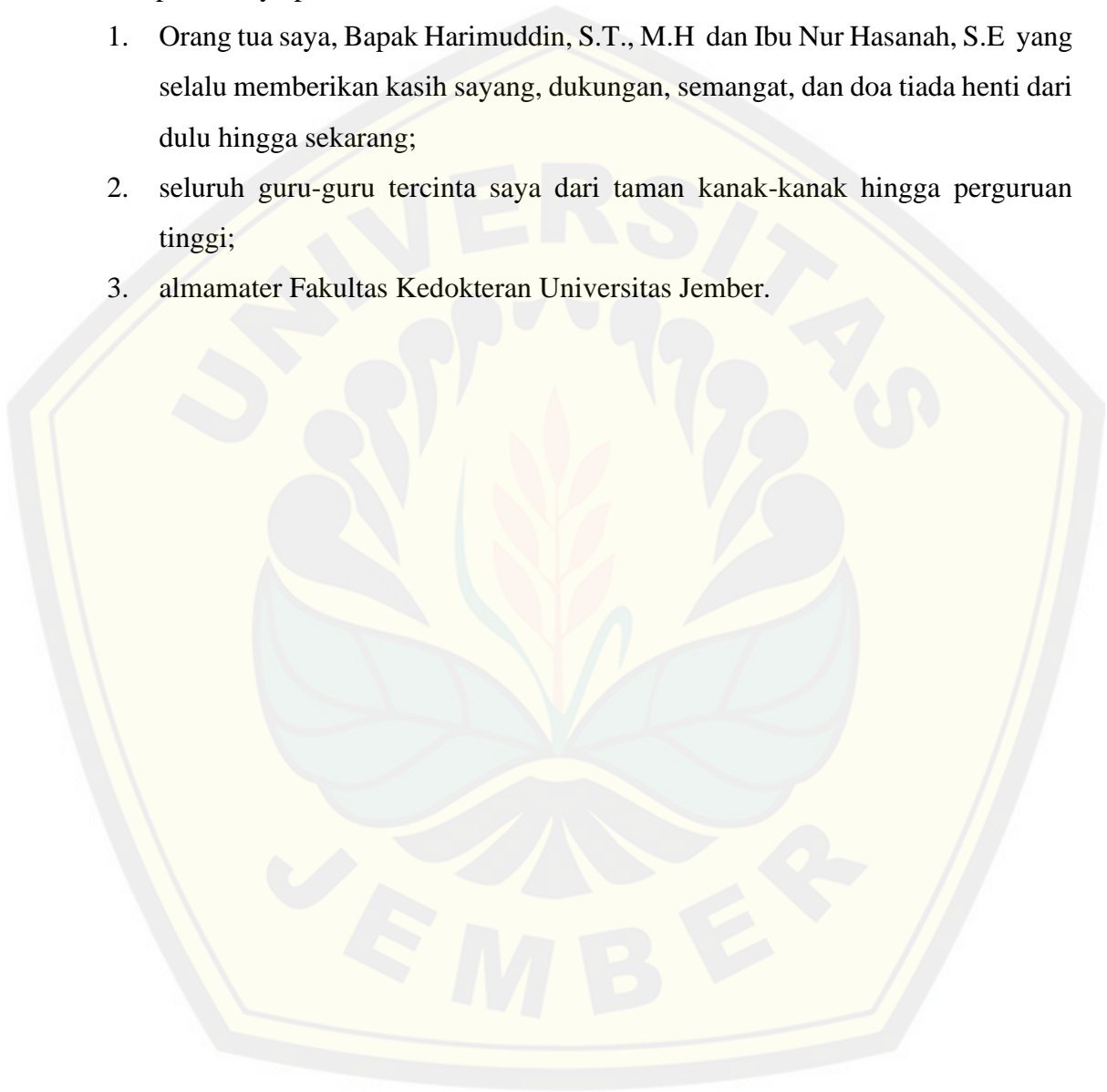
Indah Pratiwi
NIM 162010101127

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2020**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Orang tua saya, Bapak Harimuddin, S.T., M.H dan Ibu Nur Hasanah, S.E yang selalu memberikan kasih sayang, dukungan, semangat, dan doa tiada henti dari dulu hingga sekarang;
2. seluruh guru-guru tercinta saya dari taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi;
3. almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



MOTO

Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya.
(Terjemahan Surah Al Baqarah ayat 286)



* Departemen Agama Republik Indonesia. 2012. *AL QUR'AN PER KATA, TAJWID WARNA ROBBANI*. Jakarta: Surprise.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

nama : Indah Pratiwi

NIM : 162010101127

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efektivitas Pemberian Ekstrak Tamarindus Indica Terhadap Jumlah Sel Osteoblas Tulang Femur Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Aluminium” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 24 Maret 2020

Yang menyatakan,

Indah Pratiwi

NIM 162010101127

SKRIPSI

**EFEKTIVITAS PEMBERIAN EKSTRAK TAMARINDUS INDICA
TERHADAP JUMLAH SEL OSTEOBLAS TULANG FEMUR TIKUS
WISTAR JANTAN YANG DIINDUKSI ALUMINIUM**

Oleh
Indah Pratiwi
NIM 162010101127

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Rena Normasari, M. Biomed.

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Roni Prasetyo, M.Kes.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efektivitas Pemberian Ekstrak Tamarindus Indica Terhadap Jumlah Sel Osteoblas Tulang Femur Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Aluminium” karya Indah Pratiwi telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Selasa, 24 Maret 2020

tempat : Jember

Tim Penguji

Ketua,

Anggota I,

dr. Cicih Komariah, Sp.M.

dr. Dion Krismashogi Dharmawan, M. Si

NIP 197409282005012001

NIP 198609162014041002

Anggota II

Anggota III,

dr. Rena Normasari, M.Biomed

dr. Roni Prasetyo, M. Kes

NIP 198305122008122002

NIP 196809272005011001

Mengesahkan

Dekan,

dr. Supangat, M. Kes, Ph. D, Sp. Ba

NIP 197304241999031002

RINGKASAN

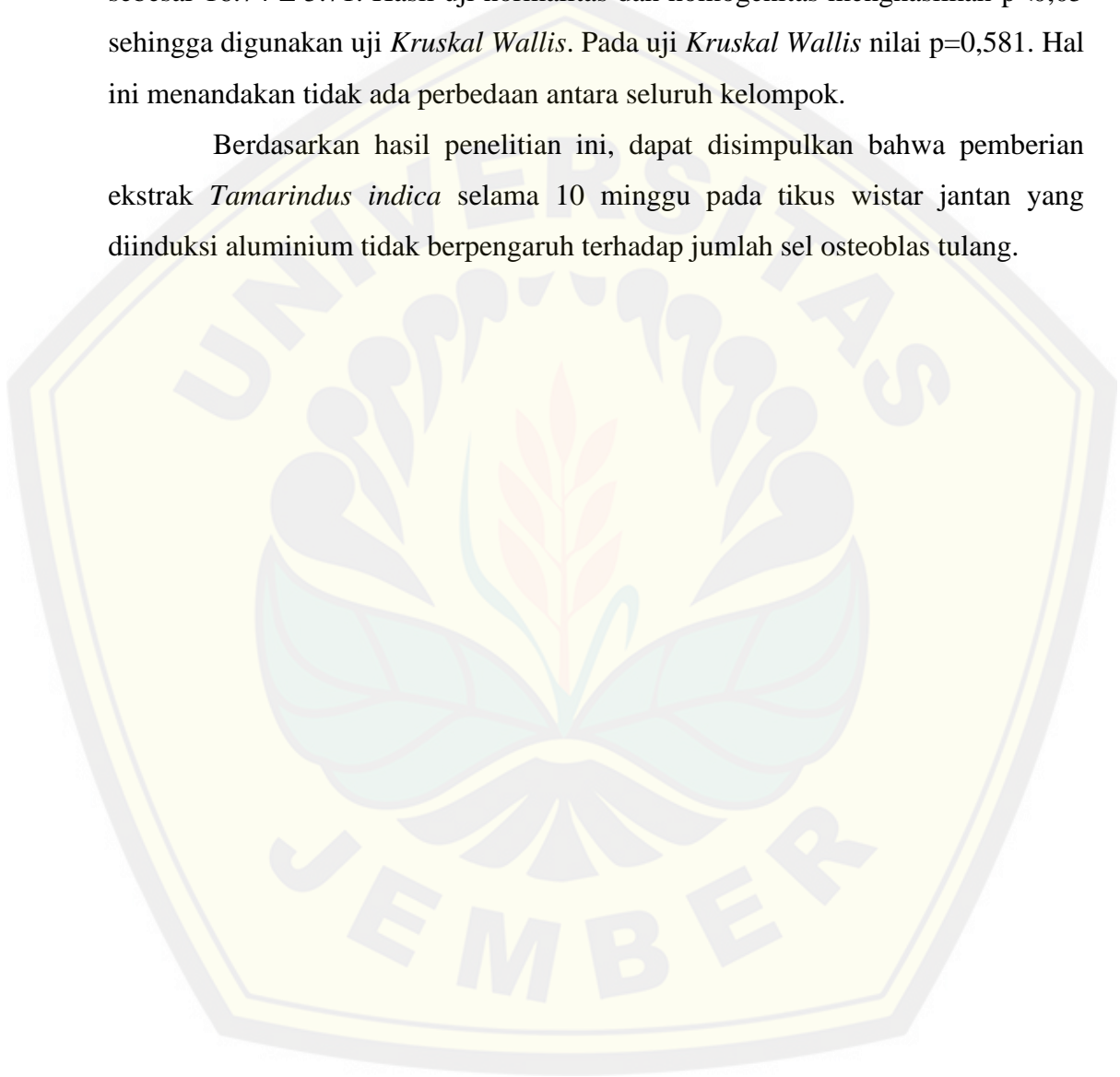
Efektivitas Pemberian Ekstrak *Tamarindus Indica* terhadap Jumlah Sel Osteoblas Tulang Femur Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Aluminium; Indah Pratiwi; 162010101127; 2020; 111 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Aluminium banyak dimanfaatkan dalam kehidupan tetapi aluminium termasuk logam non-esensial beracun bagi tubuh manusia. Aluminium paling banyak terakumulasi di tulang femur. Aluminium bersifat toksik karena meningkatkan jumlah radikal bebas sehingga terjadi stres oksidatif yang menyebabkan apoptosis osteoblas. Kerusakan osteoblas menyebabkan terjadinya gangguan mineralisasi tulang dan meningkatkan risiko fraktur spontan. Densitas mineral tulang akan lebih sedikit dibagian diafisis saat terjadi gangguan mineralisasi. *Tamarindus indica* atau Asam Jawa memiliki efek antioksidan. Efek antioksidan *Tamarindus indica* paling poten pada bagian bijinya. Biji *Tamarindus indica* memiliki kandungan polifenol tertinggi dari biji tanaman tropis lain seperti leci dan rambutan. Kandungan polifenol pada biji *Tamarindus indica* ialah *myrecitin*, *procyanidin B2*, dan *caffeic acid*. Antioksidan pada biji *Tamarindus indica* memiliki mekanisme menyumbangkan elektron dari gugus -OH pada cincin fenolik untuk menghentikan reaksi berantai oksidatif dan mencegah terbentuknya radikal hidroksil dan peroksidasi lipid yang berperan pada apoptosis sel.

Jenis penelitian ini ialah *true experimental* secara *in vivo* dengan *randomized post test only control group design*. Hewan coba menggunakan tikus Wistar jantan 25 ekor yang terbagi dalam lima kelompok menggunakan *simple random sampling*. Kelompok pada penelitian ini yaitu kelompok kontrol yang diberi aquabidest dan saline, kelompok perlakuan 1, 2, 3 yang diberikan larutan $AlCl_3$ dosis 300mg/kgBB dan larutan ekstrak *Tamarindus indica* dengan dosis masing-masing 25, 50, 100mg/kgBB. Perlakuan dilakukan selama 10 minggu. Data penelitian diambil melalui pengamatan gambaran histopatologi jumlah sel osteoblas tulang femur tikus pada lima lapang pandang.

Hasil penelitian ini menunjukkan rata-rata jumlah osteoblas paling banyak di kelompok P1 sebesar 18.48 ± 3.65 . Sedangkan osteoblas paling sedikit terdapat di kelompok kontrol dengan jumlah 15.21 ± 1.71 . Untuk kelompok P2 rata-rata jumlah osteoblasnya yaitu sebesar 17.8 ± 7.05 , P3 sebesar 17.13 ± 1.16 , dan P4 sebesar 16.74 ± 5.71 . Hasil uji normalitas dan homogenitas menghasilkan $p < 0,05$ sehingga digunakan uji *Kruskal Wallis*. Pada uji *Kruskal Wallis* nilai $p = 0,581$. Hal ini menandakan tidak ada perbedaan antara seluruh kelompok.

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak *Tamarindus indica* selama 10 minggu pada tikus wistar jantan yang diinduksi aluminium tidak berpengaruh terhadap jumlah sel osteoblas tulang.



PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efektivitas Pemberian Ekstrak *Tamarindus indica* terhadap Jumlah Sel Osteoblas Tulang Femur Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Aluminium”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata 1 (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. dr. Supangat, M. Kes, Ph. D, Sp. BA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Rena Normasari, M. Biomed selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Roni Prasetyo, M.Kes selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu dan pikiran dalam penulisan skripsi ini;
3. dr. Cicih Komariah, Sp.M. selaku Dosen Penguji Utama dan dr. Dion Krismashogi Dharmawan, M. Si. selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
4. dr. M. Ihwan Narwanto, M. Sc yang telah memberikan saya kesempatan untuk mengikuti proyek penelitian;
5. orang tua saya, Bapak Harimuddin, S.T., M.H dan Ibu Nur Hasanah, S.E yang selalu memberikan kasih sayang, dukungan, semangat, dan doa tiada henti dari dulu hingga sekarang;
6. seluruh guru-guru tercinta saya dari taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi;
7. analis laboratorium anatomi Ahmad Kodri Riyandoko, A.Md.Kep dan Laksono Hadi Prastyo, A.Md.Kep serta analis laboratorium biokimia Nurul Istinaroh, A. Md yang telah membantu jalannya penelitian ini;
8. sahabat saya Selma Naf'an Sabila, Prisma Diandari, Berlin Istiqomah, Rozi Reviana Pratiwi, Fathiah Ulil Albab, Siti Aminah Daeng Ndiko, Atina

Rabbiatul Azizah, Endang Pratwi, Hashin Hurriyah yang telah memberikan semangat dan dukungan;

9. sahabat sepenelitian saya Muhammad Iqbal Fauzi, Anang Dwi Atmoko, dan Nur A'mala Dewi yang telah banyak membantu;
10. keluarga besar angkatan 2016 Ligamen Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
11. almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
12. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga siap menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan dari skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi seluruh kalangan.

Jember, 24 Maret 2020

Penulis

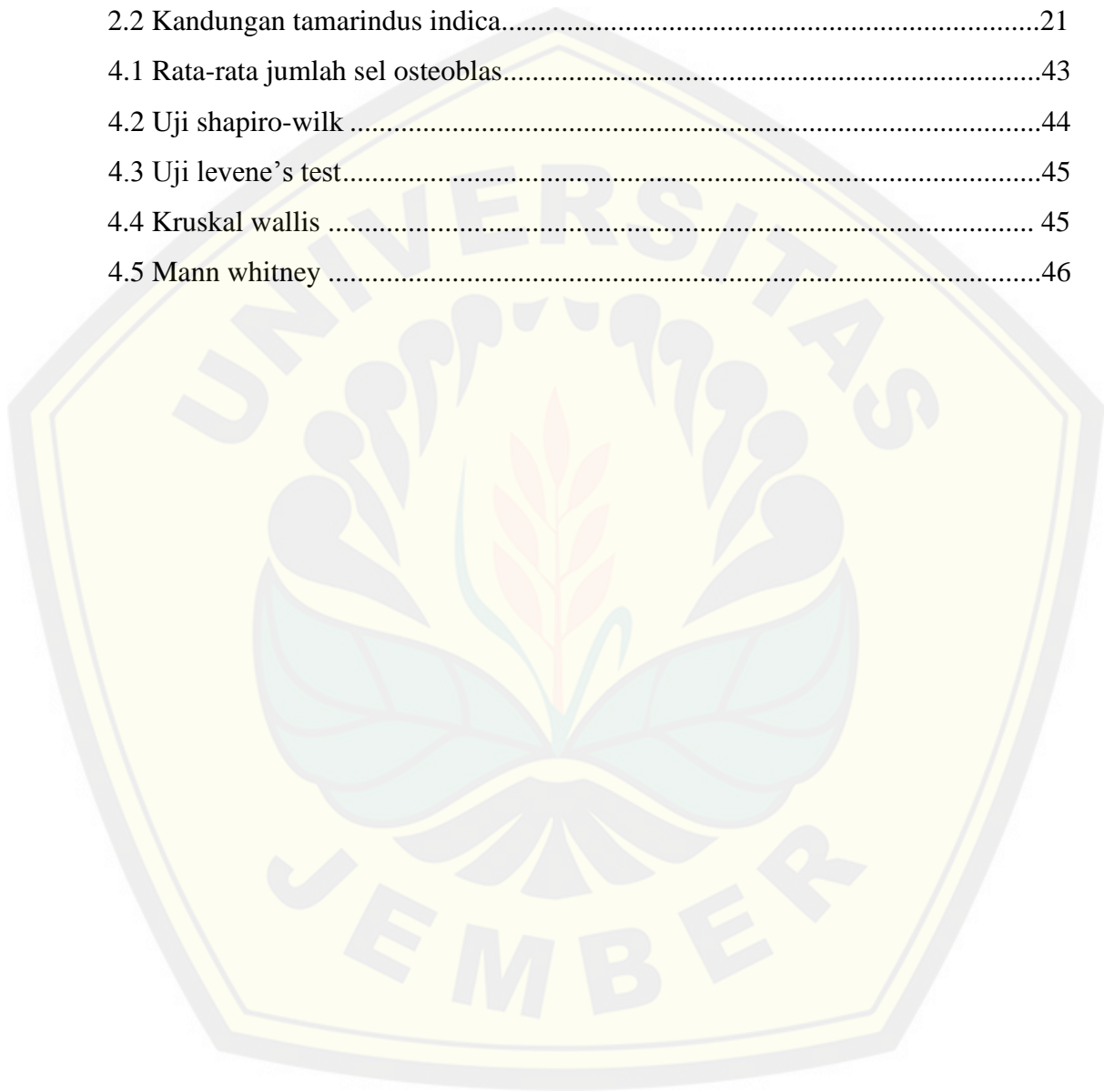
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
DAFTAR SINGKATAN	viii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tulang	4
2.2 Aluminium	13
2.3 Mekanisme Aluminium Merusak Tulang	14
2.3.1 Radikal Bebas	16
2.3.2 Stres Oksidatif.....	18
2.4 <i>Tamarindus Indica</i>	20
2.4.1 Taksonomi <i>Tamarindus Indica</i>	21
2.4.2 Kandungan <i>Tamarindus Indica</i>	21
2.4.3 Polifenol.....	22
2.4.4 Antioksidan.....	24
2.4.5 Mekanisme Biji <i>Tamarindus Indica</i> sebagai antioksidan	25
2.5 Kerangka Konseptual	27
2.6 Hipotesis Penelitian	29
BAB 3. METODE PENELITIAN	30
3.1 Jenis Penelitian	30
3.2 Rancangan Penelitian	30
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	31
3.4 Populasi dan Sampel Penelitian	31
3.4.1 Populasi.....	31
3.4.2 Sampel	31
3.4.3 Besar Sampel	32
3.4.4 Teknik Pengambilan Sampel	32

3.5 Variabel Penelitian	32
3.5.1 Variabel Bebas	32
3.5.2 Variabel Terikat	33
3.5.3 Variabel Terkendali	33
3.6 Definisi Operasional	33
3.7 Alat dan Bahan	34
3.7.1 Alat.....	34
3.7.2 Bahan	34
3.8 Prosedur Penelitian	34
3.8.1 Pemilihan Sampel	34
3.8.2 Persiapan Sampel	35
3.8.3 Pembuatan Larutan AlCl ₃ (Aluminium Klorida)	35
3.8.4 Pembuatan Larutan Ekstrak <i>Tamarindus Indica</i>	36
3.8.5 Pembuatan Larutan BNF 10% (<i>Buffer Neutral Formalin</i>)	36
3.8.6 Perlakuan	36
3.8.7 Pengambilan Tulang <i>Femur</i>	37
3.8.8 Dekalsifikasi Tulang <i>Femur</i>	38
3.8.9 Pembuatan Preparat Histopatologi (Pewarnaan HE)	38
3.8.10 Pengamatan Preparat Histopatologi.....	38
3.9 Uji Kelayakan Etik	38
3.10 Analisis Data	39
3.11 Alur Penelitian	40
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	41
4.1 Hasil Penelitian	41
4.2 Analisis Data	44
4.3 Pembahasan	46
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	51
5.1 Kesimpulan	51
5.2 Saran	51
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN	58

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Taksonomi tamarindus indica.....	21
2.2 Kandungan tamarindus indica.....	21
4.1 Rata-rata jumlah sel osteoblas.....	43
4.2 Uji shapiro-wilk	44
4.3 Uji levene's test.....	45
4.4 Kruskal wallis	45
4.5 Mann whitney	46



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Anatomi femur	6
2.2 Osteoblas perbesaran 400x ditunjukkan panah hitam.....	9
2.3 Tahapan pembentukan senyawa oksigen reaktif	17
2.4 Reaksi pembentukan peroksil	18
2.5 Reaksi haber weiss	18
2.6 Reaksi fenton.....	18
2.7 Reaksi inisiasi peroksidasi lipid.....	19
2.8 Reaksi propagasi peroksidasi lipid.....	19
2.9 Reaksi terminasi peroksidasi lipid	19
2.10 Tamarindus indica.....	20
2.11 Struktur kimia asam fenol dan flavonoid.....	23
2.12 Jenis-jenis flavonoid	24
2.13 Kerangka konseptual.....	27
3.1 Rancangan penelitian	30
3.2 Alur penelitian.....	40
4.1 Gambaran sel osteoblas.....	41
4.2 Gambaran sel osteoblas tiap kelompok.....	42
4.3 Diagram rata-rata jumlah sel osteoblas tiap kelompok.....	43

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Surat tugas proyek penelitian	58
Lampiran B. Keterangan persetujuan etik proyek penelitian.....	59
Lampiran C. Surat keterangan identifikasi tanaman	60
Lampiran D. Keterangan persetujuan etik penelitian	61
Lampiran E. Rekomendasi bebas plagiasi	64
Lampiran F. Tabel dosis pemberian larutan $AlCl_3$ dan ekstrak biji tamarindus indica.....	65
Lampiran G. Data pembacaan preparat.....	69
Lampiran H. Analisis statistik.....	72
Lampiran I. Gambar mikroskopis sel osteoblas.....	79
Lampiran J. Dokumentasi peneitian.....	92

DAFTAR SINGKATAN

OH	: Hidroksida
Al (H ₂ O) ₆ ³⁺	: aluminium hexahydrate
Al(OH) ₃	: Aluminium Hidroksida
GSH	: Glutathion
Al-Tf	: Aluminium transferin
C ₆ H ₁₂ O ₂	: Asam kaproat
O ₂	: Oksigen
H ₂ O	: Air
H ⁺	: Hidrogen
e ⁻	: Elektron
O ₂ ⁻	: Radikal superoksida
·OOH	: Radikal peroksil
H ₂ O ₂	: Radikal peroksida
·OH	: Radikal hidroksil
Fe ²⁺	: Ferro
Fe ³⁺	: Ferri
Cu ⁺	: Cuprous
Cu ²⁺	: Cupric
ROOH	: Lipid hidroperoksida
ROO [·]	: Lipid peroksil
R [·]	: Lipid radikal
SOD	: super oksida dismutase
GSH-PX	: Glutathion peroksidase
NADPH	: Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
GR	: Glutathion Reduktase
GSSG	: Glutathion disulfida
NaCl	: Sodium Klorida
BNF	: Buffer netral formalin
NaH ₂	: Natrium Hidrida
HE	: Hematoxylin-eosin
ALP	: Alkalin fosfatase
DW	: Dry Weight

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tulang manusia dewasa berjumlah 206 tulang. Tulang merupakan struktur penting yang memiliki fungsi antara lain: penopang tubuh, proteksi organ-organ penting, pergerakan, penyimpanan dan pelepasan beberapa mineral, dan untuk produksi sel darah merah (Dharmawan dkk., 2018). Tulang terdiri dari beberapa sel tulang, salah satunya ialah sel osteoblas. Sel osteoblas memiliki fungsi penting dalam pengaturan mineralisasi matriks tulang. Sel osteoblas dapat ditemukan di periosteum dan endosteum permukaan tulang. Sel osteoblas matur yang telah terkalsifikasi disebut osteosit. Osteosit merupakan sel utama pembentuk tulang dewasa. Osteoblas yang telah berubah menjadi osteosit akan terbenam di dalam *osteon* dan berfungsi dalam menjaga homeostasis matriks tulang. Selain itu, osteoblas juga berfungsi dalam pengaktifan sel osteoklas untuk mempertahankan keseimbangan sel tulang (Eroschenko, 2015). Karena sel osteoblas mengatur keseluruhan proses pemeliharaan tulang, kerusakannya dapat menyebabkan penipisan masa tulang dan ketidakseimbangan resorpsi tulang (Rosenberg dkk., 2012).

Aluminium merupakan unsur logam mineral terbanyak ketiga di kerak bumi dengan jumlah 8% (Exley, 2013) sehingga banyak dimanfaatkan dalam kehidupan sehari-hari. Tetapi di sisi lain aluminium termasuk unsur logam non-esensial beracun bagi manusia dan hewan. Menurut *American Association of Poison Control Centers* tahun 2017 paparan tunggal aluminium pada manusia berjumlah 690 kasus. Dari jumlah kasus tersebut, terdapat 44 kasus keracunan ringan dan 9 kasus keracunan sedang (Gummin dkk., 2018). Manusia dapat terpapar aluminium dari makanan, air, dan obat-obatan (Crisponi dkk., 2013). Aluminium sangat berbahaya bagi sel saraf, tulang, dan sel hemopoetik (Jaishankar dkk., 2014). Aluminium dapat terakumulasi di otak, tulang, hati, dan ginjal (Exley, 2013), sedangkan akumulasi terbanyak terdapat di tulang (Krewski dkk., 2007) khususnya tulang *femur* (Pavelić dkk., 2017). Aluminium bersifat toksik karena meningkatkan

jumlah radikal bebas sehingga terjadi stres oksidatif yang menyebabkan apoptosis osteoblas (Li dkk., 2012). Aluminium akan terakumulasi di bagian matriks mineralisasi, tempat osteoblas meletakkan kolagen tipe I (Klein, 2019). Aluminium mencegah proses mineralisasi dan menghambat pengendapan *osteoid* dengan langsung merusak osteoblas (Rroji dkk., 2018). Gangguan mineralisasi pada tulang yang disebabkan kerusakan osteoblas dapat menyebabkan risiko fraktur spontan (Nurchi dkk., 2012). Pada gangguan mineralisasi tulang, densitas mineral tulang akan lebih sedikit dibagian diafisis daripada di bagian epifisis (Weinstein dkk., 2017).

Tamarindus indica atau yang lebih dikenal sebagai Asam Jawa banyak ditemukan di negara tropis seperti Indonesia. *Tamarindus indica* memiliki efek antiinflamasi dan antioksidan (Kuru, 2014). Efek antioksidan *Tamarindus indica* paling poten ialah berada pada bagian bijinya (Razali dkk., 2012). Biji *Tamarindus indica* memiliki kandungan polifenol tertinggi dari biji tanaman tropis lain seperti leci dan rambutan (Chunglok dkk., 2014). Kandungan polifenol pada biji *Tamarindus indica* ialah *myrecitin*, *procyanidin B2*, dan *caffeic acid* (Narwanto dkk., 2018). Salah satu kandungan polifenol yang terdapat di bagian biji *Tamarindus indica* ialah *myrecitin*. *Myrecitin* merupakan polifenol jenis flavonoid yang aktivitas antioksidannya sangat poten nomor dua diantara dua puluh sembilan jenis flavonoid lainnya (Santoso dkk., 2016). Efek antioksidan pada polifenol memiliki mekanisme menyumbangkan elektron dari gugus -OH pada cincin fenolik yang dapat menghentikan reaksi berantai oksidatif yang berperan dalam apoptosis sel (Yang dkk., 2018).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, rumusan masalah dalam penelitian ini, yaitu: “Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak *Tamarindus indica* terhadap jumlah sel osteoblas pada tulang *femur* tikus wistar jantan yang diinduksi aluminium?”.

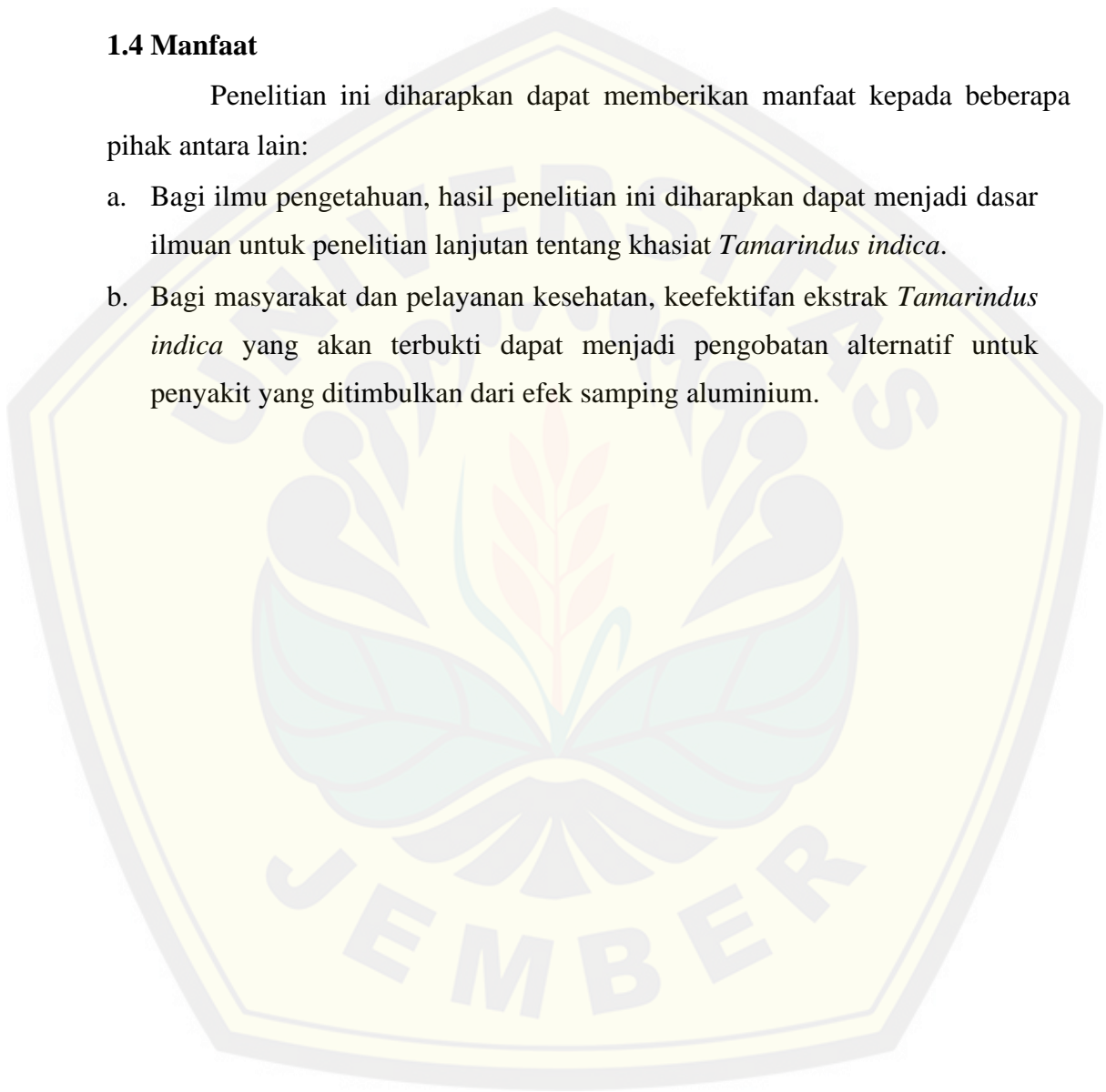
1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *Tamarindus indica* terhadap jumlah sel osteoblas pada tulang *femur* tikus wistar jantan yang diinduksi aluminium.

1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat kepada beberapa pihak antara lain:

- a. Bagi ilmu pengetahuan, hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar ilmiah untuk penelitian lanjutan tentang khasiat *Tamarindus indica*.
- b. Bagi masyarakat dan pelayanan kesehatan, keefektifan ekstrak *Tamarindus indica* yang akan terbukti dapat menjadi pengobatan alternatif untuk penyakit yang ditimbulkan dari efek samping aluminium.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tulang

2.1.1 Anatomi Tulang

Tulang merupakan jaringan hidup penyusun rangka manusia berstruktur keras dengan jumlah 206 tulang. Struktur keras pada di tulang disebabkan karena terdapat matriks ekstraseluler yang mengalami kalsifikasi. Klasifikasi tulang berdasarkan bentuk, yaitu (Snell, 2012; Dharmawan dkk., 2018):

a. Tulang Panjang

Tulang ini memiliki perbandingan panjang yang lebih besar dari lebarnya. Tulang panjang contohnya ialah *femur* dan *humerus*. Tulang panjang memiliki dua bagian utama, yaitu epifisis di bagian ujung dan diafisis di bagian tengah. Antara epifisis dan diafisis terdapat metafisis yang memisahkan dua bagian tersebut (Snell, 2012; Dharmawan dkk., 2018).

1) Epifisis

Tersusun oleh banyak tulang spongiosa yang dikelilingi oleh selapis tipis struktur tulang *cortical*. Epifisis merupakan tempat pertumbuhan sekunder tulang.

2) Diafisis

Di bagian tengah diafisis terdapat sumsum tulang dan di bagian luarnya terdapat tulang *cortical* yang dilapisi selubung jaringan ikat yang disebut periosteum. Bagian diafis merupakan bagian yang cukup keras karena terdiri dari banyak tulang *cortical*.

b. Tulang Pendek

Tulang pendek berbentuk pendek. Biasa ditemukan di kaki tangan. Tulang pendek tersusun oleh tulang *spongiosa* dan dikelilingi tipis tulang *cortical*. Contoh tulang pendek *os. Talus* (Snell, 2012; Dharmawan dkk., 2018).

c. Tulang Pipih

Tulang pipih berbentuk pipih dengan ketebalan yang tipis. Tulang pipih dibagian luarnya terdapat tulang *cortical* yang disebut *tabula*, sedangkan

tulang *spongiosa* di bagian dalamnya disebut *diploe*. Contoh tulang pipih ialah *os. Scapula* (Snell, 2012; Dharmawan dkk., 2018).

d. Tulang Ireguler

Tulang ireguler memiliki bentuk yang khas dan tidak beraturan. Strukturnya hampir sama dengan jenis tulang lain. Contoh tulang ireguler yaitu tulang tengkorak (Snell, 2012; Dharmawan dkk., 2018).

e. Tulang Sesamoid

Tulang ini merupakan tulang kecil yang berada di tendo otot tertentu yang berfungsi untuk mengurangi pergeseran tendo pada permukaan tulang lain. Tulang ini dibagian luarnya ditutupi oleh kartilago. Contoh tulang ini ialah *os. Patella* (Snell, 2012; Dharmawan dkk., 2018).

2.1.2 Anatomi Femur

Femur merupakan jenis tulang penting ekstremitas bawah yang terpanjang dan terkuat yang terletak di regio *femoris*. *Femur* di bagian proksimal berartikulasi dengan *os. Coxae* di *acetabulum* dan di bagian distal berartikulasi di tibia. *Femur* terdiri dari beberapa bagian, yaitu (Snell, 2012; Dharmawan dkk., 2018):

a. *Extremitas Proximal Osis Femoris*

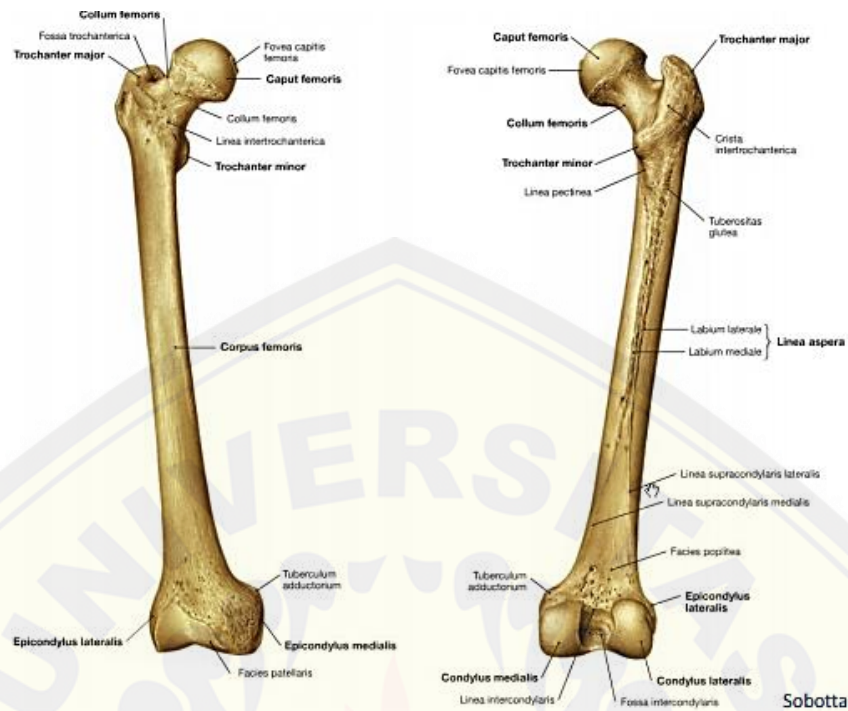
Bagian ini terdapat *caput ossis femoris* yang bulat dan dilapisi oleh tulang rawan. *Caput* berartikulasi dengan *acetabulum*. Arah *caput* serong mediosuperior sedikit ke arah anterior. Pada *caput* terdapat dua tonjolan besar, yaitu *trochanter major* dan *trochanter minor*.

b. *Corpus Osis Femoris*

Corpus berbentuk memanjang dan cembung ke arah anterior dengan bentuk segitiga. *Corpus* memiliki tiga *facies*, yaitu *facies anterior*, *facies medialis*, dan *facies lateralis*.

c. *Extremitas Distalis Osis Femoris*

Bentuknya cenderung melebar membentuk dua *condyli*, yaitu *condylus medialis* dan *condylus lateralis*. Kedua *condylus* dilapisi tulang rawan dan membentuk *facies patellaris*. Anatomi femur dapat dilihat di Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Anatomi femur (sumber: Paulsen dan Waschke, 2010)

2.1.3 Fungsi Tulang

Fungsi tulang manusia ada beberapa macam, yaitu (Dharmawan dkk., 2018):

a. Penopang Tubuh

Tulang berperan sebagai penopang jaringan lunak dan juga membentuk tubuh. Tulang juga berperan sebagai tempat perlekatan tendon otot.

b. Proteksi Organ

Tulang berfungsi melindungi organ-organ penting, seperti otak, jantung, dan paru-paru.

c. Gerakan Tubuh

Tulang merupakan tempat perlekatan otot agar tubuh manusia dapat melakukan gerakan karena kontraksi otot.

d. Homeostasis Beberapa Mineral

Tulang berfungsi untuk menyimpan dan memetabolis beberapa mineral seperti kalsium dan fosfat. Tulang menyimpan 99% seluruh kalsium yang ada di dalam tubuh. Apabila kalsium diperlukan, maka tulang akan kalsium untuk menjaga homeostasis kalsium di dalam tubuh.

e. Produksi Sel Darah

Tulang mengandung sumsum merah yang berfungsi untuk memproduksi sel darah.

f. Penyimpanan Trigliserida

Tulang juga mengandung sumsum yang kuning yang tersusun dari jaringan adiposa untuk penyimpanan trigliserida.

2.1.4 Histologi Tulang

Tulang terdiri dari sel, serat jaringan ikat, dan bahan ekstrasel. Saat tulang mengalami pertumbuhan, terjadilah proses pengendapan mineral di matriksnya lalu mengalami kalsifikasi. Karena proses tersebut, tulang menjadi keras dan dapat menahan beban. Tulang berfungsi sebagai tempat perlekatan otot dan organ. Tulang memiliki 2 jenis secara histologis, yaitu tulang *imatur* dan tulang *matur* (Rasjad, 2015).

a. Tulang *Imatur* (*Woven Bone, Fiber Bone, Non-lamellar Bone*)

Merupakan tulang yang pertama terbentuk dari osifikasi *endokondral* pada perkembangan embrional dan kemudian perlahan akan menjadi tulang *matur*. Pada umur 1 tahun tulang *imatur* sudah tidak terlihat. Tulang *imatur* mengandung jaringan kolagen dengan substansi semen dan mineral yang lebih sedikit daripada tulang *matur* (Rasjad, 2015).

b. Tulang *Matur*

1) Tulang *Cortical*

Memiliki serat kolagen yang tersusun dalam lapisan tipis tulang yang disebut lamela yang sejajar satu sama lain di perifer tulang atau tersusun secara konsentris di sekitar pembuluh darah. Pada jenis tulang panjang, lamela sirkumferensial luar terletak di sebelah dalam dari jaringan ikat periosteum. Lamela sirkumferensial dalam terletak di sekeliling rongga sumsum tulang. Lamela konsentris mengelilingi kanal yang mengandung arteri, vena, saraf, dan jaringan ikat longgar. Setiap kompleks lamela konsentris disebut *osteon* (Sistem *Havers*). Ruang di *osteon* mengandung pembuluh darah dan saraf disebut kanalis sentrali yang dikenal sebagai

Havers (Eroschenko, 2015). Tulang *cortical* memiliki permukaan luar periosteum dan permukaan dalam endosteum. Aktivitas permukaan periosteum memiliki peran penting untuk pertumbuhan dan perbaikan fraktur (Clarke, 2008).

2) Tulang *Spongiosa*

Terletak diantara tulang kompak dan sumsum tulang. Tulang spongiosa mengandung bagian-bagian yang saling berhubungan dan tidak padat. Di tulang *spongiosa* ada banyak trabekula yang terdapat jaringan *hemopoetik*. Trabekula dilapisi oleh endosteum (Eroschenko, 2015).

Tulang memiliki sel-sel penting untuk menjaga kelangsungan tulang. Sel-sel tulang antara lain :

a. Sel *Osteoprogenitor*

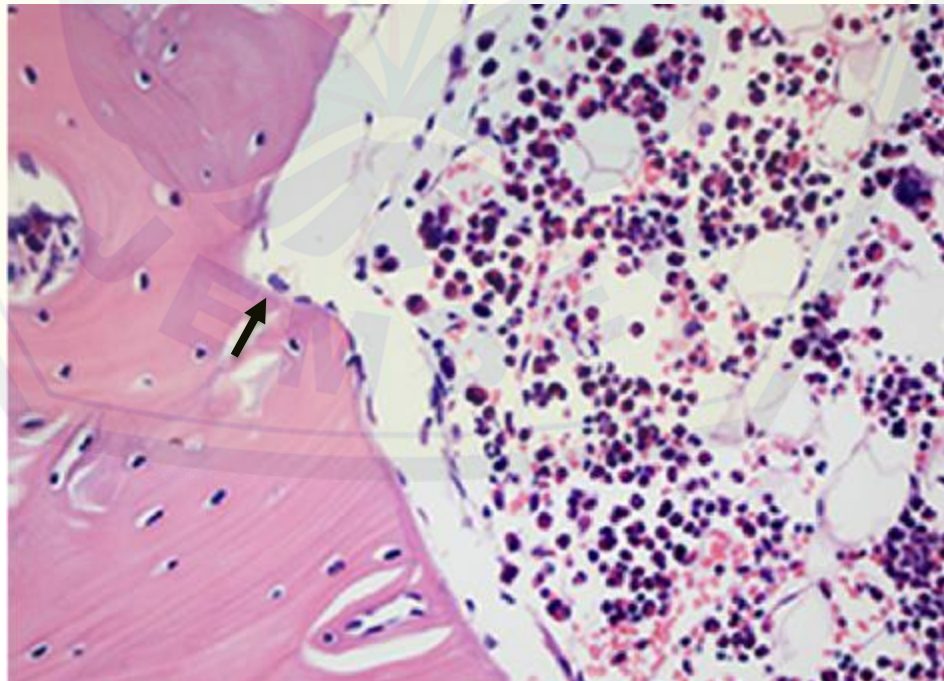
Merupakan sel punca *pluripoten* yang belum berdiferensiasi dan berasal dari sel mesenkim jaringan ikat. Sel ini terletak di lapisan dalam jaringan ikat, periosteum, dan di satu lapisan endosteum internal yang melapisi rongga sumsum, sistem *havers*, serta kanalis *perforans* di tulang. Fungsi utama periosteum dan endosteum adalah untuk memberikan nutrisi bagi tulang serta sebagai pemasok berkala osteoblas baru untuk pertumbuhan, *remodeling*, dan perbaikan tulang. Saat pembentukan tulang, sel *osteoprogenitor* berproliferasi dengan mitosis dan berdiferensiasi menjadi osteoblas (Eroschenko, 2015).

b. Sel Osteoblas

Osteoblas merupakan sel penting yang bertanggung jawab dalam proses formasi tulang melalui sintesis matriks tulang yang disebut *osteoid*. Selain itu, osteoblas dapat berperan dalam proses resorpsi tulang dengan mekanisme membersihkan *osteoid* dengan protein netral yang dihasilkannya. Pada permukaan osteoblas, banyak terdapat reseptor untuk proses metabolisme pada tulang. Sehingga osteoblas sangatlah penting pada tulang untuk menjaga proses *turn over*. Osteoblas berasal dari sel progenitor yang terdapat di sumsum tulang, periosteum, dan endotel pembuluh darah. Setelah osteoblas mensintesis *osteoid*, maka osteoblas akan berubah menjadi osteosit dan akan terbenam di *osteon*. Osteoblas dapat ditemukan berkelompok pada permukaan tulang dan

jumlahnya dapat mencapai 100-400 sel kuboidal per *bone forming-site*. Osteoblas memiliki inti bulat dengan sitoplasmanya yang basofil dan banyak badan golgi di intinya. Selain itu, osteoblas memiliki retikulum endoplasma kasar yang berisi granul-granul padat. Osteoblas selalu melapisi matriks tulang sebelum proses kalsifikasi. (Setiati dkk., 2014).

Osteoblas dapat ditemukan di permukaan periosteum, endosteum, dan trabekula disetiap bagian tulang. Osteoblas membentuk, mengeluarkan, dan mengendapkan *osteoid*. *Osteoid* merupakan komponen organik matriks tulang baru, mencakup serat kolagen tipe 1, beberapa glikoprotein, dan proteoglikan. *Osteoid* belum terkalsifikasi dan tidak mengandung mineral apapun. Akan tetapi setelah pengendapan, *osteoid* dengan cepat termineralisasi dan berubah menjadi tulang. Osteoblas mengatur proses mineralisasi *osteoid* dengan mengeluarkan vesikel matriks. Vesikel matriks berfungsi sebagai pusat pembentukan kristal hidroksiapatit dan langkah pertama terjadinya kalsifikasi. Kalsifikasi lebih lanjut mengelilingi dan membenamkan serat kolagen dan berbagai glikoprotein (Eroschenko, 2015). Osteoblas dapat dilihat di Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Osteoblas perbesaran 400x ditunjukkan panah hitam (Sumber: Xu dkk., 2018)

c. Sel Osteosit

Merupakan bentuk *matur* osteoblas, dikelilingi oleh matriks tulang yang telah termineralisasi. Sel ini merupakan sel utama tulang dewasa dan ukurannya lebih kecil daripada osteoblas. Osteosit berada di dalam matriks dan juga terdapat di lakuna yang menyerupai gua dan letaknya berdekatan dengan pembuluh darah (Eroschenko, 2015).

d. Sel Osteoklas

Merupakan sel berinti banyak yang ditemukan di sepanjang permukaan tulang tempat resorpsi, *remodeling*, dan perbaikan tulang secara langsung. Osteoklas berasal dari turunan sel *progenitor hemopoietik*. Fungsi utama osteoklas untuk meresorpsi tulang sewaktu *remodeling*. Osteoklas sering berada di lakuna *Howship* (Eroschenko, 2015).

2.1.5 Pembentukan Tulang

Pembentukan tulang atau osifikasi dimulai dari masa embrio dengan dua mekanisme berbeda, yaitu osifikasi *endokondral* dan *intramembranosa*.

a. Osifikasi *Endokondral*

Sebagian tulang terbentuk dari osifikasi ini, osifikasi terbentuk dari kartilago hialin. Osifikasi ini memungkinkan tulang tumbuh memanjang dan melebar. Kartilago hialin dibentuk oleh sel mesenkim yang berproliferasi menjadi kondroblas yang awalnya dikelilingi oleh jaringan ikat perikondrium. Seiring perkembangannya, kondroblas menjadi matang dan kartilago hialin akan terkalsifikasi. Sel mesenkim akan berubah menjadi sel *osteoprogenitor*. Selain itu, perikondrium akan berubah menjadi periosteum di titik tengah tulang. Sel *osteoprogenitor* akan terus berubah menjadi osteoblas akan melekat ke sisa kartilago yang terkalsifikasi dan mulai mensintesis matriks tulang. Osteoblas yang terjebak di tulang kompak di rongga lakuna kini disebut osteosit. Osteosit dapat membentuk koneksi antar sel kompleks melalui kanal halus yang disebut *kanalikulus*. *Kanalikulus* dapat membuka saluran yang mengandung pembuluh darah. Jaringan mesenkim, osteoblas, dan pembuluh darah membentuk pusat osifikasi primer yang pertama kali muncul dibagian

diafisis lalu diikuti pusat osifikasi sekunder yang berada di epifisis. Seluruh bagian epifisis dan diafisis akan digantikan oleh tulang, kecuali bagian lempeng epifisis (Eroschenko, 2015).

b. Osifikasi *Intramembranosa*

Pembentukan tulang dengan proses ini tidak didahului oleh kartilago hialin, akan tetapi terbentuk dari jaringan ikat mesenkim yang membentuk pusat osifikasi. Sebagian jenis tulang pipih terbentuk dari proses ini. Sel mesenkim langsung berdiferensiasi menjadi osteoblas yang menghasilkan osteosit. Lalu terbentuk pusat osifikasi yang saling beranastomosis dan menghasilkan anyaman tulang spongiosa yang disebut trabekula. Di antara trabekula terdapat jaringan *hemopoetik* (Eroschenko, 2015).

2.1.6 *Remodeling* Tulang

Dalam kehidupan sehari-hari, tulang dapat mengalami kerusakan secara mikro maupun makro. Untuk memperbaiki keadaan tersebut maka akan terjadi *remodeling* tulang. *Remodeling* tulang terjadi saat osteoklas dan osteoblas saling bekerja sama menjaga homeostasis tulang, proses tersebut diatur oleh unit *remodeling* tulang yang berada di tulang kortikal maupun trabekular.

Secara molekular *remodeling* tulang memiliki persamaan dengan proses inflamasi. Pada inflamasi, trauma atau benda asing akan merangsang makrofag menghasilkan sitokin yang berfungsi menghasilkan sel darah putih untuk bermigrasi ke tempat terjadinya inflamasi. Sama halnya dengan *remodeling* tulang, trauma atau benda asing pada tulang akan merangsang sel osteoblas untuk mengeluarkan beberapa sitokin untuk aktivasi sel osteoklas. Selanjutnya proses penting pada *remodeling* tulang yaitu pengerahan sel osteoblas ke tempat kerusakan. FGF 1 dan 2 merupakan polipeptida bersifat angiogenik yang akan merangsang replikasi sel tulang contohnya osteoblas sehingga populasi sel tersebut dapat meningkat saat terjadi *remodeling* tulang (Setiati dkk., 2014). *Remodeling* tulang memiliki 4 tahapan, yaitu (Gallagher dan Sai, 2010) :

a. Aktivasi

Fase aktivasi *prekursor* dari sel osteoklas *matur* menjadi osteoklas *multinuklear* yang berada di sumsum tulang oleh sitokin dan hormon. Pengaktifan sel osteoklas membutuhkan dua sitokin penting, yaitu M-CSF (*Macrophage colony stimulating factor*) dan RANKL (*Receptor activator of NF-Kappa B ligand*) yang dihasilkan oleh sel *stroma* sumsum tulang dan osteoblas saat terjadi kerusakan. M-CSF berfungsi untuk proliferasi, pertahanan, dan diferensiasi *prekursor* osteoklas. Sedangkan RANKL berfungsi sebagai diferensiasi *prekursor* osteoklas yang utama. Untuk mengatur agar osteoklas tidak diproduksi secara berlebihan maka terdapat inhibitor OPG (*osteoprotegerin*) yang berfungsi untuk mengikat RANKL. Fase ini membutuhkan waktu 10 hari.

b. Resorpsi

Setelah sel osteoklas mengalami aktivasi maka ia akan bergerak menuju ke tempat resorpsi. Fase resorpsi membutuhkan waktu sekitar 21 hari.

c. *Reversal*

Setelah resorpsi oleh osteoklas maka akan mulai terjadi pembentukan osteoblas baru. Fase ini berlangsung kurang lebih 5 hari. Pada tempat resorpsi tadi, sel *mononuklear* akan melapisi tempat tersebut dan akan membentuk garis glikoprotein yang akan membantu pelekatan osteoblas saat fase formasi dan mineralisasi. Pada tulang dewasa apabila terjadi kerusakan maka sel osteoblas akan lebih aktif untuk meregenerasi tulang. *Prekursor* sel osteoblas berasal dari sel MSCs (*Mesenchymal stem cells*). MSCs akan dibantu oleh SOX9 dan RUNX 2 untuk membentuk preosteoblas. Selanjutnya preosteoblas akan mengalami 3 tahap, yaitu (Rutkovskiy dkk., 2016):

1) Tahap 1

Sel tersebut akan berproliferasi dan mengeluarkan *fibronektin*, kolagen, TGF beta reseptor 1, dan *osteopontin*.

2) Tahap 2

Sel akan mulai berdiferensiasi, mengalami *maturasi*, dan mulai membentuk matriks ekstrasel dengan kolagen yang telah dibentuk.

3) Tahap 3

Melanjutkan mineralisasi matriks dengan bantuan *osteokalsin* untuk mengendapkan mineral dan pada tahap ini osteoblas *matur* akan berbentuk kuboid.

d. Formasi tulang baru dan mineralisasi

Pada fase terakhir, beberapa sel osteoblas akan berubah menjadi osteosit dan terbenam di tulang. Sintesis matriks tulang untuk formasi baru oleh osteoblas terdiri dari dua tahap, yaitu pengendapan matriks organik dan mineralisasi. Pada tahap pengendapan matriks organik, osteoblas akan mensekresi protein kolagen, terutama kolagen tipe I yang membentuk matriks organik. Setelah itu, menuju tahap kedua, yaitu mineralisasi matriks tulang (Silva dkk., 2015). Matriks tulang tersusun atas 50-70% mineral, 20-40% matriks organik, 5-10% air, dan 3% lemak. Kandungan mineral terbanyak di dalam tulang adalah hidroksiapatit [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], dengan perbandingan jumlah jumlah karbonat, magnesium, dan asam fosfat lebih sedikit. Sedangkan untuk matriks organik paling banyak 90% adalah kolagen. Mineral pada tulang berfungsi untuk kepadatan dan kekuatan untuk tulang, sedangkan matriks organik berfungsi untuk elastisitas dan fleksibilitas tulang (Clarke, 2008). Fase ini membutuhkan waktu sekitar 3-12 bulan.

2.2 Aluminium

Aluminium merupakan unsur logam mineral terbanyak ketiga yang ada di kerak bumi dengan jumlah 8% (Exley, 2013). Aluminium adalah unsur yang sangat reaktif dan tidak pernah ditemukan sebagai logam bebas di alam. Aluminium mudah berikatan dengan senyawa lainnya. Aluminium dapat ditemukan di tanah, air, udara. Di dalam kehidupan sehari-hari aluminium dapat dimanfaatkan sebagai penjernih air, kosmetik, antiperspiran, antasida, bahan tambahan makanan, dan antasida (Keith dkk., 2008). Aluminium termasuk jenis unsur logam non-esensial beracun untuk manusia dan hewan. Manusia dapat terpapar aluminium dari makanan, air, dan obat-obatan (Crisponi dkk., 2013). Aluminium sangat berbahaya bagi sel saraf, tulang, dan sel hemopoetik (Jaishankar dkk., 2014).

2.3 Mekanisme Aluminium Merusak Tulang

Aluminium di alam bebas membentuk senyawa kompleks seperti aluminium oksida, aluminium klorida, aluminium hidroksida, aluminium laktat, aluminium fosfat, dan aluminium nitrat. Aluminium kompleks menyebabkan paparan pada manusia paling banyak melalui rute oral. Bentuk aluminium kompleks yang paling mudah bereaksi dengan air dan membentuk suatu larutan yaitu aluminium klorida. Aluminium klorida paling banyak terdeposit di dalam tulang lalu diikuti ginjal, hepar, dan otak khususnya paling banyak terakumulasi di tulang *femur* (Pavelić dkk., 2017). Aluminium dalam dosis tinggi dapat menyebabkan kerusak tulang (Krewski dkk., 2007). Batas normal aluminium di dalam tulang adalah di bawah $10\mu\text{g/g}$. Sedangkan konsentrasi aluminium di dalam tulang pada pasien gagal ginjal dapat mencapai lebih dari $100\mu\text{g/g}$ (Klein, 2019). Aluminium klorida sangat toksik karena dapat menyebabkan peroksidasi lipid melalui mekanisme stres oksidatif dan menyebabkan *immunoreaktivitas* $\text{A}\beta$ di *hippocampus* yang menginduksi terjadinya penyakit alzheimer (Keith, 2008).

Penyerapan gastrointestinal dari aluminium rendah, umumnya dalam kisaran 0,01-0,6%. Kondisi asam dan proses pengadukan di lambung menyebabkan sebagian besar aluminium kompleks yang dikonsumsi akan dipecah ke bentuk *monomolekul* Al^{3+} , terlepas dari seluruh senyawa dan bentuk aluminium kompleks yang tertelan (Keith dkk., 2008). Selanjutnya Al^{3+} akan diasorpsi di duodenum dan akan dibawa ke hepar untuk dimetabolisme lalu akan diedarkan ke seluruh tubuh melalui pembuluh darah (Murray dkk., 2012). Aluminium yang beredar ke pembuluh darah akan segera diikat oleh transferin. 91% aluminium akan berikatan dengan transferin dan membentuk ikatan kompleks aluminium transferin (Al-Tf). Ikatan Al-Tf akan ditangkap oleh reseptor transferin yang ada di osteoblas permukaan tulang (Crisponi dkk., 2013).

Aluminium akan terdeposit di periosteum, endosteum, trabekular, dan permukaan kanal pembuluh darah yang ada dibagian tulang kompak (Crisponi dkk., 2013). Al-Tf akan ditelan oleh *clathrin-coated pit* dengan *endositosis*. Gelembung *endositosis* tersebut akan mengalami fusi dengan lisosom dan membentuk sebuah *endosom*. Adanya pompa proton akan menyebabkan *endosom* memiliki pH 5,

sehingga menyebabkan aluminium terlepas dari transferin lalu berpindah ke *sitosol* (Murray dkk., 2012). Setelah masuk ke dalam sel osteoblas, aluminium akan melakukan beberapa mekanisme yang menyebabkan apoptosis osteoblas, antara lain:

- a. Aluminium dapat menghambat enzim glukosa-6-fosfat dehidrogenase (Newairy dkk., 2009). Enzim tersebut dapat menghasilkan NADPH. Salah satu fungsi dari NADPH yaitu menghasilkan enzim glutation reduktase (GR) yang berfungsi sebagai katalis untuk mereduksi GSSG menjadi GSH. Apabila GSSG tidak bisa tereduksi menjadi GSH, maka jumlah GSH akan berkurang. GSH digunakan untuk berikatan dengan H_2O_2 dan mengubahnya menjadi H_2O dengan dikatalase enzim GSH-PX. Jika GSH menurun maka H_2O_2 tidak dapat dipecah (Murray dkk., 2012).
- b. Aluminium dapat menghambat regulasi enzim SOD, katalase, dan GSH-PX. Enzim-enzim tersebut berguna sebagai katalis reaksi pemecahan ROS menjadi radikal yang tidak reaktif. Penurunan enzim SOD dapat meningkatkan radikal superoksida karena radikal tersebut tidak dapat dipecah. Penurunan katalase dan GSH-PX dapat meningkatkan radikal H_2O_2 (Murray dkk., 2012).
- c. Aluminium dapat menghambat enzim sitokrom oksidase. Enzim tersebut merupakan enzim terminal yang ada di mitokondria yang berfungsi sebagai katalis pada proses transport elektron (Crisponi dkk., 2013). Apabila ada gangguan pada proses transport elektron, maka mitokondria dapat menghasilkan radikal bebas lebih banyak lagi (Winarsi, 2007).
- d. Apabila radikal H_2O_2 dan superoksida berikatan, maka dapat menghasilkan radikal hidroksil melalui reaksi *haber weiss*. Selain itu, H_2O_2 dan superoksida dapat bekerja sama dalam reaksi *fenton* untuk menghasilkan radikal hidroksil. Fe^{3+} dapat berikatan dengan superoksida dan membentuk Fe^{2+} , lalu Fe^{2+} dapat berikatan dengan H_2O_2 dan membentuk radikal hidroksil (Winarsi, 2007).
- e. Aluminium sebagai prooksidan dapat berikatan dengan superoksida dan membentuk AlO_2^{-2+} . Ikatan tersebut dapat mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} . Fe^{2+} dapat langsung menghasilkan radikal hidroksil melalui reaksi *fenton* (Ruipérez dkk., 2012).

Semua mekanisme di atas dapat menyebabkan peningkatan radikal hidroksil yang sangat reaktif. Radikal hidroksil dapat bereaksi dengan protein, DNA, dan lipid (Murray, 2012). Reaksi-reaksi tersebut menyebabkan peroksidasi lipid, kerusakan DNA, dan kerusakan protein. Peroksidasi lipid menyebabkan hilangnya fluiditas dan integritas membran sel. Hilangnya integritas membran di mitokondria dapat menurunkan efisiensi transport elektron dan menyebabkan pembentukan radikal bebas lebih banyak lagi (Murray dkk., 2012). Peningkatan radikal bebas dapat menyebabkan stres oksidatif yang memicu apoptosis sel osteoblas di tulang (Li dkk., 2012).

Apoptosis sel merupakan jalur kematian pada sel dengan cara mengaktifkan enzim yang merusak DNA inti sel dan protein yang ada di inti dan sitoplasma. Fragmen sel yang mengalami apoptosis akan terlepas. Membran pada sel yang mengalami apoptosis tetap utuh dan hanya mengalami perubahan bentuk sehingga sel dan fragmen yang lepas akan menjadi target fagosit. Sel yang mati dan fragmennya akan segera dibersihkan sebelum isi sel bocor keluar, sehingga di sekitar sel tidak terjadi reaksi radang. Proses fagositosis pada sel yang mati sangat efisien sehingga sel seolah-olah menghilang tanpa bekas (Kumar dkk., 2013).

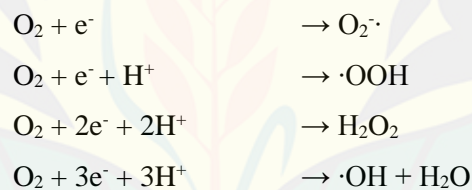
Apoptosis masif pada osteoblas dapat menyebabkan ketidakseimbangan jumlah osteoblas dan osteoklas sehingga akan mengganggu proses *remodeling* tulang (Rroji dkk., 2018). Karena sel osteoblas mengatur keseluruhan proses pemeliharaan tulang, kerusakannya pada osteoblas dapat menyebabkan penipisan masa tulang dan ketidakseimbangan resorpsi tulang (Rosenberg dkk., 2012). Hal tersebut dapat memicu risiko terjadinya fraktur spontan (Nurchi dkk., 2012). Pada gangguan mineralisasi tulang, densitas mineral tulang akan lebih sedikit dibagian diafisis daripada bagian epifisis (Weinstein dkk., 2017).

2.3.1 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan senyawa oksigen reaktif yang memiliki muatan elektron bebas yang tidak berpasangan. Radikal bebas akan menarik sesuatu yang ada didekatnya dengan tujuan mengambil elektronnya agar dapat melengkapi muatan elektron radikal bebas yang tidak berpasangan. Target utama radikal bebas

ialah merusak lipoprotein, karbohidrat, dan asam lemak tidak jenuh. Berdasarkan sumbernya radikal bebas dibagi menjadi 2 yaitu endogen dan eksogen. Senyawa radikal bebas dapat terbentuk setiap saat, salah satunya adalah saat melakukan respirasi (Winarsi, 2007).

Setiap makhluk hidup pasti melakukan respirasi untuk menghasilkan energi berupa ATP. ATP tersebut digunakan untuk metabolisme dan kelangsungan sel hidup. Proses respirasi aerob berlangsung di mitokondria. Proses aerob memiliki 3 tahap, yaitu: glikolisis, siklus krebs, dan fosforilasi oksidatif. Pada fase fosforilasi oksidatif terdapat proses transfer elektron yang berfungsi memecah oksigen menjadi air. Saat proses tersebut berlangsung, oksigen membutuhkan 4 elektron untuk bisa tereduksi menjadi air dengan proses $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow H_2O$. Apabila proses transfer elektron tidak sempurna maka akan terbentuk senyawa oksigen reaktif (Winarsi, 2007). Tahapan pembentukan senyawa oksigen reaktif dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Tahapan pembentukan senyawa oksigen reaktif (Sumber: Winarsi, 2007)

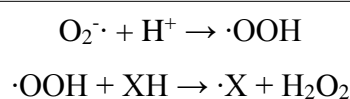
Macam-Macam ROS (oksigen reaktif) (Winarsi, 2007):

- a. Radikal ion superoksida ($O_2^{\cdot-}$)

Radikal superoksida bisa disebut juga anion superoksida. Senyawa ini dihasilkan di mitokondria, *sitosol*, dan peroksisom.

- b. Radikal Peroksil ($\cdot OOH$)

Superoksida tidak terlalu reaktif akan tetap jika superoksida ditambah H^+ akan berbahaya membentuk peroksil yang dapat menghasilkan radikal lainnya. Reaksi pembentukan peroksil dapat dilihat di Gambar 2.4.



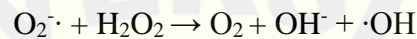
Gambar 2.4 Reaksi pembentukan peroksil (Sumber: Winarsi, 2007)

c. Hidrogen Peroksida (H_2O_2)

Dapat terbentuk dari reaksi berantai superoksida yang dapat membentuk radikal peroksil dan pada akhirnya radikal peroksil dapat menghasilkan peroksida.

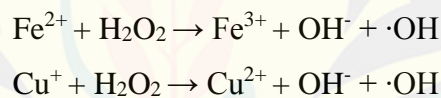
d. Radikal Hidroksil ($\cdot\text{OH}$)

Radikal pembentukan radikal hidroksil sangat reaktif. Reaksi ini dimulai dengan radikal superoksida yang berikatan dengan peroksida. Reaksi ini disebut reaksi *haber weiss*. Reaksi *haber weiss* dapat dilihat di Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Reaksi *haber weiss* (Sumber: Winarsi, 2007)

Hidrogen peroksida dapat bereaksi dengan logam transisi seperti Fe^{2+} dan Cu^+ dalam reaksi *fenton* dan membentuk radikal bebas. Reaksi *fenton* dapat dilihat di Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Reaksi *fenton* (Sumber: Winarsi, 2007)

2.3.2 Stres Oksidatif

Dalam keadaan normal, ada waktunya sel harus dirusak oleh ROS dan untuk mencegah perluasan kerusakan yang tidak diperlukan maka dibutuhkan antioksidan. Jika dalam proses ini terjadi ketidakseimbangan antara jumlah antioksidan dan ROS maka terjadilah stres oksidatif. Radikal bebas dapat menyerang lipid, DNA, dan protein (Murray dkk., 2012).

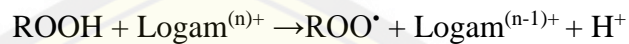
a. Peroksidasi Lipid

Radikal bebas dapat menyerang lipid dan menyebabkan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid dapat menyebabkan hilangnya fluiditas dan integritas membran sel. Hilangnya integritas membran di mitokondria dapat menurunkan efisiensi transport elektron dan menyebabkan pembentukan radikal bebas lebih

banyak. Proses ini dapat menyebabkan apoptosis sel. Proses peroksidasi ada tiga tahap, yaitu (Murray dkk., 2012):

1) Inisiasi

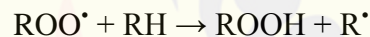
Lipid hidroperoksida berikatan dengan logam dan menghasilkan lipid peroksil. Reaksi inisiasi dapat dilihat di Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Reaksi inisiasi peroksidasi lipid (Murray dkk., 2012)

2) Propagasi

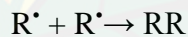
Lipid peroksil dapat berikatan dengan lipid dan menghasilkan lipid radikal. Reaksi propagasi dapat dilihat di Gambar 2.8.



Gambar 2.8 Reaksi propagasi peroksidasi lipid (Murray dkk., 2012)

3) Terminasi

Lipid radikal berikatan dengan lipid radikal akan membentuk lipid yang tidak radikal. Reaksi terminasi dapat dilihat di Gambar 2.9.



Gambar 2.9 Reaksi terminasi peroksidasi lipid (Murray dkk., 2012)

b. Kerusakan DNA

Radikal bebas dapat menyerang DNA. Apabila radikal bebas menyerang basa nukleotida maka akan menyebabkan salah baca yang menghasilkan mutasi DNA (Murray dkk., 2012). Selain itu apabila DNA yang diserang radikal bebas tidak bisa diperbaiki, maka sel akan memprogram diri untuk apoptosis (Kumar dkk., 2013).

c. Kerusakan Protein

ROS dapat menyebabkan protein menjadi salah bentuk karena mutasi gen penyandi protein. Protein salah bentuk yang terakumulasi berlebih di retikulum endoplasma akan menyebabkan apoptosis sel (Kumar dkk., 2013).

2.4 *Tamarindus Indica*

Tamarindus indica atau yang biasa dikenal sebagai Asam Jawa merupakan tumbuhan yang berukuran besar dan tinggi pohonnya dapat mencapai 24 meter. Batang pohonnya keras, dapat tumbuh membesar, dan memiliki daun yang rindang. Tumbuhan ini memiliki daun yang bertangkai panjang yang berukuran sekitar 17 cm dan jumlah siripnya genap. *Tamarindus indica* memiliki bunga berwarna kuning kemerah-merahan dan buah dengan tipe polong kecokelatan dengan rasa asam. Di dalam buahnya selain terdapat kulit pembungkus daging buah juga terdapat biji. Biji berjumlah 3-10 dengan ukuran 1,6 cm berbentuk tidak beraturan dengan tekstur keras dan berkilau (Bhadoriya dkk., 2011).

Tamarindus indica sudah sejak lama dikenal sebagai tumbuhan obat tradisional di India, Afrika, Pakistan, Bangladesh, Nigeria, dan beberapa negara tropis lainnya. *Tamarindus indica* diduga berasal dari Afrika Timur dan mulai dibudidayakan di Asia sekitar tahun 400 SM. Tumbuhan obat tradisional dikenal berdasarkan pengalaman penggunaan di masyarakat dari mulut ke mulut dari generasi hingga ke generasi. *Tamarindus indica* biasa digunakan untuk mengobati diare, disentri, infeksi cacing, penyembuhan luka, malaria, demam, konstipasi, dan inflamasi. Oleh karena itu berdasarkan beberapa penelitian tanaman ini dilaporkan memiliki aktivitas antiinflamasi, antimikrobal, antivenom, antimalaria, dan antioksidan. Setiap bagian *Tamarindus indica* mulai dari akar hingga daunnya dapat digunakan untuk pengobatan tradisional termasuk biji pada tanamannya (Bhadoriya dkk., 2011). Tumbuhan *Tamarindus indica* dapat dilihat di Gambar 2.10.



Gambar 2.10 *Tamarindus indica* (Sumber: Bhadoriya dkk., 2011)

2.4.1 Taksonomi *Tamarindus Indica*

Tabel 2.1 dibawah ini menjelaskan tentang klasifikasi *Tamarindus indica* berdasarkan tingkat taksonominya.

Tabel 2.1 Taksonomi tamarindus indica

Tingkatan	Nama
Kerajaan	Plantae
Divisi	Magnoliophyta
Kelas	Magnoliopsida
Sub kelas	Rosidae
Ordo	Fabales
Keluarga	Caesalpiniaceae
Marga	<i>Tamarindus</i>
Jenis	<i>Tamarindus indica</i> L.

(Sumber : Bhadoriya dkk., 2011)

2.4.2 Kandungan *Tamarindus Indica*

Tamarindus indica di setiap bagiannya memiliki banyak kandungan dan manfaatnya masing-masing. Tabel kandungan *Tamarindus indica* dapat dilihat di Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Kandungan tamarindus indica

Bagian	Manfaat	Kandungan
Kulit	Antialergi, antimikroba, antibiotik, antioksidan, analgesik	Tanin, procyanidin, katekin,
Biji	Antiinflamator, antioksidan, antiobesitas, gastroprotektor	Asam amino, proanthocyanidin, epicatechin
Daun	Antiemetik dan hepatoprotektor	Protein, serat, asam askorbat, benzil benzoat, tiamin, β - karoten
Buah	Antioksidan, analgesic, hepatoregenerativa, dan antispasmodik	Vitamin B, mineral, asam tartar, asam format, asam amino, thiazole, protein, lemak

(Sumber: Menezes dkk., 2016)

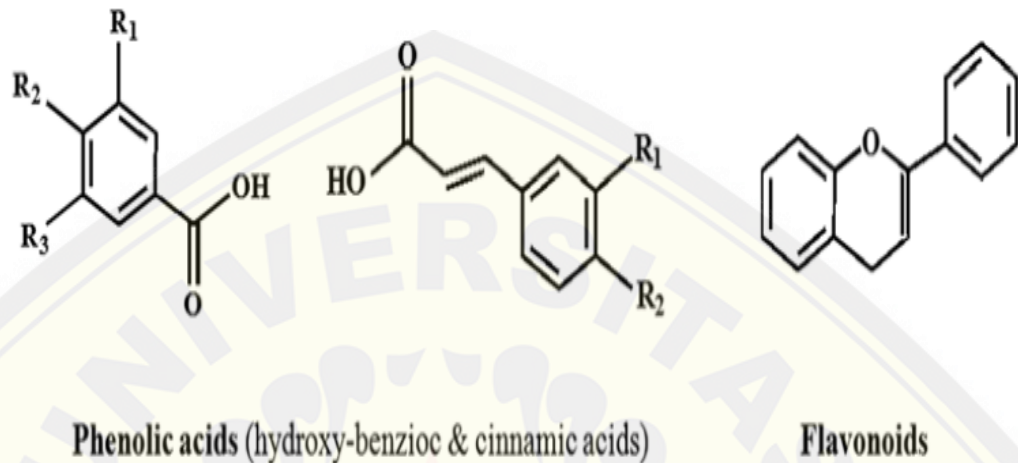
Tamarindus indica mengandung banyak senyawa polifenol, seperti katenin, *procyanidin* B2, epicatechin, asam tartarat, dan pektin. Hal ini menyebabkan *Tamarindus indica* memiliki efek antiinflamasi dan antioksidan (Kuru, 2014). Bagian *Tamarindus indica* yang memiliki efek antioksidan yang paling poten adalah bijinya. Jumlah polifenol pada ekstrak metanol biji *Tamarindus indica* ialah >200 mg GAE/g DW, sedangkan untuk ekstrak kulit *Tamarindus indica* jumlah polifenolnya antara 100-200 mg GAE/g DW (Razali dkk., 2012). Polifenol pada biji *Tamarindus indica* kadarnya lebih tinggi daripada biji tanaman tropis rambutan dan leci. Total polifenol pada biji *Tamarindus indica* adalah 501.95 ± 3.40 mg/g DW. Sedangkan polifenol pada bagian biji rambutan hanya 124.14 ± 3.01 mg/g DW. Untuk polifenol di biji leci berjumlah 357.82 ± 6.97 mg/g DW (Chunglok dkk., 2014).

Senyawa polifenol pada biji *Tamarindus indica* berisi *procyanidin* B2, *myricetin*, dan *caffeic acid* (Narwanto dkk., 2018). Selain itu, biji *Tamarindus indica* juga mengandung polisakarida, dimana rantai utama terdiri dari molekul glukosa β -1,4 yang berhubungan dengan *xylosa* (α -1,6) dan galaktosa. Terdapat pula kandungan protein, lemak, minyak lemak, dan beberapa asam keto (Bhadoriya dkk., 2011).

2.4.3 Polifenol

Polifenol merupakan senyawa alami yang banyak ditemukan di alam. Polifenol dapat ditemukan di buah, sayur, maupun minuman. Contoh buah yang mengandung polifenol yaitu anggur, apel, pir, ceri, dan beri yang mengandung kira-kira 200-300mg polifenol per 100 gram berat buah. Di dalam makanan, polifenol berfungsi sebagai pengatur kepahitan, warna, rasa, aroma, dan stabilitas oksidatif. Polifenol berguna untuk melindungi tubuh dari berbagai macam penyakit, seperti kanker, kardiovaskular, diabetes, osteoporosis, dan *neurodegeneratif*. Polifenol di dalam tanah merupakan produk metabolit sekunder yang bermanfaat sebagai antioksidan. Lebih dari 8.000 senyawa polifenol telah teridentifikasi dari berbagai macam tanaman. Polifenol dapat diklasifikasi ke beberapa kelompok berdasarkan jumlah cincin fenoliknya. Kelas utama dari polifenol adalah asam fenol dan

flavonoid (Pandey dkk., 2009). Gambar struktur kimia asam fenol dan flavonoid dapat dilihat di Gambar 2.11.



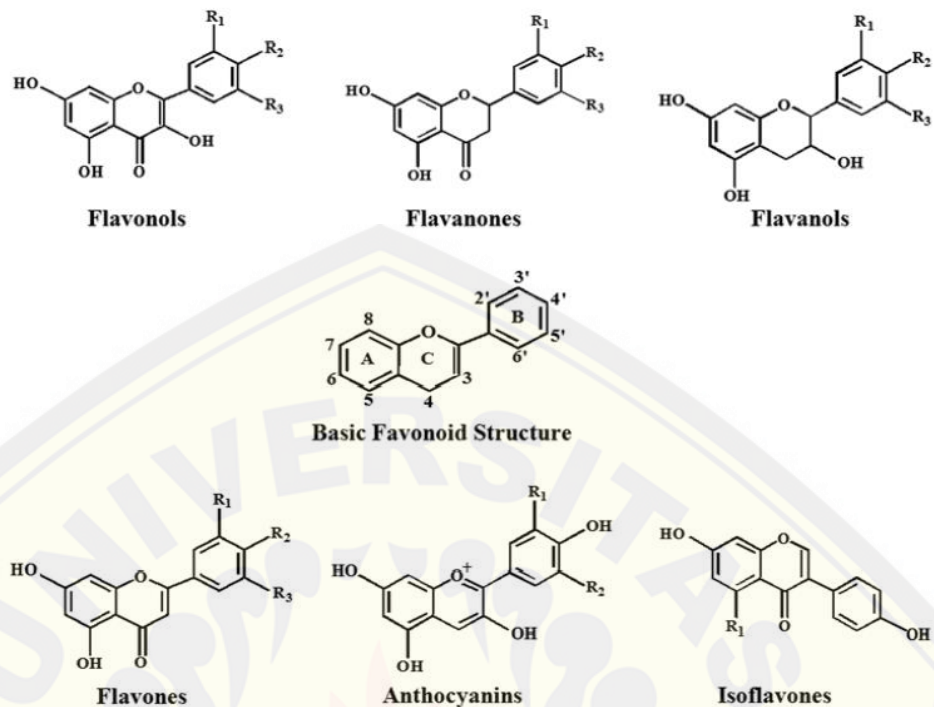
Gambar 2.11 Struktur kimia asam fenol dan flavonoid (Sumber: Pandey dkk., 2009)

a. Asam Fenol

Asam fenol banyak ditemukan dalam makanan dan dibagi menjadi dua jenis, yaitu turunan dari asam benzoat dan turunan dari asam *cinamic*. Kandungan asam benzoat dari tanaman yang dapat dimakan adalah umumnya sedikit. Sedangkan asam *cinamic* banyak ditemukan di tanaman daripada asam benzoat. Contoh asam *cinamic* ialah *caffeic acid* (Pandey dkk., 2009).

b. Flavonoid

Flavonoid merupakan kelompok polifenol yang paling banyak diteliti. Flavonoid memiliki struktur kimia yang terdiri dari dua cincin aromatik yang terikat oleh tiga atom karbon. Lebih dari 4.000 jenis flavonoid telah diidentifikasi. Flavonoid memiliki beberapa jenis, yaitu flavonol, flavones, flavanon, flavanol, anthocyanin, dan isoflavon. Jenis-jenis ini dibedakan berdasarkan variasi jumlah dan letak gugus hidroksil. Contoh flavonoid yang umum ditemukan di tumbuhan yaitu *myricetin* (Pandey dkk., 2009). Jenis-jenis flavonoid dapat dilihat di Gambar 2.12.



Gambar 2.12 Jenis-jenis flavonoid (Sumber: Pandey dkk., 2009)

Polifenol terdiri dari dua gugus, yaitu gugus aglikon dan gugus glikosida. Gugus aglikon merupakan gugus aktif yang dapat diserap oleh usus. Akan tetapi polifenol pada tumbuhan umumnya berbentuk polimer, sehingga polifenol saat berada di usus harus dihidrolisis oleh enzim usus atau oleh mikroflora di usus. Setelah itu didapatkan bentuk aglikon yang dapat diserap usus lalu akan dibawa ke hepar untuk dimetabolisme. Setelah dimetabolisme di hepar, polifenol dalam bentuk aglikon akan beredar ke pembuluh darah dan akan berikatan dengan albumin. Ikatan tersebut dapat mencapai organ dan jaringan di dalam tubuh. Polifenol akan diekskresikan melalui urin dan empedu (Pandey dkk., 2009).

2.4.4 Antioksidan

Antioksidan merupakan molekul yang dapat menghambat aktivitas radikal bebas. Antioksidan terdiri dari dua jenis yaitu antioksidan enzimatik dan nonenzimatik. Antioksidan enzimatik antara lain SOD, katalase, dan GSH-PX. Sedangkan antioksidan nonenzimatik contohnya flavonoid. Selain itu, antioksidan dapat dibedakan berdasarkan mekanismenya, yaitu: antioksidan primer, sekunder,

tersier. Antioksidan primer merupakan antioksidan yang dapat mendonorkan satu elektronnya, contohnya flavonoid. Antioksidan sekunder merupakan antioksidan yang bekerja mengikat logam, contohnya laktoferin. Antioksidan tersier merupakan antioksidan pencegah penumpukan biomolekul yang telah rusak, contohnya enzim metionin sulfaoksida (Ardhie, 2011).

2.4.5 Mekanisme Biji *Tamarindus Indica* sebagai antioksidan

Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa biji *Tamarindus indica* bermanfaat sebagai antioksidan dikarenakan adanya kandungan polifenol. Polifenol dapat berperan sebagai proteksi penyakit degeneratif, kanker, osteoporosis, gangguan kardiovaskuler, hingga diabetes (Pandey dkk., 2009).

Polifenol yang terkandung dalam biji *Tamarindus indica* yaitu *procyanidin B2*, *myrecitin*, dan *caffeic acid* (Narwanto dkk., 2018). Polifenol pada biji *Tamarindus indica* secara garis besar merupakan jenis antioksidan primer yang memiliki mekanisme menangkap langsung radikal bebas dan dapat menyumbangkan elektron dari gugus -OH pada cincin fenoliknya (Yang dkk., 2018).

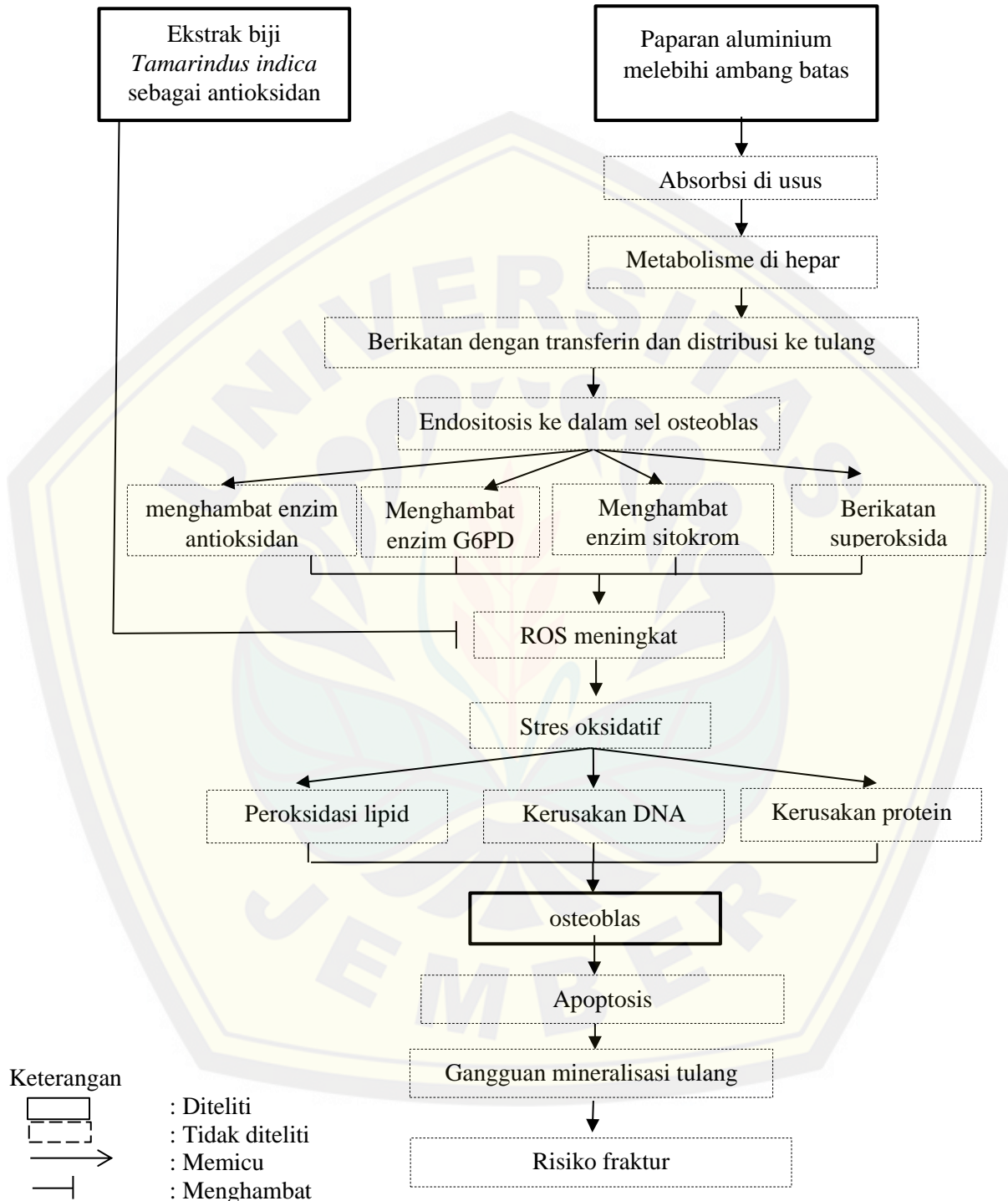
Polifenol *procyanidin B2* merupakan polifenol jenis turunan flavan 3-ol. *Procyanidin B2* dapat menangkap radikal superoksida dan radikal hidroksil untuk distabilkan muatannya dengan menyumbang elektron dari gugus -OH *procyanidin B2*. Selain itu, *procyanidin B2* dapat meningkatkan regulasi enzim SOD, katalase, dan GSH-PX (Yang, 2018).

Polifenol *myrecitin* merupakan polifenol turunan flavonol. *Myrecitin* merupakan jenis polifenol yang banyak terdapat di tanaman. *Myrecitin* dapat menangkap radikal hidrogen peroksida dan mencegah reaksi *fenton* berlanjut. *Myricetin* dapat dengan mudah menembus membran sel dan masuk ke dalam *sitosol* (Barzegar, 2016).

Polifenol lain yang terkandung di biji *Tamarindus indica* yaitu *caffeic acid*. *Caffeic acid* merupakan polifenol turunan asam fenol. *Caffeic acid* memiliki mekanisme menangkap radikal hidroksil yang sangat reaktif dan dapat menghambat proses peroksidasi lipid (Khan dkk., 2016).

Radikal bebas satu dengan yang lainnya dapat membentuk radikal bebas berbahaya seperti radikal hidroksil. Radikal hidroksil berbahaya karena bereaksi dengan protein, DNA, dan lipid (Murray, 2012). Reaksi tersebut menyebabkan peroksidasi lipid, kerusakan DNA, dan kerusakan protein. Peroksidasi lipid menyebabkan hilangnya fluiditas dan integritas membran sel. Hilangnya integritas membran di mitokondria menurunkan efisiensi transport elektron dan menyebabkan pembentukan radikal bebas lebih banyak (Murray dkk., 2012). Peningkatan radikal bebas menyebabkan stres oksidatif yang memicu apoptosis pada sel osteoblas (Li dkk., 2012). Jika osteoblas mengalami apoptosis dalam jumlah banyak, maka menyebabkan gangguan mineralisasi dan menyebabkan risiko fraktur spontan pada tulang (Nurchi dkk., 2012). Semua mekanisme efek antioksidan pada biji *Tamarindus indica* dapat menangkap radikal-radikal bebas (Yang dkk., 2018) dan mencegah timbulnya peroksidasi lipid (Khan dkk., 2016) sehingga menanggulangi kerusakan tulang yang mengalami gangguan karena ketidakseimbangan jumlah radikal bebas dan antioksidannya (Sundaram dkk., 2015).

2.5 Kerangka Konseptual



Gambar 2.13 Kerangka konsep penelitian

Aluminium masuk ke dalam lambung dan akan dipecah ke bentuk monomer yaitu Al^{3+} , selanjutnya aluminium dibawa ke duodenum dan akan diserap. Setelah itu aluminium dibawa ke hepar untuk dimetabolisme dan selanjutnya diedarkan ke seluruh tubuh melalui pembuluh darah. Aluminium di pembuluh darah diikat oleh transferin dan dibawa ke organ yang memiliki transferin reseptor. Salah satu organ yang memiliki transferin reseptor yaitu tulang di bagian sel osteoblasnya. Aluminium masuk ke dalam sel osteoblas melalui mekanisme *endositosis*. Aluminium yang masuk ke dalam osteoblas akan menghambat beberapa enzim yang diperlukan untuk respirasi, yaitu enzim glukosa 6-phosphatase, enzim sitokrom oksidase. Selain itu aluminium menghambat regulasi enzim antioksidan endogen: SOD, katalase, dan GSH-PX. Aluminium juga dapat bertindak sebagai prooksidan dengan berikatan bersama radikal superoksida membentuk aluminium superoksida. Mekanisme tersebut menyebabkan peningkatan radikal bebas hidroksil yang sangat reaktif.

Ketidakeimbangan jumlah radikal dan antioksidan menyebabkan stres oksidatif. Stres oksidatif dapat menyebabkan kerusakan DNA, kerusakan protein, dan peroksidasi lipid. Kerusakan tersebut dapat menyebabkan apoptosis sel osteoblas. Apoptosis sel osteoblas dapat menyebabkan gangguan mineralisasi dan kepadatan tulang yang pada akhirnya dapat meningkatkan risiko fraktur.

Tamarindus indica dapat berperan sebagai antioksidan eksogen primer karena mengandung senyawa polifenol. Polifenol dapat menangkap radikal bebas dengan menyumbangkan elektron dari gugus -OH. Polifenol pada *Tamarindus indica* dapat mencegah apoptosis osteoblas. *Tamarindus indica* dapat menstabilkan radikal bebas dan menghambat peroksidasi lipid sehingga radikal bebas tidak akan reaktif dan tidak dapat merusak sel. Sehingga *Tamarindus indica* dapat mencegah kerusakan tulang.

2.6 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini yaitu terdapat pengaruh pemberian ekstrak *Tamarindus indica* terhadap jumlah sel osteoblas pada tulang *femur* yang diinduksi aluminium.



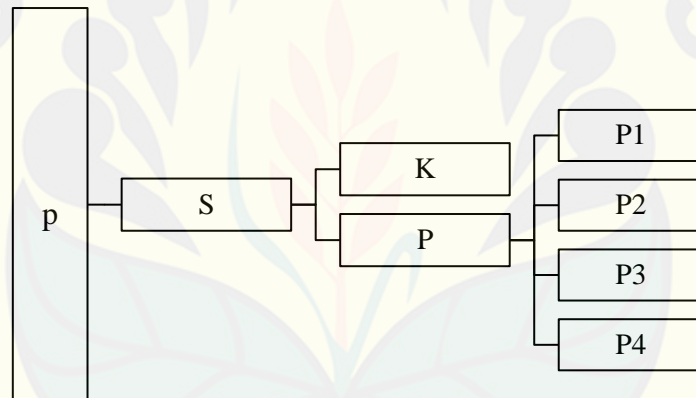
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan yaitu *true experimental laboratories* secara *in vivo* dengan rancangan *post test only control group design*.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu *post test only control group design*. Pengambilan data dilakukan tanpa adanya pengukuran awal (*pre test*), namun hanya dilakukan pengukuran akhir (*post test*) dengan membandingkan kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol.



Gambar 3.1 Rancangan penelitian

Keterangan:

p : Populasi tikus jantan galur Wistar

S : Sampel hewan coba

K : Kelompok kontrol yang diberikan larutan berisi campuran aquabidest 0,5 mL dan NaCl 0.5 mL

P : Kelompok perlakuan yang terbagi dalam 4 perlakuan

P1 : Kelompok perlakuan dengan pemberian larutan AlCl_3 dosis 300 mg/kgBB

P2 : Kelompok perlakuan dengan pemberian larutan AlCl_3 dosis 300 mg/kgBB dan ekstrak *Tamarindus indica* dosis 25mg/kgBB

P3 : Kelompok perlakuan dengan pemberian larutan $AlCl_3$ dosis 300 mg/kgBB dan ekstrak *Tamarindus indica* dosis 50mg/kgBB

P4 : Kelompok perlakuan dengan pemberian larutan $AlCl_3$ dosis 300 mg/kgBB dan ekstrak *Tamarindus indica* 100mg/kgBB

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di beberapa tempat, yaitu :

- a. Perlakuan dan pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- b. Terminasi hewan coba dilakukan di Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada tanggal 25 Februari 2019.
- c. Pembuatan larutan $AlCl_3$ dan larutan ekstrak *Tamarindus indica* dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- d. Pembuatan sediaan histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr. Soebandi Jember.
- e. Pengamatan dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2018 hingga Maret 2019.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tikus Wistar jantan.

3.4.2 Sampel

Sampel menggunakan tikus wistar jantan dengan kriteria berupa:

- a. Kriteria Inklusi
 - 1) Tikus jantan
 - 2) Umur 2-3 bulan
 - 3) Berat badan 120-210 gram
 - 4) Sehat dan bergerak aktif
- b. Kriteria Eksklusi
 - 1) Tikus sakit (tidak aktif bergerak dan mengalami rambut rontok)

- 2) Tikus tidak ingin makan dan minum
- 3) Mati sebelum proses randomisasi

3.4.3 Besar Sampel

Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok perlakuan. Perkiraan jumlah replikasi dalam penelitian dapat ditentukan berdasarkan rumus *Federer* sebagai berikut.

$$\begin{aligned}(r - 1) (t - 1) &\geq 15 \\(r - 1) (5 - 1) &\geq 15 \\(r - 1) 4 &\geq 15 \\4r - 4 &\geq 15 \\4r &\geq 19 \\r &\geq 5\end{aligned}$$

Keterangan :

r : replikasi

t : jumlah kelompok

Rumus besar sampel $r \times t$
 5×5
 25

Berdasarkan perhitungan rumus *Federer*, besar sampel tikus untuk masing-masing kelompok sebanyak 5 ekor. Jadi dalam penelitian ini jumlah sampel yang digunakan untuk 5 kelompok ialah 25 ekor tikus.

3.4.4 Teknik Pengambilan Sampel

Metode yang digunakan dalam pengambilan sampel dalam penelitian ini adalah berdasarkan *Simple Random Sampling*, yaitu mengambil sebagian sampel secara acak dari populasi tanpa memperhepakan strata (Sugiyono, 2007).

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel independen/variabel bebas merupakan variabel yang nilainya tidak terikat oleh variabel lainnya. Variabel ini memengaruhi atau yang menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel dependen (Sugiyono, 2007). Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu pemberian larutan $AlCl_3$ yang diberikan secara peroral dengan dosis sebesar 300mg/kgBB. Sedangkan untuk pemberian larutan

ekstrak *Tamarindus indica* yang diberikan secara peroral dengan dosis sebesar 25,50, dan 100mg/kgBB (Sundaram dkk., 2015).

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel dependen/terikat merupakan variabel yang nilainya dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat, karena adanya variabel bebas (Sugiyono, 2007). Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu jumlah sel osteoblas tulang *femur*.

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol/kontrol adalah variabel yang dibuat konstan agar hubungan variabel bebas dan variabel terikat tidak dipengaruhi oleh faktor yang tidak diteliti (Sugiyono, 2007). Variabel terkontrol dalam penelitian ini yaitu:

- a. Tikus wistar jantan;
- b. Pemberian pakan dan minum secara *ad libitum*;
- c. Lama perlakuan pada tikus;
- d. Prosedur penelitian;
- e. Frekuensi pemberian larutan $AlCl_3$ pada tikus;
- f. Frekuensi pemberian larutan ekstrak *Tamarindus indica* pada tikus.

3.6 Definisi Operasional

- a. Aluminium yang digunakan yaitu bubuk $AlCl_3$ (aluminium klorida) yang dilarutkan dalam aquabidest dengan kadar 50 mg/ml. Larutan $AlCl_3$ diberikan pada tikus wistar jantan secara peroral dengan dosis sebesar 300 mg/kgBB selama 10 minggu (Chiroma dkk., 2018). Pengukuran aluminium menggunakan rasio.
- b. Ekstrak yang terbuat dari biji *Tamarindus indica* yang dilarutkan dengan metanol yang memiliki manfaat *neuroprotektif* melalui efek antioksidan. Larutan ekstrak *Tamarindus indica* diberikan pada tikus wistar jantan secara peroral dengan dosis sebesar 25,50, dan 100 mg/kgBB selama 10 minggu. Pengukuran ekstrak menggunakan rasio

- c. Histopatologi *femur* tikus wistar jantan adalah dengan menghitung jumlah ostoblas secara mikroskopik. Pembuatan preparat tulang mengambil bagian diafisis tengah secara melintang. Sebelum dibuat preparat, tulang didekalsifikasi menggunakan larutan BNF 10% dan asam format selama 2 minggu. Setelah itu dibuat preparat dan dilakukan pembacaan. Preparat tulang menggunakan pewarnaan HE. Pengukuran jumlah sel osteoblas pada perbesaran 400x pada lima lapang pandang. Rata-rata jumlah sel osteoblas tiap sampel dihitung dengan rumus $N = (N1+N2+N3+N4+N5)/5$.

3.7 Alat dan Bahan

3.7.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah sebagai berikut.

- Pemeliharaan hewan coba: kandang, tempat makan, dan tempat minum.
- Pembuatan larutan $AlCl_3$: timbangan, *beaker glass*, sendok, pengaduk, pipet, dan lemari asam.
- Pemberian larutan $AlCl_3$: *handscoon*, masker, jas lab, spuit, dan sonde.
- Terminasi dan pengambilan tulang *femur*: *handscoon*, toples, kapas, *minor set*.
- Pemeriksaan histopatologi: mikroskop dan kamera.

3.7.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah sebagai berikut

- Pemeliharaan hewan coba: pakan, air minum, dan serbuk kayu.
- Pembuatan larutan $AlCl_3$: bubuk $AlCl_3$ dan aquabidest.
- Terminasi dan pengambilan tulang *femur*: larutan NaCl 0,9%, dan BNF10% + asam format
- Pemeriksaan histopatologi: preparat histopatologi.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Pemilihan Sampel

Sampel berupa tikus Wistar jantan berumur 3 bulan dengan berat badan 120–210 gram, sebanyak 25 ekor yang terbagi dalam 5 kelompok. Tiap-tiap

kelompok terdiri dari 5 ekor. Tikus yang dipilih ialah tikus yang sehat dan bergerak aktif.

3.8.2 Persiapan Sampel

Tikus diadaptasikan selama 7 hari sebelum dilakukan perlakuan untuk penyesuaian tikus di lingkungan yang baru (Sengupta, 2013). Tempat pakan dan minum tikus diisi ulang setiap hari sebelum perlakuan dimulai. Kandang dibersihkan lalu serbuk kayu diganti setiap 7 hari sekali untuk mencegah stres dan penyakit pada tikus.

3.8.3 Pembuatan Larutan AlCl_3 (Aluminium Klorida)

AlCl_3 merupakan senyawa dari aluminium yang terdiri dari ion aluminium (Al^{3+}) dan klorin (Cl^-). AlCl_3 murni berbentuk bubuk berwarna putih yang dapat berubah warna menjadi kuning. AlCl_3 memiliki titik lebur yang tinggi yaitu $192,6^\circ\text{C}$ dan titik didih $182,7^\circ\text{C}$. AlCl_3 merupakan jenis aluminium yang sangat mudah bereaksi dengan air dan akan membentuk asam klorida agak keruh yang akan menguap. Selain itu, AlCl_3 dapat bereaksi dengan benzena, karbon tetraklorid, dan klorofom (Keith dkk., 2008). AlCl_3 dalam penelitian ini digunakan sebagai prooksidan penyebab stres oksidatif yang menyebabkan kerusakan pada sel osteoblas.

AlCl_3 dalam bentuk larutan dibuat dengan kadar 50 mg/ml. Larutan dibuat dengan perbandingan 5000 mg bubuk AlCl_3 dilarutkan dalam 100 ml aquabidest, sehingga dalam 1 ml larutan AlCl_3 mengandung 50 mg AlCl_3 (Baydar dkk., 2003). Pembuatan larutan AlCl_3 dilakukan setiap 1 minggu sekali.

- a. Siapkan diri menggunakan APD (*Handscoon*, masker, dan jas lab);
- b. Siapkan alat dan bahan yang dibutuhkan;
- c. Timbang 13,048 mg AlCl_3 menggunakan timbangan neraca lalu masukan ke *beaker glass*;
- d. Campurkan bubuk AlCl_3 dengan aquabidest 261 mL dengan hati-hati di lemari asam;
- e. Aduk perlahan dengan spatula hingga tercampur.

3.8.4 Pembuatan Larutan Ekstrak *Tamarindus Indica*

Pembuatan ekstrak menggunakan teknis maserasi. Ekstrak *Tamarindus indica* terbuat dari serbuk biji *Tamarindus indica* (100gr) yang dilarutkan dalam metanol (500mL) selama 72 jam pada suhu kamar. Setelah itu ekstrak disaring dan larutan dievaporasi dengan *water bath* untuk mendapatkan residu ekstrak. (Bandawane dkk., 2013). Untuk larutan ekstrak *Tamarindus indica* dibuat setiap hari.

- a. Campurkan ekstrak *Tamarindus indica* 500mg dan NaCl 0,9% 10 mL dengan *magnetic stirrer* hingga homogen;
- b. terbentuk larutan ekstrak *Tamarindus indica* dengan kadar 1 mL larutan mengandung 50mg ekstrak *Tamarindus indica*.

3.8.5 Pembuatan Larutan BNF 10% (*Buffer Neutral Formalin*)

Larutan BNF 10% digunakan untuk mengawetkan sel tulang agar sel tulang tidak mengalami nekrosis selama proses dekalsifikasi. Untuk pembuatan larutan BNF 10% ada beberapa tahap. Tahapannya sebagai berikut:

- a. Timbang bubuk NaH_2 sebanyak 40 gram
- b. Timbang bubuk Na_2H sebanyak 65 gram
- c. Masukkan $\text{Na}_2\text{H} + \text{NaH}_2$ ke dalam *beaker glass* berukuran 1 liter.
- d. Tambahkan aquabidest 1 liter.
- e. Aduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen
- f. Jika sudah homogen, tambahkan formalin 100mL ke dalam campuran tersebut

3.8.6 Perlakuan

Pemberian larutan AlCl_3 dan larutan ekstrak *Tamarindus indica* dilakukan peroral setiap hari selama 10 minggu. Langkah pertama menyiapkan alat dan bahan. Ambil larutan AlCl_3 menggunakan sonde sesuai dengan dosis yang telah dihitung. Tikus dipegang pada bagian kepala sehingga mulut menghadap ke atas. Kemudian masukkan sonde ke oral melalui langit-langit hingga ke belakang esofagus secara perlahan. Sonde yang digunakan ialah sonde dengan ujung tumpul membulat.

Selanjutnya tunggu 1 jam untuk pemberian larutan ekstrak *Tamarindus indica* sesuai dosis yang telah ditentukan. Tikus dibagi menjadi lima kelompok.

- a. Kelompok K diberikan campuran saline NaCl 0,9% 0,5 mL dan aquabidest 0,5 mL.
- b. Kelompok P1 diberikan larutan AlCl₃ dosis 300mg/kgBB.
- c. Kelompok P2 diberikan larutan AlCl₃ dosis 300mg/kgBB dan larutan ekstrak *Tamarindus indica* dosis 25mg/kgBB.
- d. Kelompok P3 diberikan larutan AlCl₃ dosis 300mg/kgBB dan larutan ekstrak *Tamarindus indica* 50mg/kgBB.
- e. Kelompok P4 diberikan larutan AlCl₃ dosis 300mg/kgBB dan larutan ekstrak *Tamarindus indica* 100mg/kgBB.

3.8.7 Pengambilan Tulang *Femur*

Tikus diterminasi setelah 10 minggu tahap perlakuan. Terminasi tikus menggunakan eutanasia fisik dengan dislokasi servikal. Dislokasi servikal memiliki keuntungan dapat menyebabkan kematian hewan yang cepat dan tidak menimbulkan pencemaran. Sebelum dilakukan dislokasi servikal, tikus harus dianastesi terlebih dahulu menggunakan eter untuk mencegah kesakitan. Tikus dimasukkan ke dalam toples yang berisi eter 10mL dan ditunggu hingga tidak sadar. Setelah tikus tidak sadar lalu dilakukan dislokasi servikal. Teknik dislokasi servikal adalah dengan memberikan tekanan ke bagian posterior dasar tulang tengkorak dan sumsum tulang. Jika otak telah terpisah dari sumsum tulang maka reflek kedip tikus akan menghilang (Isbagio, 1992). Tikus yang sudah mengalami disklokasi servikal diletakkan di alas papan dengan posisi anatomis. Lalu keempat kaki tikus difiksasi menggunakan jarum. Pembedahan dilakukan dengan cara menggunting kulit di bagian *femur*, selanjutnya pisahkan otot dan ligamen dengan menggunakan skalpel hingga terlihat tulang *femur*. Setelah itu, ambil tulang *femur* dengan cara memotong di bagian sendinya. Pembedahan dan pengambilan tulang menggunakan alat-alat bedah dan dilakukan dengan teliti.

Pot organ berukuran 50 mL dipersiapkan untuk menyimpan tulang *femur*. Pot telah diberi label nama sesuai kelompok. Pot diisi dengan larutan BNF (*Buffer*

neutral formalin) 10% + asam format sampai seluruh tulang terendam. Setelah tulang *femur* diambil, tulang *femur* dicuci dengan NaCl 0,9%. Setelah itu tulang *femur* segera dimasukkan ke dalam pot.

3.8.8 Dekalsifikasi Tulang *Femur*

Dekalsifikasi bertujuan untuk menarik garam kalsium pada tulang. Penarikan garam kalsium agar tulang menjadi lunak dan bisa dibuat preparat. Tulang femur didekalsifikasikan selama dua minggu menggunakan larutan BNF 10% yang dicampur asam format dengan perbandingan 9:1. Larutan tersebut harus diganti setiap hari. Setelah 2 minggu, tulang *femur* tersebut dibersihkan dengan rendaman air keran selama 24 jam (Marcu dkk., 2011).

3.8.9 Pembuatan Preparat Histopatologi (Pewarnaan HE)

Proses pembuatan preparat antara lain memotong melintang bagian tengah diafisis menggunakan skalpel dengan ketebalan 0.3-0.5 mm, dehidrasi cairan etanol, vakum untuk mengeluarkan udara, mencetak blok parafin, pemotongan blok jaringan, dan pewarnaan preparat menggunakan pewarnaan HE (Muntiha, 2001). Pembuatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr. Soebandi. Setiap satu sampel tulang *femur* untuk satu preparat, sehingga jumlah preparat ada 25.

3.8.10 Pengamatan Preparat Histopatologi

Preparat histopatologi dibaca dalam lima lapang pandang dengan perbesaran 400x. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah sel osteoblas. Osteoblas yang diamati yaitu osteoblas yang berada di periosteum dan endosteum. Untuk pembandingan jumlah osteoblas, kelompok kontrol dianggap memiliki jumlah osteoblas normal. Pengamatan dilakukan satu kali oleh dua orang pengamat dan seorang ahli dengan metode *blinding* sehingga diharapkan dapat mengurangi bias.

3.9 Uji Kelayakan Etik

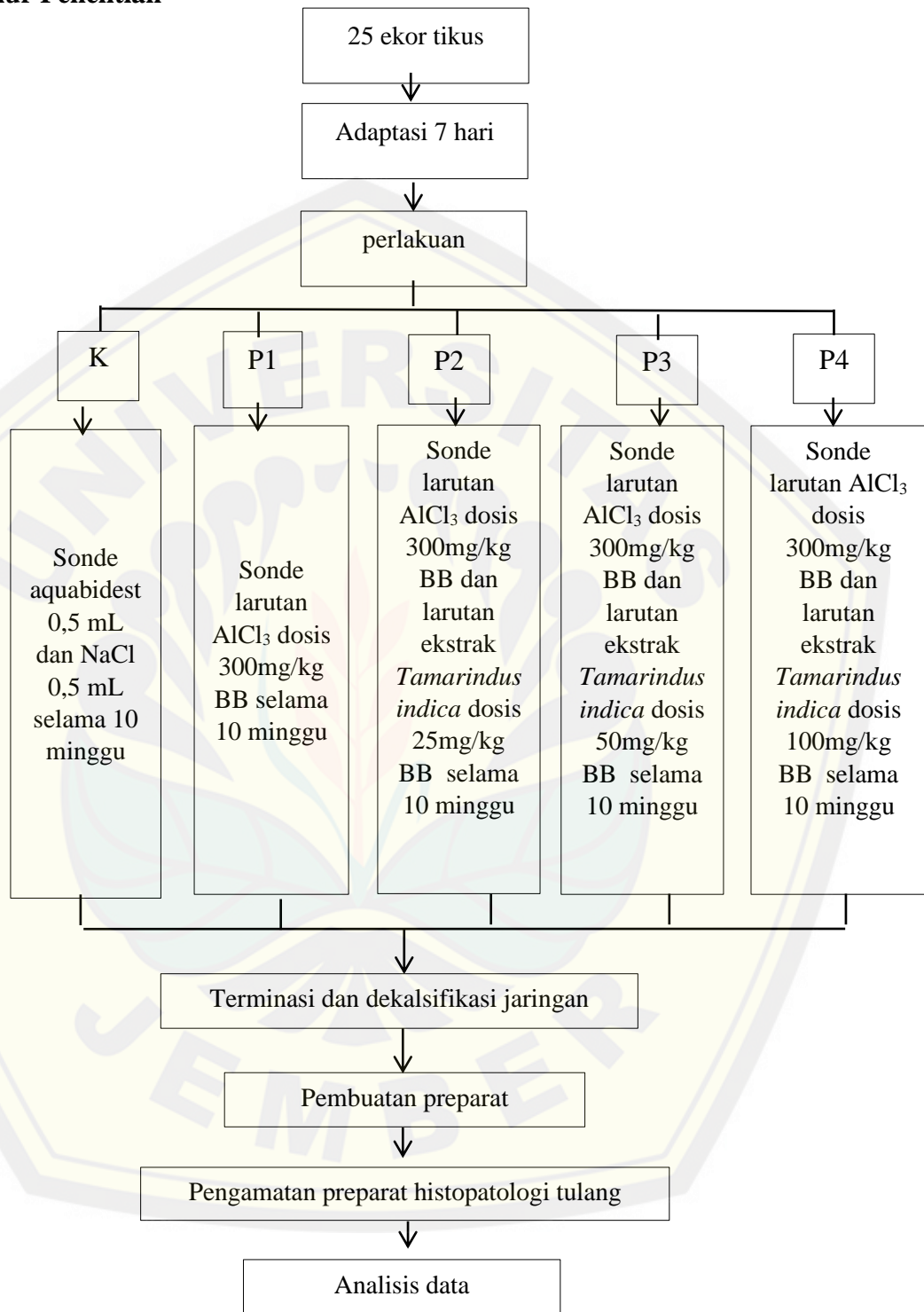
Penelitian ini menggunakan tikus Wistar jantan sebagai subjek penelitian, sehingga sebelum dilaksanakan penelitian harus dilakukan uji kelayakan etik oleh

Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Prosedur ini berguna untuk menjamin keamanan peneliti dan hewan coba serta melindungi hewan coba.

3.10 Analisis Data

Data yang dianalisis adalah jumlah osteoblas. Data yang digunakan ialah data rasio. Analisis data menggunakan program komputer pengolah statistik “*Statistical Package for Social Science (SPSS) 26.0*”. Sebelum dilakukan uji statistik, harus dilakukan uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro-Wilke* dan uji homogenitas menggunakan *Lavene’s test*. Jika data tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$), maka untuk uji statistik menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya jika hasil uji *Kruskal Wallis* ($p < 0,05$) maka dilanjutkan tes lanjutan yaitu *Mann Whitney*. Jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan data homogen ($p > 0,05$) maka dilanjutkan uji statistik menggunakan *One Way Anova* untuk menguji ada atau tidaknya perbedaan pada seluruh kelompok. Jika terdapat perbedaan ($p < 0,05$) dilanjutkan uji lanjutan *Post Hoc* jenis uji beda nyata terkecil/LSD (*Least Significant Differences*) untuk menguji perbedaan antar kelompok.

3.11 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian ekstrak *Tamarindus indica* selama 10 minggu pada tikus wistar jantan yang diinduksi aluminium tidak berpengaruh terhadap jumlah sel osteoblas.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, peneliti memberikan beberapa saran antara lain:

1. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai dosis toksik $AlCl_3$ yang mampu merusak dan menurunkan sel osteoblas tulang secara *in vivo*.
2. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai dosis terapeutik dan dosis letal ekstrak biji *Tamarindus indica* untuk penyembuhan kerusakan tulang yang disebabkan peningkatan ROS.
3. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai prosedur pembuatan ekstrak biji *Tamarindus indica* khususnya dalam pemilihan pelarut agar dapat dihasilkan ekstrak dengan kualitas terbaik.

DAFTAR PUSTAKA

- Aengwanich, W., dan M. Suttajit. 2013. Effect of polyphenols extracted from tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed coat on pathophysiological changes and red blood cell glutathione peroxidase activity in heat-stressed broilers. *Int J Biometeorol.* 57: 137-143.
- Ardhie, A.M. 2011. Radikal Bebas dan Peran Antioksidan Dalam Mencegah Penuaan. *Medicinus.* 24(1):4-9.
- Bandawane, D., M. Hivarale., A. Mali., Mhetre. 2013. Evaluation of anti inflammatory and analgesic activity of tamarind (*Tamarindus indica* L.) Seeds. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 5(4): 623-629.
- Barzegar, A. 2016. Antioxidant activity of polyphenolic myricetin in vitro cell-free and cell-based systems. *Molecular Biology Research Communications.* 5(2): 87-95.
- Baydar, T., A. Papp, A. Aydin, L. Nagymajtenyi, H. Schulz, A. Isimer, dan G. Sahin. 2003. Accumulation of aluminum in rat brain. *Biological Trace Element Research.* 92: 231–244.
- Bhadoriya, S. S., A. Ganeshpurkar, J. Narwaria, G. Rai, A.P. Jain. 2011. *Tamarindus indica*: Extent of explored potential. *Pharmacognosy reviews.* 5(9): 73–81.
- Chiroma, Samila Musa., M.A.M. Moklasa, C.N.M. Taiba, M.T.H. Baharuldina, Z. Amonc. 2018. D-galactose and aluminium chloride induced rat model with cognitive impairments. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 103: 1602–1608.
- Chunglok, W., T. Utaipan, N. Somchit , M. Lertcanawanichakul, Y. Sudjaroen. 2014. Antioxidant dan Antiproliferative Activities of Non-Edible Parts of Selected Tropical Fruits. *Sains Malaysiana.* 43(5): 689-696.
- Clarke B. 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN.* 3(3): S131–S139.
- Crisponi, G., D. Fanni, C. Gerosa, S. Nemolato, V. M. Nurchi, M. C. Alonso, J. I. Lachowicz, G. Faa. 2013. The meaning of aluminium exposure on human health and aluminium-related diseases. *Biomolecular Concepts.* 4(1): 77–87.

- Dharmawan, Dion. Krismashogi., U. Elfiah, S.S. Wahyudi. 2018. *Anatomi berdasarkan kepentingan klinis*. Jember: UPT Percetakan & Penerbitan Universitas Jember.
- Eroschenko, V.P. 2015. *Atlas Histologi difiore dengan Korelasi Fungsional*. Jakarta: EGC.
- Exley, C. 2013. Human exposure to aluminium. *Environmental Science Processes & Impacts*. 15(10):1807–1816.
- Gallagher, J. Chris., dan A. J. Sai. 2010. Molecular biology of bone remodeling: implication for new therapeutic targets for osteoporosis. *Maturitas*. 65(4): 301-307.
- Gummin, David D., Mowry, James., Spyer, Daniel., Brooks, Daniel. 2018. Annual of the American Association of Poison Control Centers. National Poison Data System (NPDS): 35th Annual Report. *Clin Toxicol*.56(12): 1213-1415.
- Isbagio, D.W. 1992. EUTHANASIA PADA HEWAN PERCOBAAN. *MediaLitbangkes*. 2(1): 18-24.
- Jaishankar, M., T. Tseten, N. Anbalagan, B.B. Mathew, K.N. Beeregowda. 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol*. 7(2): 60-72.
- Jeffery, E.H., K. Abreo., E. Burgess., J. Cannata. 1996. SYSTEMIC ALUMINUM TOXICITY EFFECTS ON BONE, HEMATOPOIETIC TISSUE, AND KIDNEY. *Journal of Toxicology and environmental Health*. 48(6): 649-666.
- Keith, S. D. Jones, Z. Rosemond. 2008. *Toxicological Profile for Aluminum*. Georgia: ATSDR.
- Khan, F.A., A. Maalik, G. Murtaza. 2016. Inhibitory mechanism against oxidative stress of caffeic acid. *Journal of Food and Drug Analysis*. 24(4): 695-702.
- Klein, G.L. 2019. Aluminium toxicity to bone: A multisystem effect?. *Osteoporosis and Sarcopenia*. 5(1): 2-5.
- Krewski, D., R. A. Yokel, E. Nieboer, D. Borchelt, J. Cohen, J. Harry, S. Kacew, J. Lindsay, A. M. Mahfouz, dan V. Rondeau. 2007. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 10(1): 1–269.

- Kumar, V., A.K. Abbas, J.C. Aster. 2013. *ROBBINS BASIC PATHOLOGY*. 9th ed. Singapore: Elsevier. 2015. *BUKU AJAR PATOLOGI Robbins*. Terjemahan I.M. Nasar dan S. Cornain. Edisi 9. Singapura: Elsevier.
- Kuru, Pinar. 2014. Tamarindus indica and its health related effects. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4(9): 676-681.
- Lau., K. H. William., A. Yoo., S. P. Wang. 1991. Aluminium Stimulates the proliferation and differentiation of osteoblasts in vitro by a mechanism that is different from fluoride. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 105: 93-105.
- Li, Xinwei., Y. Han, Y. Guan, L. Zhang, C. Bai, Y. Li. 2012. Aluminum Induces Osteoblast Apoptosis Through the Oxidative Stress-Mediated JNK Signaling Pathway. *Biol Trace Elem Res*. 2012(150): 502-508.
- Marcu, Fl., Fl. Bogdan, G. Mușiu, L. Lazăr. 2011. The Histopathological study of osteoporosis. *Rom J Morphol Embryol*. 52(1): 321-325.
- Marinov, P., S. Zlateva., G. Bonchev., D. Ivanov., M. Youcheva., K. Georgiev. 2016. ACUTE METHANOL INTOXICATION-A CHALLENGE FOR CLINICAL TOXICOLOGY. *Journal of IMAB*. 22(4): 1352-1354.
- Menezes, Aline Pereira Paes., S.C.C. Trevisan, S.M. Barbalho, E.L. Guiguer. 2016. Tamarindus indica L. A plant with multiple medicinal purposes. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 5(3): 50-54.
- Muntiha, M., 2001, Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin. *Temu Teknis Non Peneliti*. 156-163.
- Murray, R.,D.A. Bender, P.J. Kennely, V.W. Rodwell, P.A. Weil. 2012. *Happer Illustrated Biochemistry*. 29th edition. Asia: McGraw-Hill Companies, Inc. Terjemahan L.R. Manurung dan L.I. Mandra. 2014. *Biokimia Harper*. Edisi 29. Jakarta: EGC.
- Narwanto, M.I., M. Rahayu, S. Soeharto, dan Widodo. M.A. 2018. Identifikasi dan Uji Silico Potensi Anti Inflamasi Dan Antioksidan Senyawa Polifenol Ekstrak Metanol Biji Tamarindus indica. *Journal of Agromedicine and Medical Science*. 4(1): 13-17.
- Newairy, A. A., A. F. Salama, H. M. Hussien, dan M. I. Yousef. 2009. Propolis alleviates aluminium-induced lipid peroxidation and biochemical parameters in male rats. *Food and Chemical Toxicology*. 47: 1093–1098.

- Nurchi, V.M., G. Crisponi, V. Bertolasi, G. Faa, M. Remelli. 2012. Aluminium-dependent human diseases and chelating properties of aluminium chelators for biomedical applications. *Metal Ions in Neurological Systems*. 142(4): 103-124.
- Pandey, K. B., S.I. Rizvi. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2(5): 270–278.
- Paulsen , F., dan J. Waschke. 2010. *Sobotta, Atlas der Anatomie des Mensche : allgemeine anatomie und bewegungsapparat*. 23rd edition. München: Elsevier GmbH. Terjemahan oleh Brahm U.P., H. Hartanto, A.W. Nugroho, D. Ramadhani, A. Diani. 2012. *Sobotta Atlas Anatomi Jilid 1 Manusia Anatomi Umum dan Sistem Muskuloskeletal*. Cetakan Edisi 23. Jakarta: EGC.
- Pavelić, Sandra Kraljević., V. Micek, A. Filošević, D. Gumbarević, P. Žurga, A. Bulog, T. Orct, Y. Yamamoto, T. Preočanine, J. Plavec, R. Peter, M. Petravić, D. Dražen Vikić-Topić, K. Pavelić. 2017. Novel, oxygenated clinoptilolite material efficiently removes aluminium from aluminium chloride-intoxicated rats *in vivo*. *Microporous and Mesoporous Materials*. 249:146-15.
- Rasjad, C. 2015. *Pengantar Ilmu Bedah Ortopedi*. Jakarta: Yarsif Watampone.
- Razali, N., S. Mat-Junit, A.F. Abdul-Muthalib, S. Subramaniam, A. Abdul-Aziz. 2012. Effects of various solvents on the extraction of antioxidant phenolics form the leaves, seeds, veins, and skin of *Tamarindus indica* L. *Food Chemistry*. 131(2012): 441-448.
- Rosenberg, N., O. Rosenberg, M. Soudry. 2012. Osteoblast in bone physiology- mini review. *Rambam Maimonides medical journal*. 3(2): e0013.
- Rroji, Merita., N. Spahia, M. Barbullushi, dan S. Seferi. 2018. The Bone and Mineral Disorder in Patient Undergoing Chronic Peritoneal Dialysis. *IntechOpen*.
- Ruipérez, F., J. I. Mujika, J.M. Ugalde, C. Exley, dan X. Lopez. 2012. Pro-oxidant activity of aluminum: promoting the fenton reaction by reducing Fe (III) to Fe (II). *Journal of Inorganic Biochemistry*. 117: 118–123.
- Rutkovsky, Arkady., K. O. StensiØ kken., I. J. Vaage. 2016. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Med Sci Monit Basic Res*. 22: 95-106.

- Sandesh. P., V. Velv., R. P. Singh. 2014. Antioxidant activities of tamarind (*Tamarindus Indica*) seed coat extracts using in vitro and in vivo models. *Journal of Food Science and Technology*. 51(9): 1965-1973.
- Santoso, B., R.S. Utomo, dan M.D. Wiyoga. 2016. Analisis Hubungan Senyawa Golongan Flavonoid Dari 24 Famili Tanaman Terhadap Aktivitas Penangkap Radikalnya. Bandung: Prosiding Seminar Nasional Kimia UNJANI-HKI
- Sengupta, P. 2013. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International Journal of Preventive Medicine*. 4(6): 624-630.
- Setiati, Siti., I. Alwi, A.W. Sudoyo, B. Stiyohadi B, A.F. Syam. 2014. *Buku ajar ilmu penyakit dalam* jilid III edisi VI. Jakarta: InternaPublishing (3425-3441).
- Silva, R. F., G.R.D.S. Sasso, E.Sasso C, M.J. Simões, P.S. Cerri. 2015. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*. 2015: 1-17.
- Snell, R. S. 2012. *Anatomi Klinis Berdasarkan Sistem*. Jakarta: EGC.
- Sugiyono. 2007. *Statistika Untuk Penelitian*. Bandung: Alfabet.
- Sundaram, M.S., M. Hemshekhar, M.S. Santosh, M. Paul, K. Sunitha, R.M.Thushara, S.K. NaveenKumar, S. Naveen, S. Devaraja, K.S. Rangappa, K. Kemaraju, K.S. Girish. 2015. Tamarind Seed (*Tamarindus indica*) Extract Ameliorates Adjuvant-Induced Arthritis via Regulating the Mediators of Cartilage/Bone Degeneration, Inflammation and Oxidative Stress. *Scientific reports*. 5(11117).
- Weinstein, Robert.S., P. Madhavaram. 2017. Endocrinology Metabolism Osteomalacia. <https://www.endocrinologyadvisor.com/home/decision-support-in-medicine/endocrinology-metabolism/osteomalacia-2/>. [Diakses pada 9 Desember 2019].
- Winarsi, Hery. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Xu, D.F., G.X. Qu., S.G. Yan., X.Z. Cai. 2018. Microbubble-Mediated Ultrasound Outweighs Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Osteogenesis and Neovascularization in a Rabbit Model of Steroid-Associated Osteonecrosis. *BioMed Research International*. 2018: 1-11.

Yang, L., D. Xian, X. Xiong, R. Lai, J. Song, J. Zhong. 2018. Proanthocyanidins against Oxidative Stress : From Molecular Mechanisms to Clinical Application. *Biomed Research International*.



LAMPIRAN

Lampiran A. Surat tugas proyek



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jl Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121
Email : fk@unej.ac.id Website : http://www.fk.unej.ac.id

SURAT TUGAS

Nomor : 256 /UN25.1.1/PT/2019

Dalam rangka pelaksanaan kegiatan Penelitian yang dilakukan oleh Dosen dan mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember, sebagaimana tersebut di bawah ini:

No.	Nama	NIP / NIM
1.	dr. Muhammad Ihwan Narwanto, M.Sc	198002182005011001
2.	Muhammad Iqbal Fauzi	162010101040
3.	Anang Dwi Atmoko	162010101077
4.	Indah Pratiwi	162010101127
5.	Nur A'mala Dewi	162010101128

Judul Penelitian : Efek Ekstrak Metanol Biji *Tamarindus indica* Untuk Pencegahan Terbentuknya *Senile Plaques*, *Neurofibrillary Tangles* dan Perbaikan Memori Kerja Spasial pada Tikus Model Alzheimer

Pelaksanaan : Desember 2018 – Februari 2019

Dengan ini menugaskan kepada dosen dan mahasiswa yang tercantum diatas untuk melaksanakan tugas penelitian tersebut secara penuh tanggung jawab.

Jember, 22 JAN 2019



Dr. Saiful Anwar, M.Kes., Ph.D., Sp.BA

NIP. 19730424 199903 1 002

Lampiran B. Keterangan persetujuan etik proyek penelitian

**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
KOMISI ETIK PENELITIAN**

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember
68121 – Email : fk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK
ETHICAL APPROVAL
Nomor : 4.151 /H25.1.11/KE/2017

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

EFEK EKSTRAK METANOL BIJI *Tamarindus indica* UNTUK PENCEGAHAN TERBENTUKNYA *SENILE PLAQUES, NEUROFIBRILLARY TANGLES* DAN PERBAIKAN MEMORI KERJA SPASIAL PADA TIKUS MODEL ALZHEIMER (KAJIAN ANTI INFLAMASI, ANTI EXCITOTOXICITY DAN ANTIOKSIDAN)

Nama Peneliti Utama : dr. M. Ihwan Narwanto, M.Sc
Name of the principal investigator

NIP : 198002182005011001



Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 16 Agustus 2017
Ketua Komisi Etik Penelitian


dr. Rini Priyanti, Sp.PK

Lampiran C. Surat keterangan identifikasi tumbuhan


LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
UPT BALAI KONSERVASI TUMBUHAN
KEBUN RAYA PURWODADI
 Jl. Raya Surabaya - Malang Km. 65 Purwodadi - Paturuan 67163
 Telp. (+62 343) 615033, Faks. (+62 341) 4266046
 website : <http://www.krpurwodadilipi.go.id>


SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TUMBUHAN
No: 0476/IPH.06/HM/VII/2017

Kepala Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi LIPI dengan ini menerangkan bahwa material tumbuhan yang dibawa oleh:

Nama	: Muhammad Ihsan Narwanto, dr., M.Sc.
NIM	: 157070100111007
Instansi	: Universitas Brawijaya Fakultas Kedokteran.
Tanggal material diterima	: 18 Juli 2017

Telah diidentifikasi/determinasi berdasarkan koleksi herbarium dan koleksi kebun serta referensi ilmiah, dengan hasil sebagai berikut:


Kingdom	: Plantae
Division	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Subclass	: Rosidae
Ordo	: Fabales
Family	: Caesalpinaceae
Genus	: Tamarindus
Species	: <i>Tamarindus indica</i> L.

Referensi:

1. Backer CA & Bakhuizen van den Brink RC. 1963. Flora of Java Vol. I. NVP Noordhoff, Groningen, The Netherlands. Hal. 529
2. E.W.M.Verheij dan R.E. Coronel, tahun 1992 editor PROSEA (Plants Resources of South-East Asia) No 2; Hal 298
3. Cronquist A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York, USA. Hal. XV

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 26 Juli 2017
An. Kepala
Pib. Kepala Seksi Eksplorasi dan Koleksi Tumbuhan


Bambang Walojo Sedjati SP.

Lampiran D. Keterangan persetujuan etik penelitian



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
KOMITE ETIK PENELITIAN
Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember
68121 – Email : fk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK
ETHICAL APPROVA
Nomor : L.375 /H25.1.11/KE/2020

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

EFEKTIVITAS PEMBERIAN EKSTRAK *Tamarindus indica* TERHADAP JUMLAH SEL OSTEOBLAST TULANG FEMUR TIKUS WISTAR JANTAN YANG DIINDUKSI ALUMINIUM

Nama Peneliti Utama : Indah Pratiwi.
Name of the principal investigator

NIM : 162010101127

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 23 Januari 2020
Ketua Komisi Etik Penelitian

dr. Rini Riyanti, Sp.PK



Tanggapan Anggota Komisi Etik

(Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya)

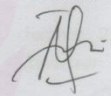
Review Proposal :

1. Pemilihan, perawatan, perlakuan, pengorbanan dan pemusnahan hewan coba mengacu pada buku pedoman etik penelitian kesehatan (penggunaan hewan coba dengan prinsip 3R: *Replacement, Reduce, Refinement*).
2. Harap diperhatikan kontrol kualitas pembuatan ekstrak *Tamarindus indica* agar didapatkan kadar yang diinginkan.
3. Harap diperhatikan kontrol kualitas pembuatan preparat histo PA tulang femur agar didapatkan sediaan yang memenuhi syarat pembacaan.
4. Pembacaan preparat dilakukan orang yang kompeten, minimal oleh 2 orang yang kompeten menggunakan metode blinding.
5. Mohon diperhatikan pembuangan limbah medis dan limbah B3 agar tidak mencemari lingkungan.

Mengetahui
Ketua Komisi Etik Penelitian


dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Jember, 20 Januari 2020
Reviewer


dr. Desie Dwi Wisudanti, M.Biomed

Tanggapan Anggota Komisi Etik

(Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya)

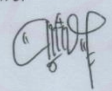
Review Proposal :

1. Mohon diperhatikan determinasi *Tamarindus indica* yang digunakan dalam penelitian.
2. Perlakuan terhadap hewan coba memegang prinsip 3R (*Replacement, Reduce, Refinement*).
3. Perhitungan jumlah osteoblast dilakukan oleh tenaga yang kompeten minimal dilakukan oleh 2 (dua) pemeriksa, dengan metode blindung.
4. Perlakuan dan pengambilan sampel tulang femur dilakukan oleh tenaga kompeten untuk mengurangi bias dalam penelitian dan mengurangi rasa nyeri pada hewan coba.
5. Mohon diperhatikan oleh peneliti, pembuangan limbah medis dan B3 agar tidak mencemari lingkungan.

Mengetahui
Ketua Komisi Etik Penelitian

dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Jember, 22 Januari 2020
Reviewer


dr. Ayu Munawaroh Aziz, M.Biomed

Lampiran E. Rekomendasi bebas plagiasi

 KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER -
FAKULTAS KEDOKTERAN
Alamat : Jalan Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto. Kotak Pos Jember 68121
Telp/Fax. (0331) 337877, 324446, *Faksimili (0331) 337877
E mail : fk@unej.ac.id/Laman//www.fk.unej.ac.id

SURAT REKOMENDASI BEBAS PLAGIASI

Nomor : **721** /UN25.1.11/PT/2020

Komisi Bimbingan KTI dan Publikasi, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya peningkatan kualitas dan originalitas karya tulis ilmiah mahasiswa berupa skripsi, telah melakukan pemeriksaan plagiasi atas skripsi mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember di bawah ini:

Nama : **Indah Pratiwi**
NIM. : 162010101127
Angkatan : 2016

Judul Skripsi : **Efektivitas Pemberian Ekstrak *Tamarindus Indica* terhadap Jumlah Sel Osteoblast Tulang Femur Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Aluminium**

Bersama ini kami merekomendasikan dan menyatakan “ **Bebas Plagiasi** “

Demikian surat rekomendasi ini, atas perhatian saudara kami mengucapkan terima kasih.

Mengetahui,
Wakil Dekan I


Dr. dr. Yunita Armiyanti, M.Kes
NIP. 19740604 200112 2 002

26 FEB 2020
Komisi Bimbingan KTI & Publikasi
Ketua,

Dr. dr. Yunita Armiyanti, M.Kes
NIP. 19740604 200112 2 002

Mengetahui,
Wakil Dekan I


Dr. dr. Yunita Armiyanti, M.Kes
NIP. 19740604 200112 2 002

Lampiran F. Tabel dosis pemberian larutan $AlCl_3$ dan ekstrak biji *Tamarindus indica*

a. Kelompok Kontrol (Aquabidest + Saline)

		K1	K2	K3	K4	K5
Minggu 1	BB (g)	200	196	218	207	198
	Vol (mL)	1	1	1	1	1
Minggu 2	BB (g)	191	195	204	192	179
	Vol (mL)	1	1	1	1	1
Minggu 3	BB (g)	196	189	212	199	189
	Vol (mL)	1	1	1	1	1
Minggu 4	BB (g)	200	196	218	207	198
	Vol (mL)	1	1	1	1	1
Minggu 5	BB (g)	194	196	204	205	195
	Vol (mL)	1	1	1	1	1
Minggu 6	BB (g)	218	238	212	206	198
	Vol (mL)	1	1	1	1	1
Minggu 7	BB (g)	210	232	205	214	202
	Vol (mL)	1	1	1	1	1
Minggu 8	BB (g)	217	240	215	196	217
	Vol (mL)	1	1	1	1	1
Minggu 9	BB (g)	210	216	208	204	208
	Vol (mL)	1	1	1	1	1
Minggu 10	BB (g)	216	212	217	199	216
	Vol (mL)	1	1	1	1	1

b. Kelompok P1 (Larutan $AlCl_3$ 300mg/kgBB)

		P1 (1)	P1 (2)	P1 (3)	P1 (4)	P1 (5)
Minggu 1	BB (g)	167	240	192	199	188
	Vol (mL)	1	1,4	1,2	1	1,1
Minggu 2	BB (g)	175	255	191	208	184
	Vol (mL)	1	1,5	1,1	1,2	1,1
Minggu 3	BB (g)	178	267	199	198	174
	Vol (mL)	1,1	1,6	1,2	1,1	1
Minggu 4	BB (g)	188	257	203	190	186
	Vol (mL)	1,1	1,5	1,2	1,1	1,1
Minggu 5	BB (g)	194	257	207	107	184
	Vol (mL)	1,2	1,5	1,2	1,2	1,1
Minggu 6	BB (g)	201	271	209	192	185
	Vol (mL)	1,2	1,6	1,3	1,2	1,1
Minggu 7	BB (g)	203	274	194	208	140
	Vol (mL)	1,2	1,6	1,2	1,2	0,8
	BB (g)	213	282	217	214	159

Minggu 8	Vol (mL)	1,3	1,7	1,3	1,3	1
Minggu 9	BB (g)	218	285	204	198	155
	Vol (mL)	1,3	1,7	1,2	1,2	0,9
Minggu 10	BB (g)	213	272	212	220	158
	Vol (mL)	1,3	1,6	1,3	1,3	0,9

c. Kelompok P2 (Larutan AlCl_3 300mg/kgBB + ekstrak *Tamarindus indica* 25mg/kgBB)

		P2 (1)	P2 (2)	P2 (3)	P2 (4)	P2 (5)
Minggu 1	BB (g)	216	202	208	225	198
	Vol AlCl_3	1,4	1,2	1,2	1,4	1,2
	Vol T.I	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Minggu 2	BB (g)	207	199	196	220	209
	Vol AlCl_3	1,2	1,2	1,2	1,3	1,2
	Vol T.I	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Minggu 3	BB (g)	193	178	204	245	192
	Vol AlCl_3	1,2	1,1	1,2	1,5	1,2
	Vol T.I	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Minggu 4	BB (g)	212	208	200	257	206
	Vol AlCl_3	1,2	1,2	1,2	1,5	1,2
	Vol T.I	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Minggu 5	BB (g)	202	194	212	261	198
	Vol AlCl_3	1,2	1,2	1,3	1,6	1,2
	Vol T.I	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Minggu 6	BB (g)	195	199	199	277	205
	Vol AlCl_3	1,2	1,2	1,2	1,7	1,2
	Vol T.I	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Minggu 7	BB (g)	219	207	220	280	180
	Vol AlCl_3	1,3	1,2	1,3	1,7	1,3
	Vol T.I	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Minggu 8	BB (g)	235	204	200	278	211
	Vol AlCl_3	1,4	1,2	1,2	1,7	1,3
	Vol T.I	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Minggu 9	BB (g)	228	212	208	284	217
	Vol AlCl_3	1,3	1,3	1,2	1,7	1,3
	Vol T.I	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Minggu 10	BB (g)	234	217	223	280	226
	Vol AlCl_3	1,4	1,3	1,3	1,7	1,4
	Vol T.I	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

d. Kelompok P3 (Larutan AlCl_3 300mg/kgBB + ekstrak *Tamarindus indica* 50mg/kgBB)

		P3 (1)	P3 (2)	P3 (3)	P3 (4)	P3 (5)
	BB (g)	195	193	211	183	182

Minggu 1	Vol AlCl ₃	1,2	1,2	1,3	1	1,3
	Vol T.I	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Minggu 2	BB (g)	188	170	205	195	201
	Vol AlCl ₃	1,1	1	1,2	1,2	1,2
	Vol T.I	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Minggu 3	BB (g)	172	168	224	194	211
	Vol AlCl ₃	1	1	1,3	1,2	1,3
	Vol T.I	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Minggu 4	BB (g)	178	175	218	206	207
	Vol AlCl ₃	1	1	1,3	1,2	1,2
	Vol T.I	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Minggu 5	BB (g)	157	195	230	205	207
	Vol AlCl ₃	0,9	1,2	1,4	1,2	1,2
	Vol T.I	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Minggu 6	BB (g)	185	196	222	205	203
	Vol AlCl ₃	1,1	1,2	1,3	1,2	1,2
	Vol T.I	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Minggu 7	BB (g)	183	201	222	205	215
	Vol AlCl ₃	1,1	1,2	1,3	1,2	1,3
	Vol T.I	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Minggu 8	BB (g)	171	208	254	217	221
	Vol AlCl ₃	1	1,2	1,5	1,3	1,3
	Vol T.I	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Minggu 9	BB (g)	186	207	222	219	218
	Vol AlCl ₃	1,1	1,2	1,3	1,3	1,3
	Vol T.I	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Minggu 10	BB (g)	197	186	213	219	216
	Vol AlCl ₃	1,2	1,1	1,3	1,3	1,3
	Vol T.I	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

e. Kelompok P4 (Larutan AlCl₃ 300mg/kgBB + ekstrak *Tamarindus indica* 100mg/kgBB)

		P4 (1)	P4 (2)	P4 (3)	P4 (4)	P4 (5)
Minggu 1	BB (g)	208	196	188	199	209
	Vol AlCl ₃	1,4	1,2	1,1	1,2	1,4
	Vol T.I	0,5	0,4	0,4	0,4	0,5
Minggu 2	BB (g)	196	200	191	202	205
	Vol AlCl ₃	1,2	1,2	1,1	1,2	1,2
	Vol T.I	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Minggu 3	BB (g)	202	203	191	189	200
	Vol AlCl ₃	1,2	1,2	1,1	1	1,2
	Vol T.I	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Minggu 4	BB (g)	199	217	188	200	217
	Vol AlCl ₃	1,2	1,3	1,1	1,2	1,3
	Vol T.I	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Minggu 5	BB (g)	202	179	200	203	209
	Vol AlCl ₃	1,2	1,1	1,2	1,2	1,3

	Vol T.I	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Minggu 6	BB (g)	213	178	206	218	216
	Vol AlCl ₃	1,3	1,1	1,2	1,3	1,3
	Vol T.I	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Minggu 7	BB (g)	230	188	205	234	227
	Vol AlCl ₃	1,4	1,1	1,2	1,4	1,4
	Vol T.I	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5
Minggu 8	BB (g)	242	198	203	241	233
	Vol AlCl ₃	1,5	1,2	1,2	1,4	1,4
	Vol T.I	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5
Minggu 9	BB (g)	249	232	211	241	241
	Vol AlCl ₃	1,5	1,4	1,3	1,4	1,4
	Vol T.I	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5
Minggu 10	BB (g)	244	228	199	241	241
	Vol AlCl ₃	1,5	1,4	1,2	1,4	1,4
	Vol T.I	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5

Lampiran G. Data pembacaan prepat

a. Pengamat 1

Kelompok	Lapang Pandang					Rata-Rata
	1	2	3	4	5	
K1	16	21	23	13	13	17,2
K2	21	13	20	18	16	17,6
K3	9	20	23	17	9	15,6
K4	17	14	11	15	11	13,6
K5	20	12	10	12	12	13,2
 						
P1 1	19	25	23	23	29	23,8
P1 2	14	15	30	23	15	19,4
P1 3	23	26	17	13	18	19,4
P1 4	23	16	17	15	14	17
P1 5	8	10	12	20	20	14
 						
P2 1	21	14	11	12	12	14
P2 2	21	21	26	17	17	20,4
P2 3	40	19	31	45	15	30
P2 4	11	10	11	22	8	12,4
P2 5	15	15	11	15	13	13,8
 						
P3 1	21	20	16	15	16	17,6
P3 2	24	15	17	18	15	17,8
P3 3	18	18	19	17	17	17,8
P3 4	17	22	16	17	16	17,6
P3 5	13	20	12	14	17	15,2
 						
P4 1	24	22	16	21	21	20,8
P4 2	16	11	14	10	10	12,2
P4 3	28	30	16	37	20	26,2
P4 4	13	12	11	15	13	12,8
P5 5	19	15	14	11	10	13,8

b. Pengamat 2

Kelompok	Lapang Pandang					Rata-Rata
	1	2	3	4	5	
K1	15	19	25	12	12	16,6
K2	20	13	20	15	17	17
K3	10	17	20	15	11	14,6
K4	18	15	13	15	11	14,4
K5	17	14	10	12	12	13
P1 1	18	25	21	25	31	24
P1 2	15	14	26	23	13	18,2
P1 3	23	27	18	15	18	20,2
P1 4	25	15	17	12	12	16,2
P1 5	8	10	12	22	20	14,4
P2 1	18	12	12	14	10	13,2
P2 2	21	18	25	18	15	19,4
P2 3	39	17	31	40	15	28,4
P2 4	12	9	11	20	9	12,2
P2 5	14	13	10	15	13	13
P3 1	22	20	18	13	16	17,8
P3 2	22	16	15	18	14	17
P3 3	19	18	19	17	15	17,6
P3 4	18	22	16	18	18	18,4
P3 5	13	20	11	15	18	15,4
P4 1	26	23	14	19	19	20,2
P4 2	14	14	14	10	12	12,8
P4 3	26	30	15	32	18	24,2
P4 4	12	11	11	14	14	12,4
P5 5	19	16	12	11	10	13,6

c. Pengamat 3

Kelompok	Lapang Pandang					Rata-Rata
	1	2	3	4	5	
K1	14	20	24	13	14	17
K2	18	10	20	16	17	16,2
K3	7	20	23	13	9	14,4
K4	17	19	12	15	12	15
K5	17	16	7	12	12	12,8
P1 1	19	25	23	24	28	23,4
P1 2	16	15	28	20	12	18,2
P1 3	20	24	20	14	17	19
P1 4	24	15	17	15	13	16,8
P1 5	9	9	12	18	18	13,2
P2 1	19	13	13	11	11	13,4
P2 2	21	21	27	20	18	21,4
P2 3	41	16	30	42	15	28,8
P2 4	12	9	11	23	8	12,6
P2 5	16	13	13	15	13	14
P3 1	22	19	16	15	16	17,6
P3 2	23	17	18	20	14	18,4
P3 3	15	18	18	17	17	17
P3 4	19	20	17	15	15	17,2
P3 5	13	20	12	12	16	14,6
P4 1	22	22	15	20	21	20
P4 2	15	12	14	10	10	12,2
P4 3	29	27	18	28	22	24,8
P4 4	11	13	12	13	10	11,8
P5 5	19	15	12	12	9	13,4

Lampiran H. Analisis statistik

a. Normalitas

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Kelompok	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Osteoblas	Kontrol	.243	5	.200*	.897	5	.396
	Perlakuan 1	.186	5	.200*	.986	5	.965
	Perlakuan 2	.324	5	.093	.816	5	.109
	Perlakuan 3	.413	5	.005	.626	5	.001
	Perlakuan 4	.309	5	.133	.826	5	.130

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

b. Homogenitas

		Test of Homogeneity of Variances			
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Osteoblas	Based on Mean	4.965	4	20	.006
	Based on Median	1.041	4	20	.411
	Based on Median and with adjusted df	1.041	4	8.929	.438
	Based on trimmed mean	4.535	4	20	.009

c. Kruskal wallis

		Ranks	
	Kelompok	N	Mean Rank
Osteoblas	Kontrol	5	10.00
	Perlakuan 1	5	16.40
	Perlakuan 2	5	12.20
	Perlakuan 3	5	15.40
	Perlakuan 4	5	11.00
	Total		25

Test Statistics^{a,b}

Osteoblas	
Kruskal-Wallis H	2.861
df	4
Asymp. Sig.	.581

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

d. Mann whitney

1) K dan P1

Ranks				
	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
osteoblas	Kontrol	5	4.20	21.00
	Perlakuan 1	5	6.80	34.00
	Total	10		

Test Statistics^a

osteoblas	
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-1.362
Asymp. Sig. (2-tailed)	.173
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.222 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

2) K dan P2

Ranks				
	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
osteoblas	Kontrol	5	5.60	28.00
	Perlakuan 2	5	5.40	27.00
	Total	10		

Test Statistics^a

osteoblas	
Mann-Whitney U	12.000
Wilcoxon W	27.000
Z	-.105
Asymp. Sig. (2-tailed)	.917
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

3) K dan P3

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
osteoblas	Kontrol	5	3.40	17.00
	Perlakuan 3	5	7.60	38.00
	Total	10		

Test Statistics^a

osteoblas	
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	17.000
Z	-2.200
Asymp. Sig. (2-tailed)	.028
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

4) K dan P4

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
osteoblas	Kontrol	5	5.80	29.00
	Perlakuan 4	5	5.20	26.00
	Total	10		

Test Statistics^a

osteoblas	
Mann-Whitney U	11.000
Wilcoxon W	26.000
Z	-.314
Asymp. Sig. (2-tailed)	.753
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.841 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

5) P1 dan P2

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
osteoblas	Perlakuan 1	5	6.20	31.00
	Perlakuan 2	5	4.80	24.00
	Total	10		

Test Statistics^a

osteoblas	
Mann-Whitney U	9.000
Wilcoxon W	24.000
Z	-.731
Asymp. Sig. (2-tailed)	.465
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.548 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

6) P1 dan P3

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
osteoblas	Perlakuan 1	5	6.20	31.00
	Perlakuan 3	5	4.80	24.00
	Total	10		

Test Statistics^a

osteoblas	
Mann-Whitney U	9.000
Wilcoxon W	24.000
Z	-.731
Asymp. Sig. (2-tailed)	.465
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.548 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

7) P1 dan P4

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
osteoblas	Perlakuan 1	5	6.20	31.00
	Perlakuan 4	5	4.80	24.00
	Total	10		

Test Statistics^a

osteoblas	
Mann-Whitney U	9.000
Wilcoxon W	24.000
Z	-.731
Asymp. Sig. (2-tailed)	.465
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.548 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

8) P2 dan P3

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
osteoblas	Perlakuan 2	5	5.00	25.00
	Perlakuan 3	5	6.00	30.00
	Total	10		

Test Statistics^a

osteoblas	
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	25.000
Z	-.522
Asymp. Sig. (2-tailed)	.602
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.690 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

9) P2 dan P4

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
osteoblas	Perlakuan 2	5	6.00	30.00
	Perlakuan 4	5	5.00	25.00
	Total	10		

Test Statistics^a

osteoblas	
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	25.000
Z	-.525
Asymp. Sig. (2-tailed)	.599
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.690 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

10) P3 dan P4

Ranks

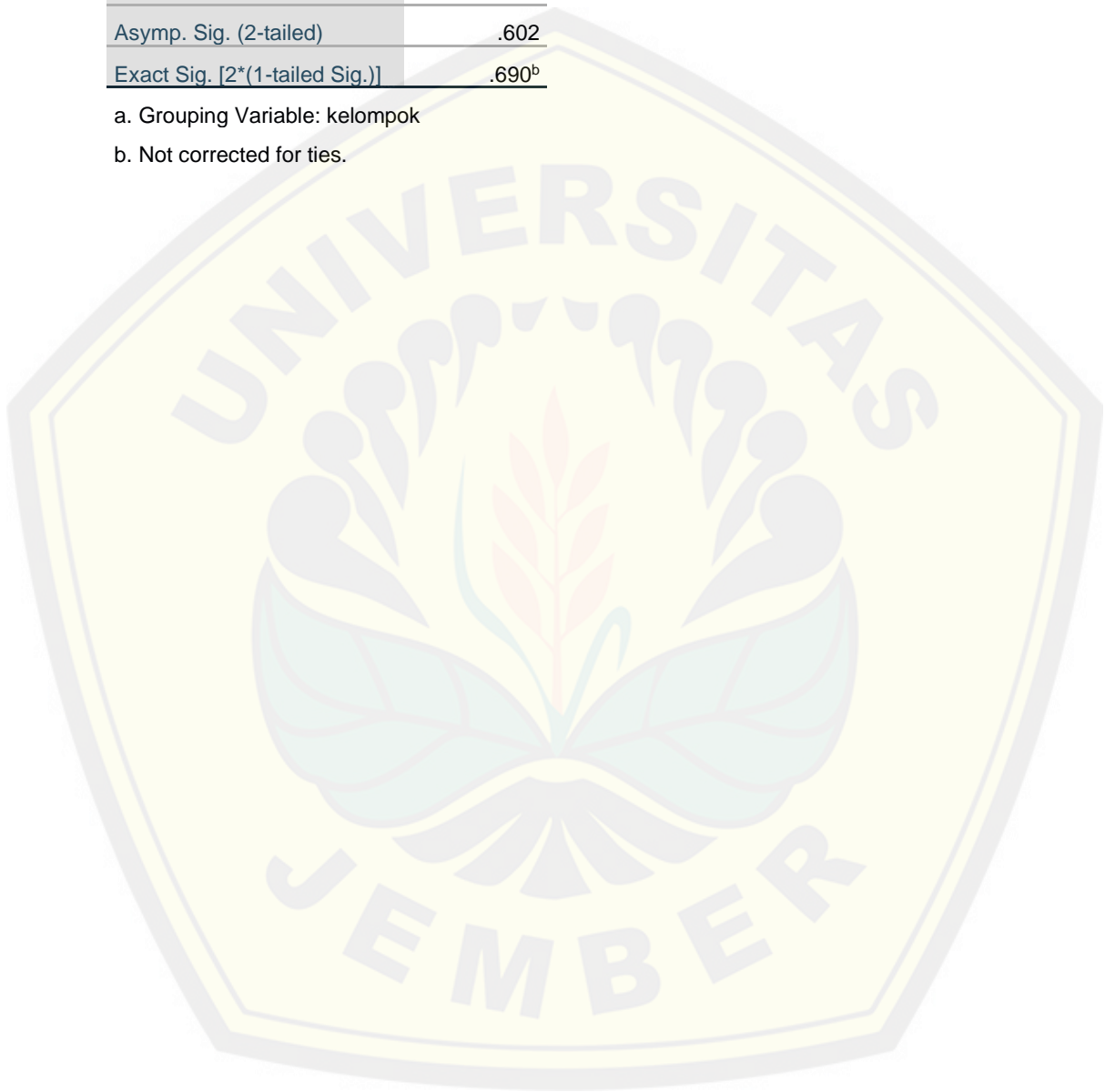
	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
osteoblas	Perlakuan 3	5	6.00	30.00
	Perlakuan 4	5	5.00	25.00
	Total	10		

Test Statistics^a

	osteoblas
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	25.000
Z	-.522
Asymp. Sig. (2-tailed)	.602
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.690 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

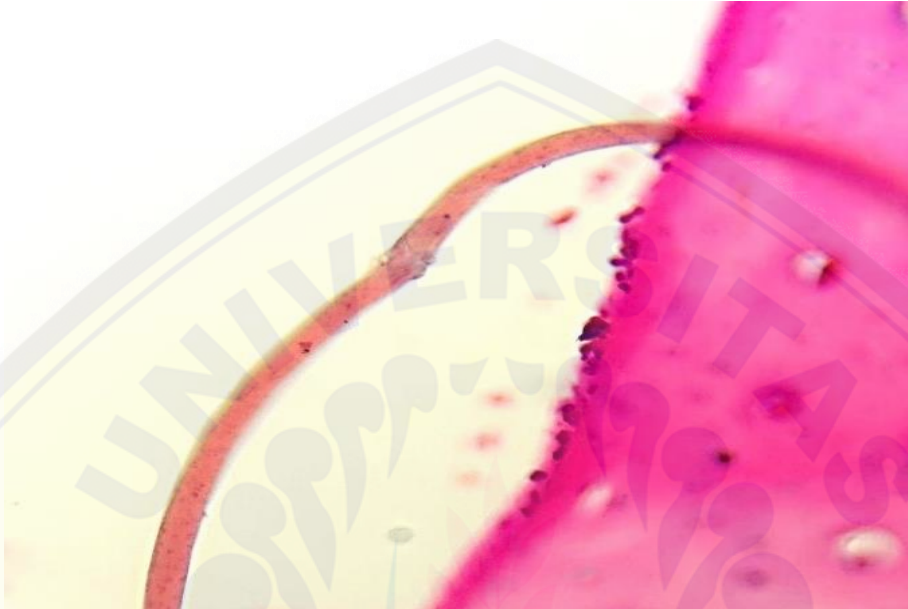
b. Not corrected for ties.



Lampiran I. Gambar mikroskopis sel osteoblas

a. Kelompok kontrol (Aquabidest + Saline)

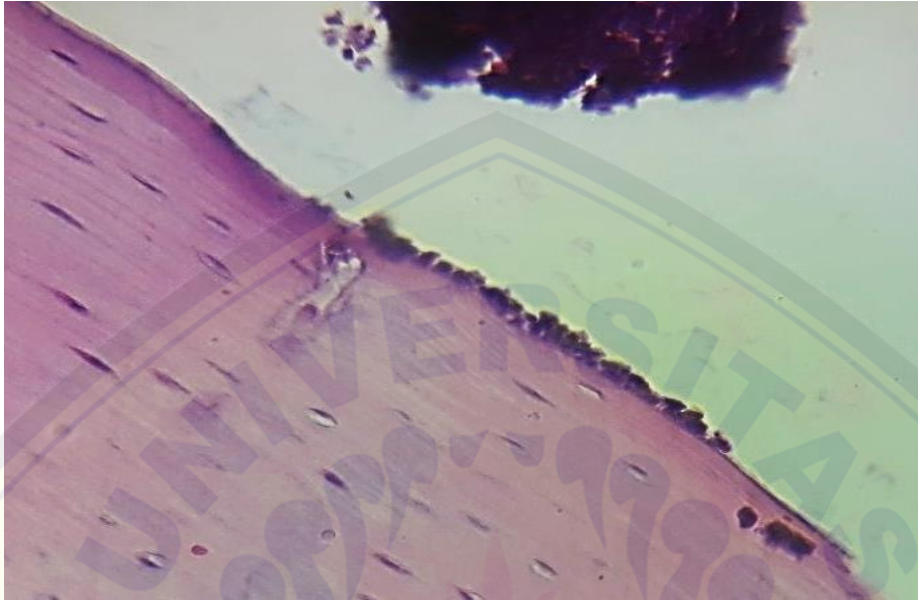
K1



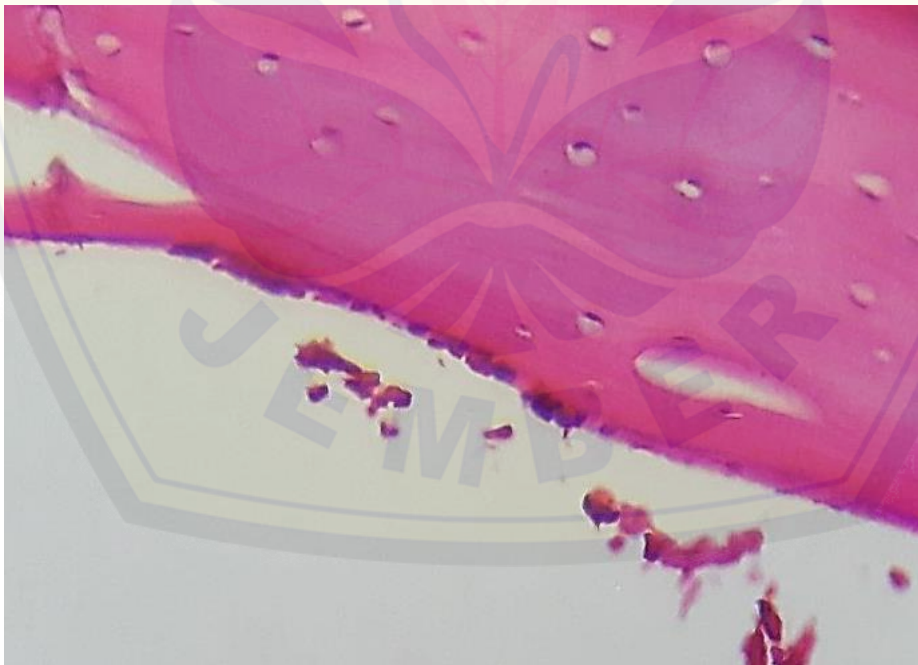
K2



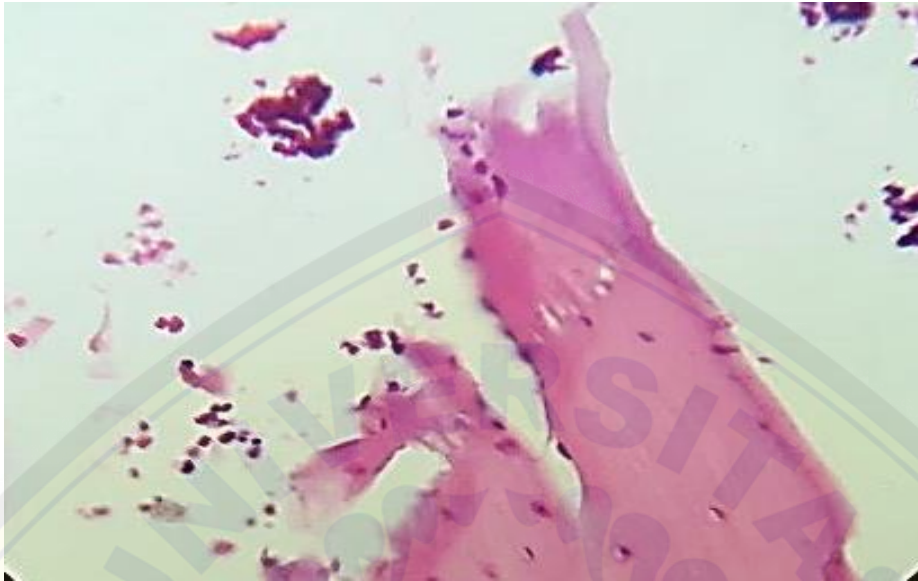
K3



K4

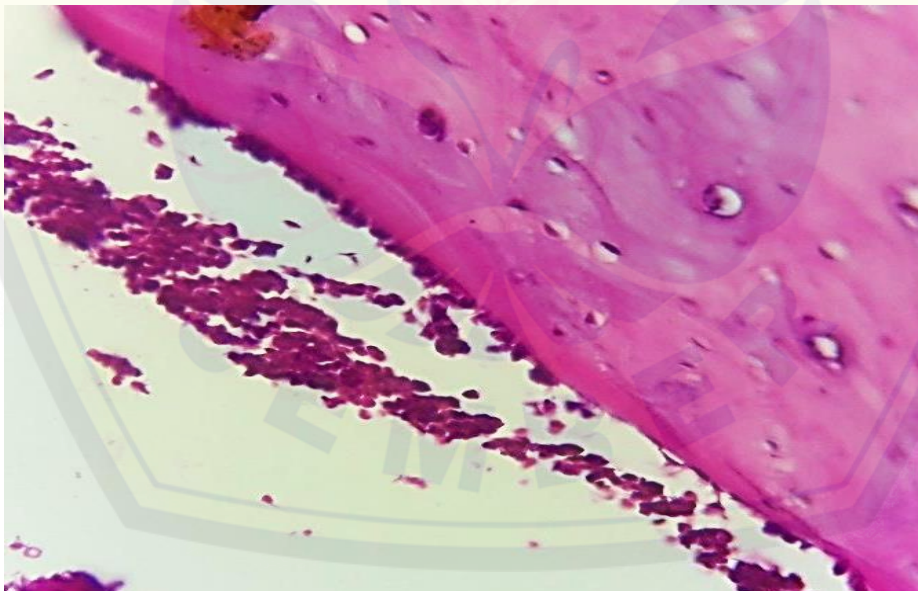


K5

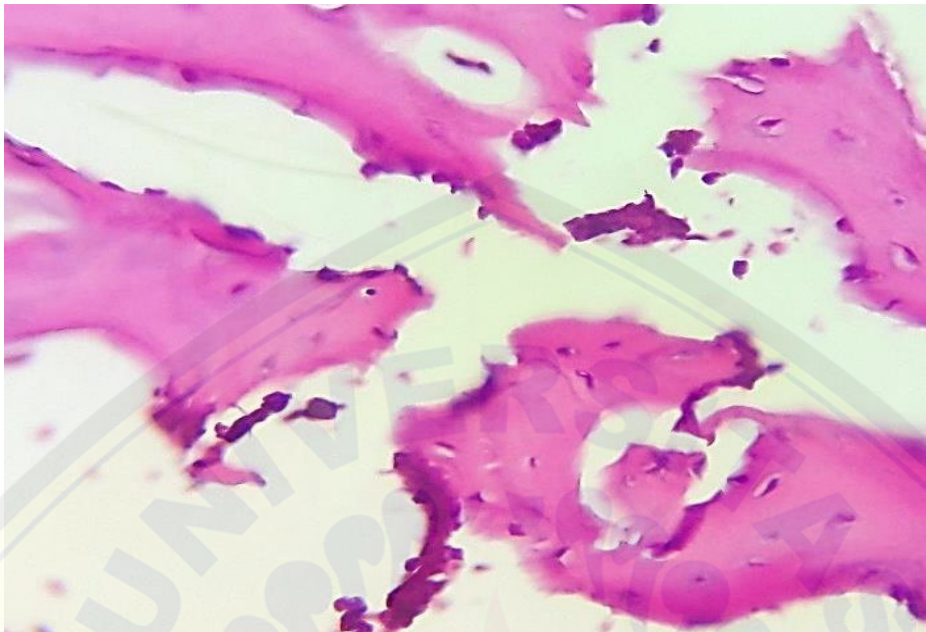


b. Kelompok P1 (Larutan $AlCl_3$ 300mg/kgBB)

P1 (1)



P1 (2)



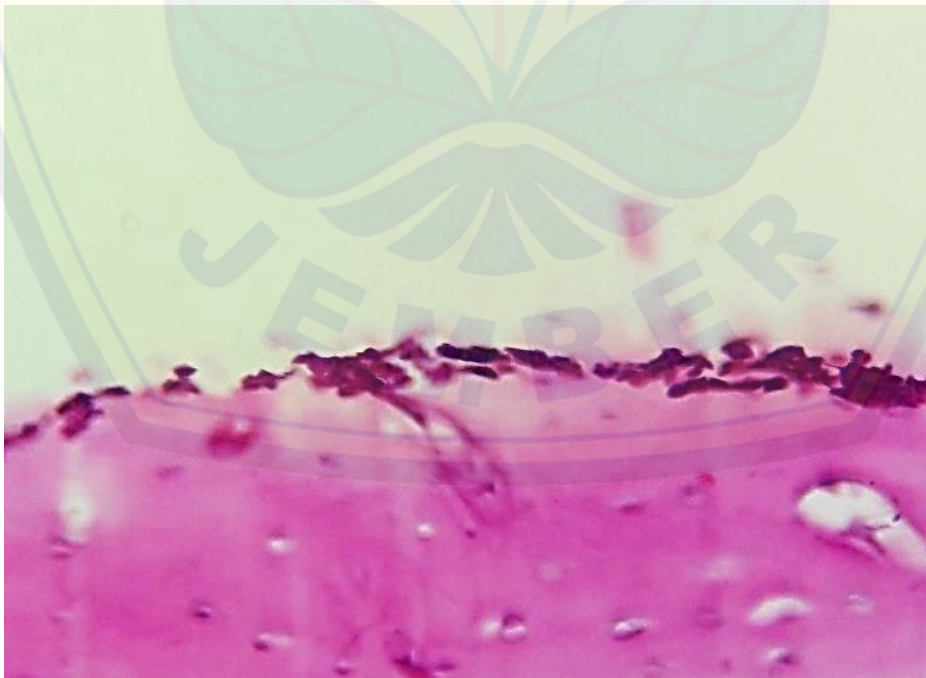
P1(3)



P1 (4)

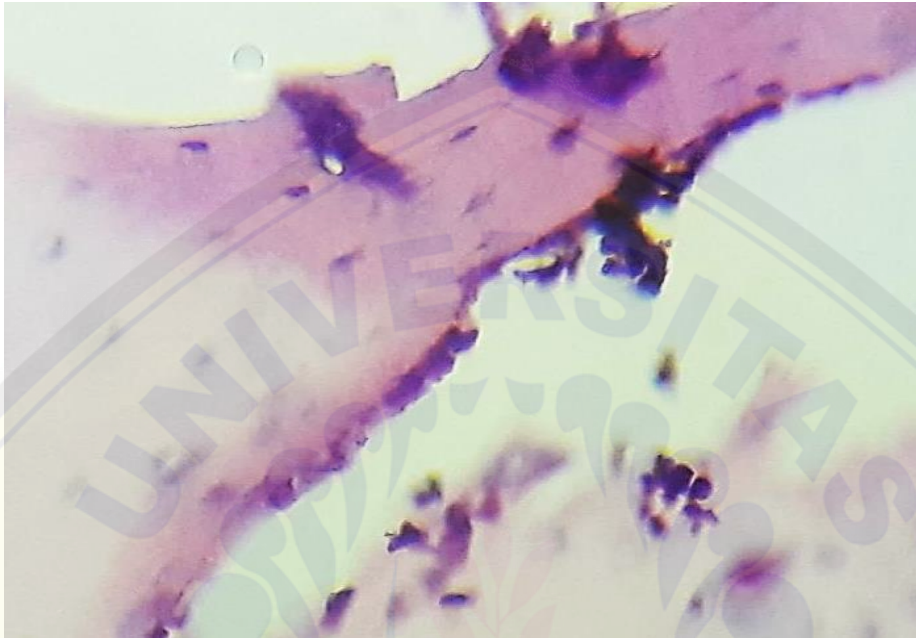


P1 (5)

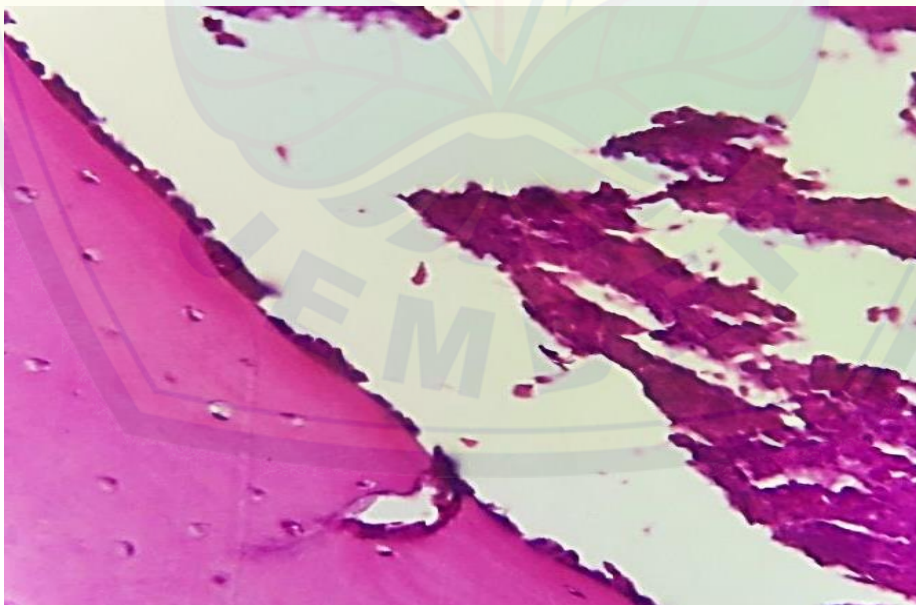


c. **Kelompok P2 (Larutan $AlCl_3$ 300mg/kgBB + ekstrak *Tamarindus indica* 25mg/kgBB)**

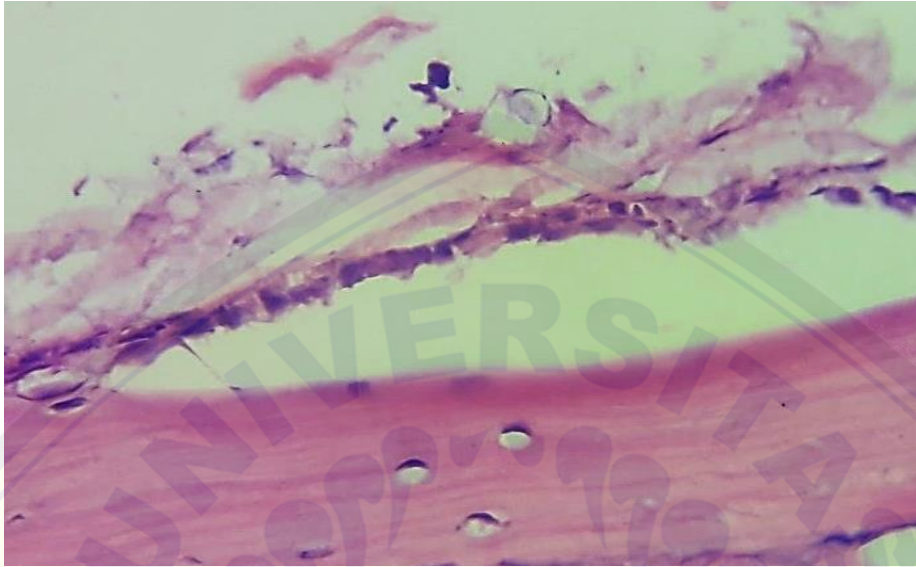
P2 (1)



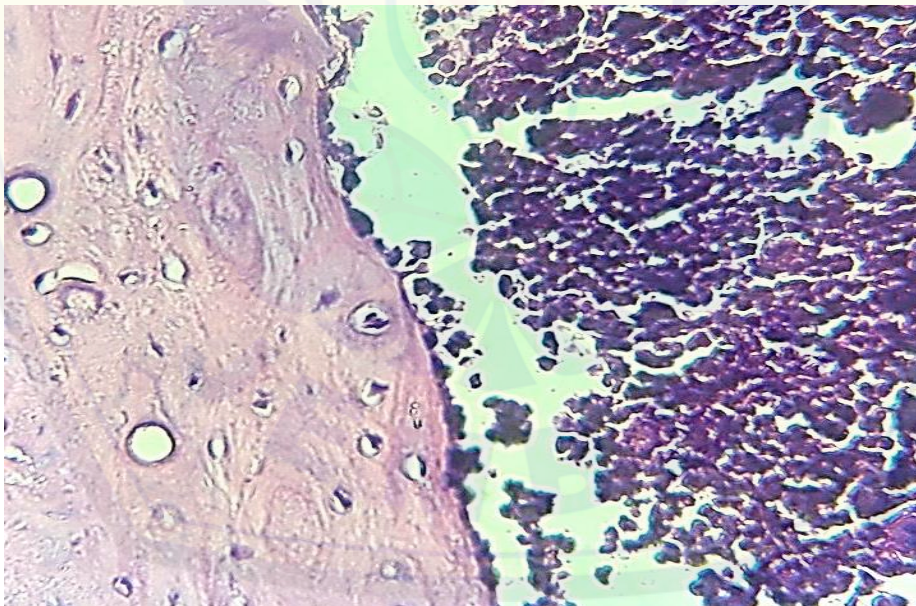
P2 (2)



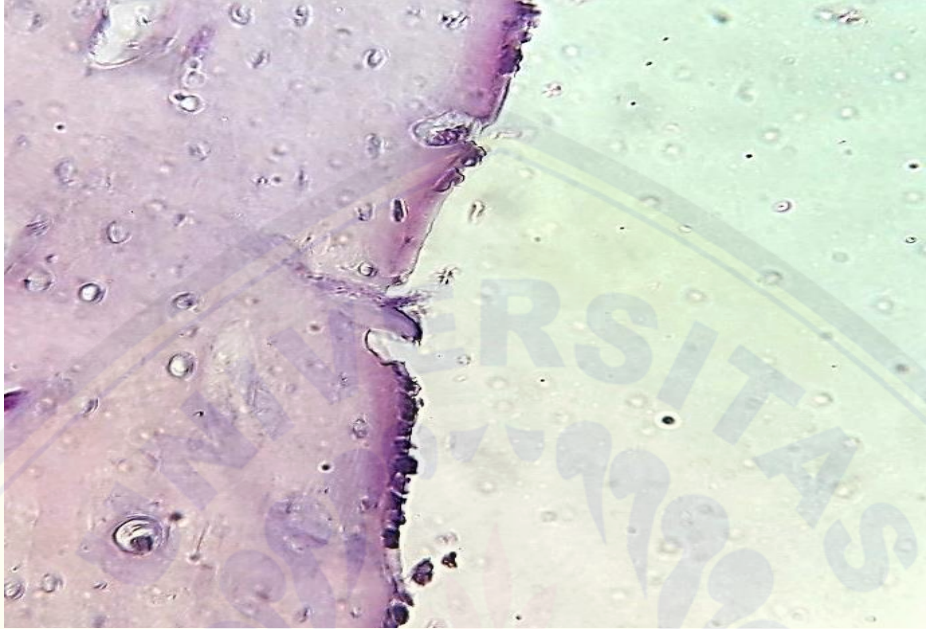
P2(3)



P2 (4)

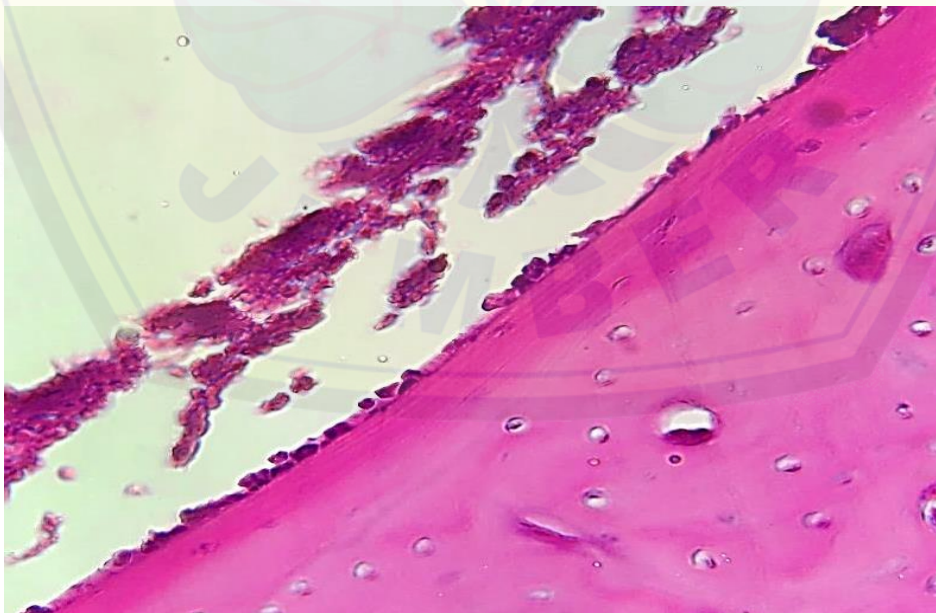


P2 (5)

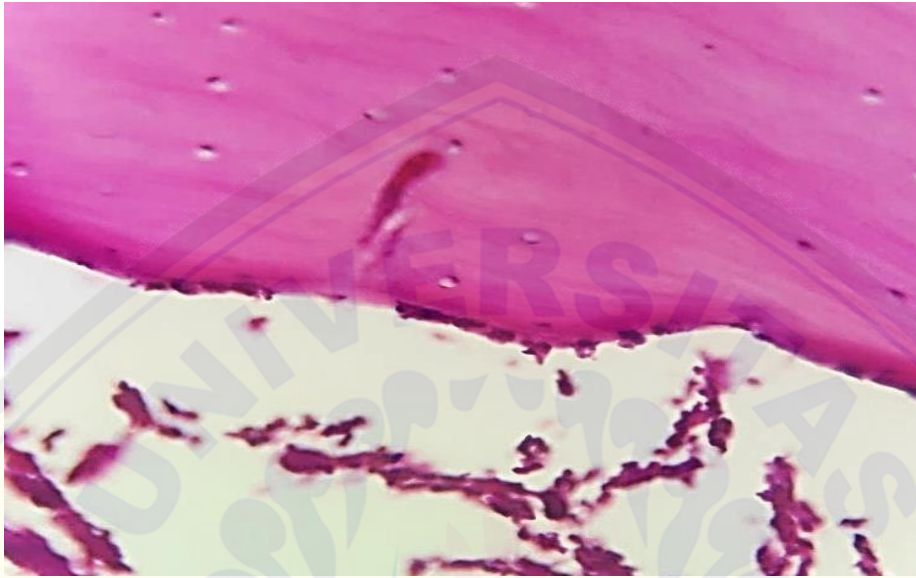


d. **Kelompok P3 (Larutan $AlCl_3$ 300mg/kgBB + ekstrak *Tamarindus indica* 50mg/kgBB)**

P3 (1)



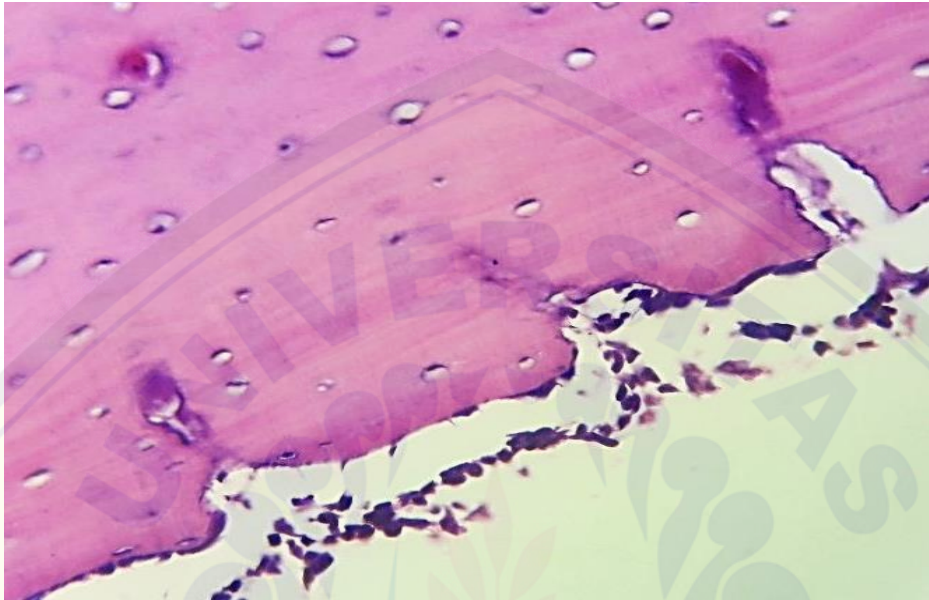
P3 (2)



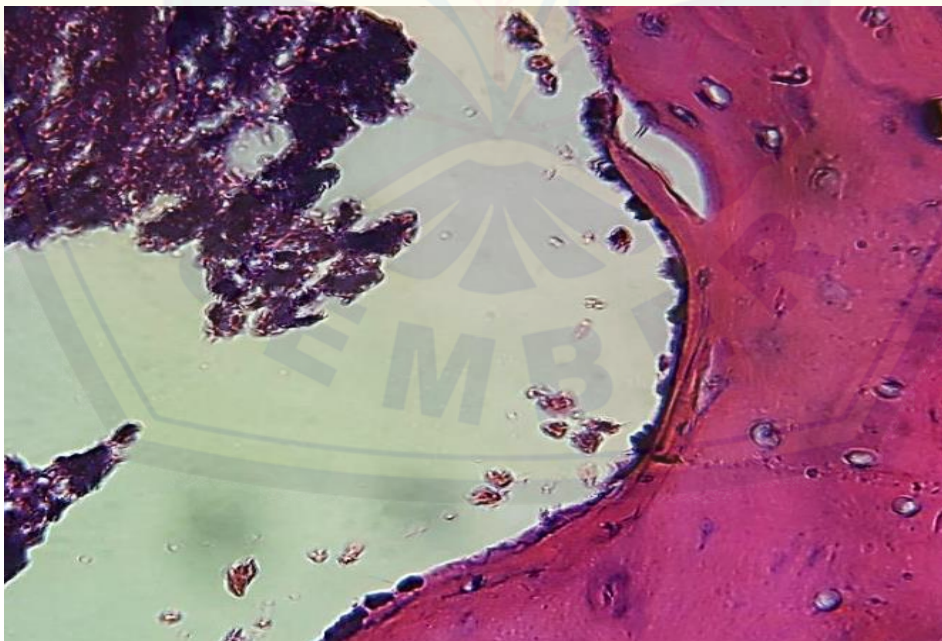
P3 (3)



P3 (4)

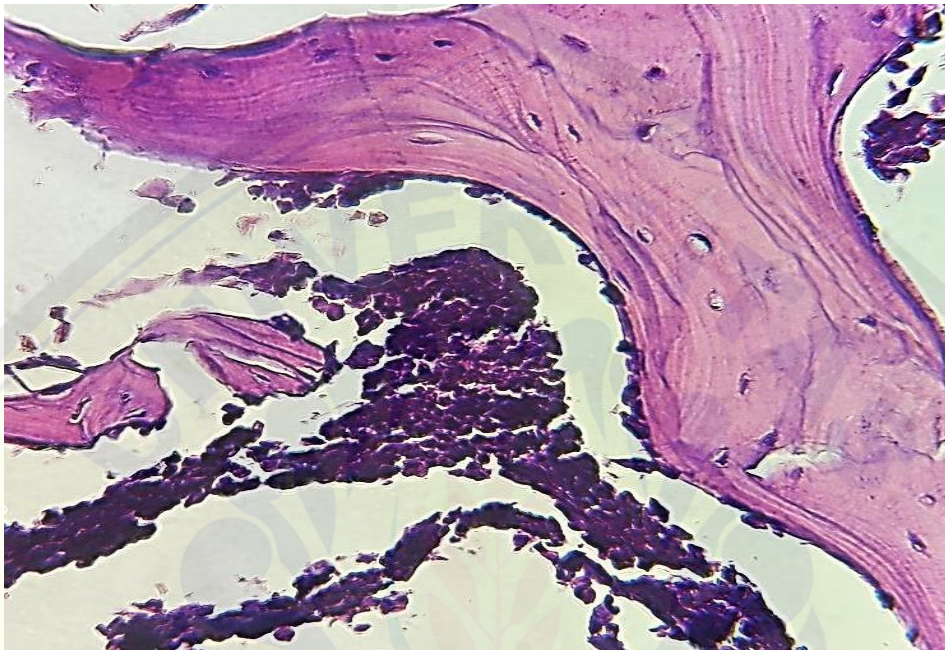


P3 (5)

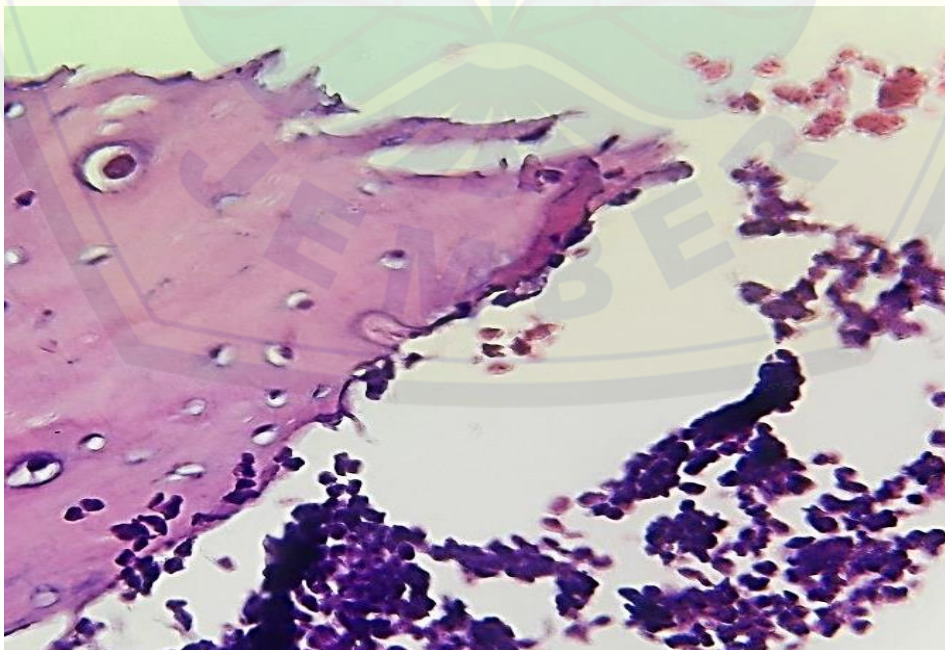


- e. **Kelompok P4 (Larutan $AlCl_3$ 300mg/kgBB + ekstrak *Tamarindus indica* 100mg/kgBB)**

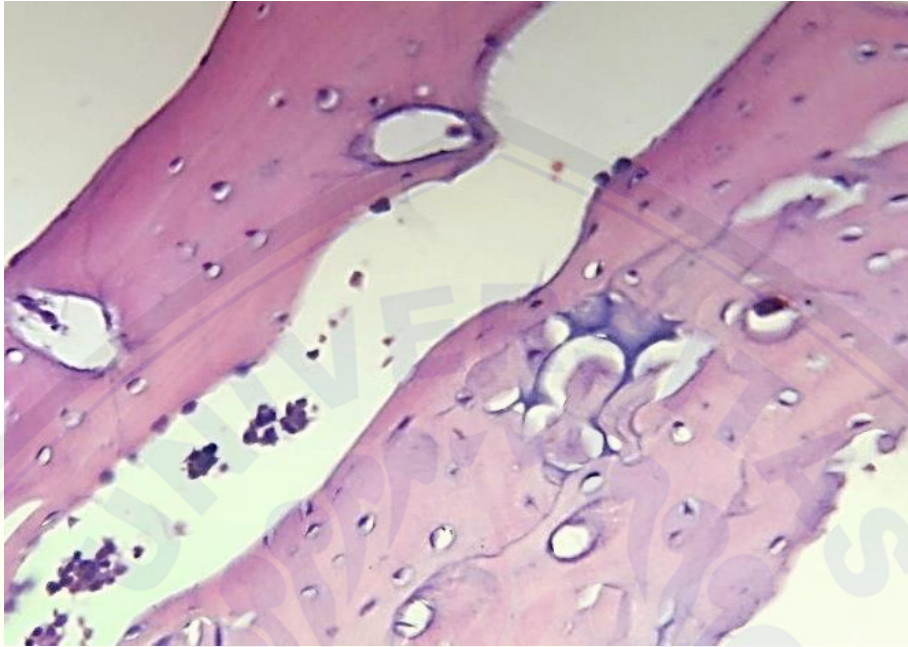
P4 (1)



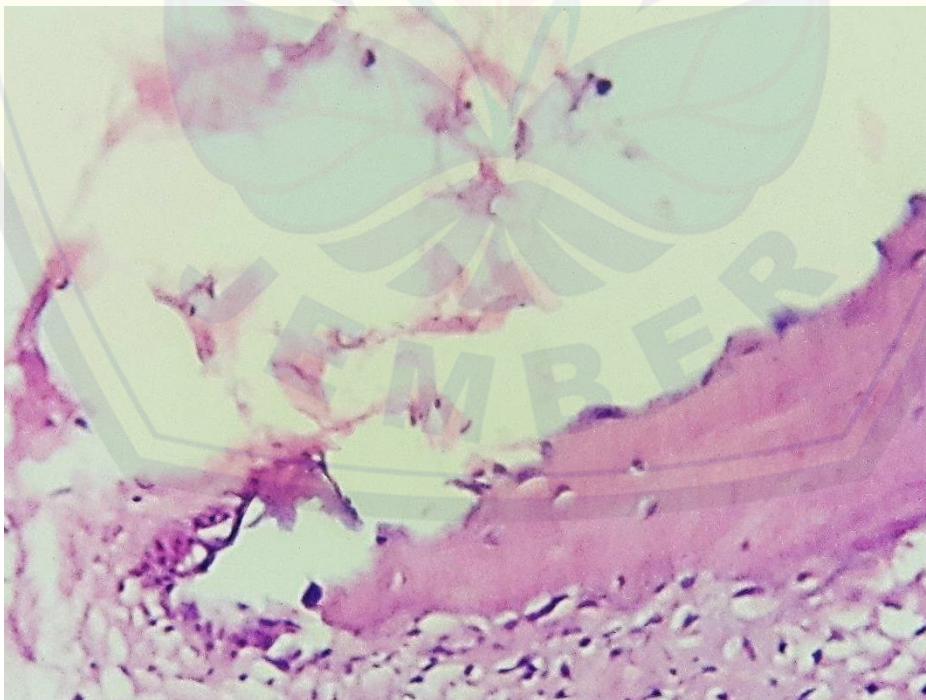
P4 (2)



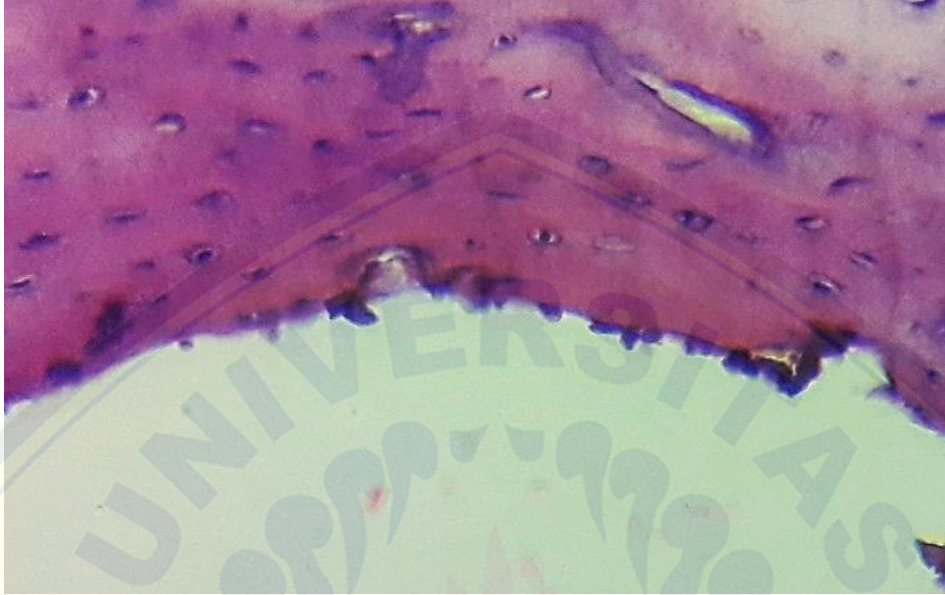
P4 (3)



P4 (4)



P4 (5)



Lampiran J. Dokumentasi penelitian



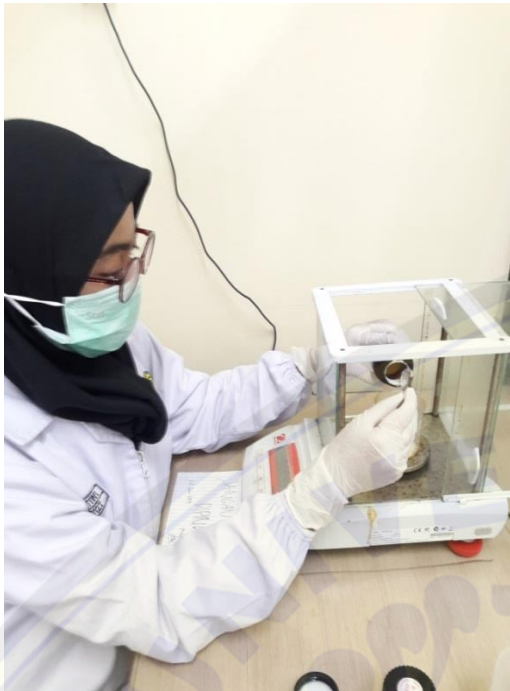
Pengeringan biji asam jawa



Penghancuran biji asam jawa



Pengekstrakan biji asam jawa



Penimbangan bubuk AlCl_3



Pencampuran AlCl_3 dan aquabidest



Pemeliharaan tikus



Penimbangan tikus



Penyondean tikus



Terminasi tikus



Pengamatan preparat

