



**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK KEDELAI HITAM
(*Glycine soja*) TERHADAP DENSITAS TULANG FEMUR
MENCIT (*Mus musculus* L.) PASCA OVARIEKTOMI**

SKRIPSI

Oleh:
Resa Miftahatu Yuniar
NIM 151810401064

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK KEDELAI HITAM
(*Glycine soja*) TERHADAP DENSITAS TULANG FEMUR
MENCIT (*Mus musculus* L.) PASCA OVARIEKTOMI**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh:
Resa Miftahatu Yuniar
NIM 151810401064

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada:

1. Ayahanda Arief Sugito dan Ibunda Siti Mairo'ah yang telah merawat, menjaga dan memberikan segalanya untuk saya, baik berupa dukungan moral, material, do'a, serta kasih sayang yang tiada hentinya kepada saya;
2. Kakak saya Dini Lutfiatul Himmah dan Kedua adik saya Zanuba Hilla Qudrotu Chofsoh, Alifiani Aulia Dyah Permatasari yang selalu memberikan motivasi dan doa kepada saya;
3. Bapak ibu guru TK Baiturrohimi, MI Tarbiyatul Huda, SMPN 1 Jenggawah dan MAN 1 Jember yang telah memberikan ilmu serta bimbingannya dengan penuh kesabaran;
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTTO

“Barangsiapa bertawakkal pada Allah, maka Allah akan memberikan kecukupan padanya, sesungguhnya Allah lah yang akan melaksanakan urusan (yang dikehendaki)-Nya.”
(QS. Ath-Thalaq: 3)

"Sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan, sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan."
(QS. Al-Insyirah: 5-6)

*) Departemen Agama. 1974. Al Qur'an dan Terjemahannya. Jakarta: PT. Bumi Restu

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Resa Miftahatu Yuniar

NIM : 151810401064

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efek Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam (*Glycine soja*) Terhadap Densitas Tulang Femur Mencit (*Mus Musculus L.*) Pasca Ovariektomi” adalah benar-benar hasil karya sendiri dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini didanai oleh Dra. Mahriani, M.Si dan dengan sumber dana mandiri serta hasil penelitian tidak dapat dipublikasikan tanpa ijin dari pihak yang mendanai. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 31 Mei 2019

Yang Menyatakan

Resa Miftahatu Yuniar

NIM 151810401064

SKRIPSI

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK KEDELAI HITAM
(*Glycine soja*) TERHADAP DENSITAS TULANG FEMUR
MENCIT (*Mus musculus* L.) PASCA OVARIEKTOMI**

Oleh:

Resa Miftahatu Yuniar

NIM 151810401064

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dra. Mahriani, M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Hidayat Teguh W., M.Pd

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam (*Glycine soja*) Terhadap Densitas Tulang Femur Mencit (*Mus Musculus L.*) Pasca Ovariektomi” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tim Penguji,

Ketua,

Anggota I,

Dra. Mahriani, M.Si

Dr. Hidayat Teguh W., M.Pd

NIP 195703151987022001

NIP 195805281988021002

Anggota II,

Anggota III,

Eva Tyas Utami, S.Si., M.Si

Dr. Rike Oktarianti, M. Si

NIP 197306012000032001

NIP 196310261990022001

Mengesahkan

Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D

NIP 196102041987111001

RINGKASAN

Efek Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam (*Glycine soja*) Terhadap Densitas Tulang Femur Mencit (*Mus Musculus L.*) Pasca Ovariectomi; Resa Miftahatu Yuniar; 151810401064; 2019; 35 Halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Ovariectomi merupakan tindakan pengangkatan ovarium yang dapat menyebabkan penurunan kadar hormon estrogen atau defisiensi estrogen yang berpengaruh terhadap resorpsi tulang dan densitas tulang. Kedelai hitam merupakan tumbuhan *leguminosae* yang berperan sebagai sumber fitoestrogen karena isoflavon yang terkandung dalam kedelai hitam memiliki struktur yang mirip dengan estrogen endogen. Kemiripan struktur antara isoflavon dengan estrogen menyebabkan isoflavon dapat berikatan pada reseptor beta pada osteoblas, sehingga dapat memicu terjadinya proliferasi osteoblas. Osteoblas kemudian akan melanjutkan proses *remodelling* untuk memperbaiki bagian yang sudah di resorpsi oleh osteoklas, sehingga dapat meningkatkan ketebalan pada tulang trabekula dan berpengaruh terhadap peningkatan densitas tulang,

Penelitian dilakukan di laboratorium Zoologi dan Botani Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember serta di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Metode yang digunakan adalah metode eksperimental murni menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap). Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis pemberian ekstrak tepung kedelai hitam. Variabel terikatnya densitas tulang femur mencit yang diovariectomi secara unilateral. Pada penelitian ini digunakan 20 ekor mencit (*Mus musculus L.*) strain Balb/C umur 90 hari. Hewan uji dibagi dalam empat kelompok, masing-masing menggunakan lima ulangan, dengan pembagian sebagai berikut: kontrol negatif (mencit tidak diovariectomi unilateral dan tidak diberi ekstrak tepung kedelai hitam), kontrol positif (mencit diovariectomi, tidak diberi ekstrak tepung kedelai hitam), Dosis 1 (mencit diovariectomi unilateral, diberi ekstrak tepung kedelai hitam 0,31 g/ml/hari), Dosis 2 (mencit diovariectomi unilateral dan diberi ekstrak tepung kedelai hitam 0,63 g/ml/hari). Perlakuan

dimulai pada bulan ke-5 pasca ovariectomi unilateral. Pemberian ekstrak tepung kedelai hitam diberikan secara oral menggunakan jarum sonde lambung selama 20 hari. Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah densitas tulang femur mencit. Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa pemberian ekstrak tepung kedelai hitam dengan dosis 0,31 g/ml/hari selama 20 hari pada mencit ovariectomi unilateral dapat meningkatkan densitas tulang.



PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah S.W.T yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi, yang berjudul: "Efek Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam (*Glycine soja*) Terhadap Densitas Tulang Femur Mencit (*Mus Musculus L.*) Pasca Ovariektomi". Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

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

1. Dra. Mahriani, M.Si. dan Dr. Hidayat Teguh W, M.Pd. selaku Dosen Pembimbing yang telah sabar meluangkan waktu dan pikirannya untuk memberikan pengarahan, bimbingan, dan motivasi hingga terselesaikannya skripsi ini;
2. Eva Tyas Utami, S.Si.,M.Si. dan Dr. Rike Oktarianti, M. Si. selaku dosen penguji yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, kritik dan saran guna terselesaikannya skripsi ini dengan baik;
3. Dra. Mahriani, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang sejak mahasiswa baru hingga terselesaikannya skripsi ini mendampingi dan mengarahkan saya;
4. Djoko Legowo, drh., M.Kes dan Jumawan S. Sos yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing saya selama melakukan penelitian di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga;
5. Ir. Efie Fadjriyah E.D, M.ST., selaku Teknisi Laboratorium Zoologi yang telah banyak meluangkan waktunya untuk membantu demi kelancaran selama penulis melakukan penelitian;
6. Mas Agus selaku Teknisi Fakultas Kedokteran Gigi yang telah meluangkan waktunya untuk membantu demi kelancaran selama penulis melakukan penelitian;

7. Seluruh dosen pengajar, staff akademik, teknisi, satpam fakultas yang telah mendukung dan membantu dalam masa perkuliahan hingga terselesaikannya skripsi ini;
8. rekan-rekan kerja selama penelitian Isna Kurotul Akyun, Reno Astin Andriyani, Hilda Aunillah dan Rilla Nofita Putri terima kasih atas kerjasamanya, kalian partner kerja sekaligus keluarga baru yang tidak akan pernah tergantikan;
9. teman-teman laboratorium zoologi Mbak Yeni, Mbak Lidia, Fara Difka Afdilla dan Zilfi Dita Fitriyani terimakasih atas dukungan dan motivasinya;
10. teman-teman lemburku Moch. Aditya Nugraha, Asfira Imada Firdausi dan Fajar Maulana terimakasih atas segala motivasi, doa dan bantuannya selama ini;
11. sahabat-sahabatku Frisma Eri Saputri, Ulfi Risqillah, dan Ayu Dwi Wulandari terimakasih atas semangat dan dukungannya selama ini;
12. teman-teman dari masa putih abu-abu Makpi, Nalled, Tete, Mbak Jub dan Wafda terimakasih atas segala dukungannya selama ini;
13. saudara seperjuangan BIOGENES15 terimakasih atas semangat dan kenangannya hingga sampai pada akhir masa perkuliahan.
14. teman-teman pengurus LPMM ALPHA periode 2017 dan periode 2018 terimakasih atas semangat, doa dan bantuannya.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi yang memerlukannya.

Jember, 31 Mei 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Batasan Masalah	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Struktur Tulang Femur dan Densitas Tulang	4
2.2 Dampak Defisiensi Estrogen Terhadap Densitas Tulang.....	6
2.3 Potensi Kedelai Hitam Dalam Meningkatkan Densitas Tulang.....	9
2.5 Hipotesis	11
BAB 3. METODE PENELITIAN	12
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	12

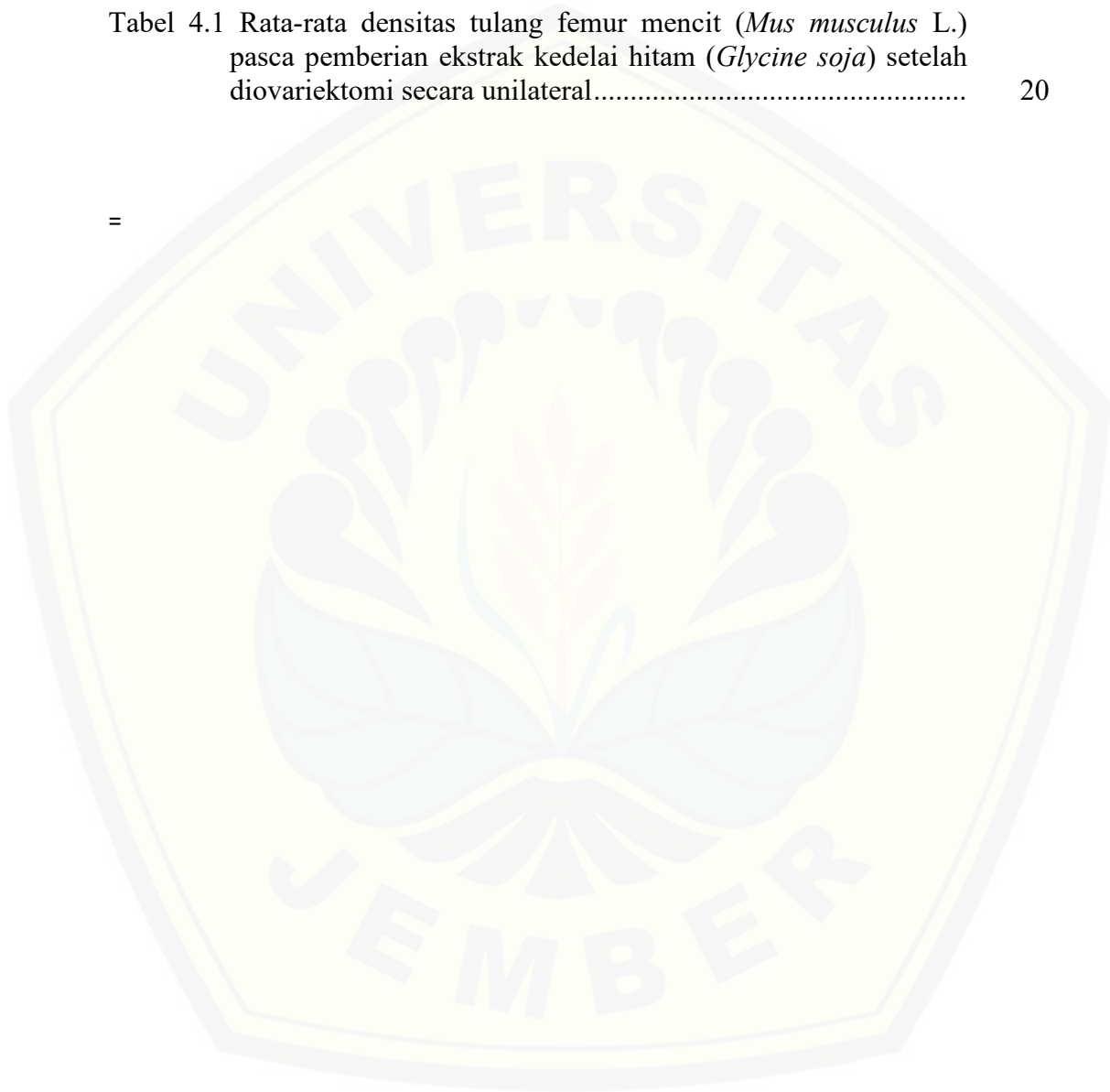
3.2 Alat	12
3.3 Bahan	12
3.4 Rancangan Penelitian	13
3.5 Alur Penelitian	14
3.6 Tahapan Penelitian	15
3.7 Pengukuran Densitas Tulang	19
3.8 Analisis Data	19
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	20
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	25
5.1 Kesimpulan	25
5.2 Saran	25
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN	33

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 4.1 Rata-rata densitas tulang femur mencit (<i>Mus musculus</i> L.) pasca pemberian ekstrak kedelai hitam (<i>Glycine soja</i>) setelah diovariectomi secara unilateral.....	20
---	----

=



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur anatomi tulang femur.....	4
Gambar 2.2 Struktur Histologi Tulang Trabekula.....	5
Gambar 2.3 Peranan Estrogen Dalam Menentukan Densitas Tulang.....	7
Gambar 2.4 Struktur Kimia Isoflavon.....	10
Gambar 2.5 Struktur kimia estradiol dan genistein.....	11
Gambar 3.1 Alur penelitian	14
Gambar 4.1 Densitas Tulang Femur Mencit.....	24

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ovariektomi merupakan tindakan pengangkatan ovarium yang dapat dibedakan menjadi dua yaitu pengangkatan salah satu ovarium (*Unilateral ovariectomy*) atau dua ovarium (*Bilateral ovariectomy*) pada sistem reproduksi betina. Kondisi pasca ovariektomi menyebabkan terjadinya defisiensi hormon estrogen dalam tubuh yang dapat berpengaruh terhadap perubahan fisiologi sistem reproduksi (Cassidy *et al.*, 2006). Hal tersebut juga berpengaruh terhadap peningkatan resorpsi tulang dan penurunan densitas tulang (Hartiningsih dan Anggraeni, 2016).

Densitas tulang merupakan ukuran yang menunjukkan kepadatan tulang dan ditandai dengan adanya ketebalan pada bagian tulang trabekula. Pengukuran densitas tulang dapat dilakukan dengan cara mengukur luas area trabekula yang dibagi dengan luas area pengukuran (Laswati *et al.*, 2015). Tulang secara umum terdiri atas dua bagian, yaitu tulang kortikal (*stratum compacta*) dan tulang trabekula (*stratum spongiosa*). Tulang kortikal merupakan tulang yang memiliki struktur padat dan menyusun 80 % rangka tubuh, berfungsi sebagai penyokong tubuh serta tempat melekatnya otot-otot (Dellman dan Brown, 1992; Ott, 2018). Secara histologi tulang kortikal tersusun atas lamella, osteosit yang terletak di dalam lakuna, dan *Haversian canal* yang mengandung pembuluh darah, pembuluh limfa, dan saraf (Zimmermann *et al.*, 2016). Tulang trabekula merupakan tulang yang memiliki struktur berpori dan menyusun 20 % rangka tubuh (Ott, 2018). Tulang trabekula secara histologi tersusun atas sel-sel tulang seperti osteoklas, osteoblas dan osteosit (Openstax, 2013). Osteoklas memiliki peranan dalam proses resorpsi (penyerapan matriks tulang) dan osteoblas berperan dalam proses formasi (pembentukan matriks tulang) sehingga sel-sel tersebut turut berperan dalam menentukan densitas tulang (Laswati *et al.*, 2015). Menurut Muhammad *et al.*, (2013) disebutkan bahwa ovariektomi dapat menyebabkan

jumlah osteoklas lebih banyak dari jumlah osteoblas, sehingga terjadi peningkatan dalam proses resorpsi (penyerapan matriks tulang). Hal tersebut berpengaruh terhadap perubahan struktur tulang trabekula sehingga terjadi penurunan densitas tulang (Idris, 2012).

Defisiensi hormon estrogen dapat diatasi dengan pemberian fitoestrogen. Fitoestrogen merupakan senyawa dari tumbuhan yang memiliki struktur dan fungsi mirip dengan estrogen (Suparman, 2006). Senyawa fitoestrogen berperan sebagai sumber estrogen eksogen alami yang dapat menggantikan fungsi hormon estrogen endogen (Badziad, 2003). Hasil penelitian Laswati *et al.* (2015) menunjukkan bahwa ekstrak jus tomat yang mengandung fitoestrogen pada dosis 220 mg/kg dapat meningkatkan densitas tulang pada tikus ovariektomi bilateral. Hasanah (2018) menyebutkan bahwa jumlah osteoblas mengalami peningkatan pada mencit ovariektomi unilateral kondisi bunting dengan masa defisiensi estrogen selama 90 hari, setelah pemberian ekstrak tepung kedelai hitam dengan dosis 0,42 g/ml/hari selama 30 hari.

Kedelai hitam merupakan tumbuhan *leguminosae* yang berperan sebagai sumber fitoestrogen. Fitoestrogen memiliki tiga senyawa utama, yaitu isoflavon, lignan dan coumestans. Senyawa fitoestrogen yang mempunyai afinitas tinggi terhadap estrogen adalah isoflavon. Kadar isoflavon pada kedelai hitam paling tinggi dibandingkan dengan kedelai kuning ataupun anggota *leguminosae* lainnya seperti koro kratok (Rahma, 2010). Kandungan isoflavon pada kedelai hitam antara lain genestein 56.9% , glycitein 2.6 % dan daidzein 40.5 % (Nakamura *et al*, 2001). Pemberian fitoestrogen yang terkandung dalam kedelai hitam dapat meningkatkan kadar estrogen dalam tubuh (Astawan, 2003), sehingga fitoestrogen dapat digunakan sebagai terapi hormon untuk mengatasi defisiensi hormon estrogen endogen. Hormon estrogen berperan dalam menekan resorpsi tulang, menghambat proses kerapuhan tulang, serta meningkatkan densitas tulang (Ariyanti dan Apriliana, 2016). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian mengenai efek pemberian ekstrak kedelai hitam terhadap densitas tulang femur pada mencit ovariektomi.

1.2 Rumusan masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana pengaruh pemberian ekstrak kedelai hitam (*Glycine soja*) terhadap densitas tulang femur mencit (*Mus musculus* L.) ovariektomi

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pemberian ekstrak kedelai hitam (*Glycine soja*) terhadap densitas tulang femur mencit (*Mus musculus* L.) ovariektomi.

1.4 Batasan masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini antara lain:

1. Mencit yang digunakan adalah mencit strain Balb/C.
2. Ovariektomi dilakukan pada satu ovarium (*unilateral ovariectomy*).

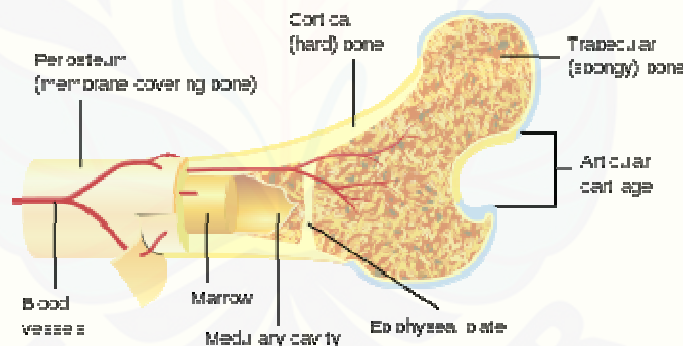
1.5 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi alternatif terapi hormon estrogen untuk penderita osteoporosis akibat defisiensi estrogen pasca menopause.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Struktur Tulang Femur dan Densitas Tulang

Tulang femur merupakan tulang yang sering mengalami fraktur akibat osteoporosis (Mulyono, 1999). Tulang femur berdasarkan bentuknya termasuk dalam tulang panjang yang terdiri atas 3 bagian yaitu diafisis, epifisis dan metafisis. Dinding diafisis dilapisi oleh jaringan padat yang disebut tulang kortikal atau tulang kompak (*compact bone*). Bagian dalam epifisis dan metafisis tersusun oleh tulang trabekula atau tulang spons (*spongy bone*) dan bagian luar dilapisi oleh tulang kortikal yang tipis. Bagian antara epifisis dan metafisis terdapat lempeng epifisis yang tersusun dari tulang rawan (Baron, 2008 ; Putte *et al.*, 2016). Struktur tulang femur sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2. 1 Struktur Tulang Femur Mencit (Tortora dan Derrickson, 2011)

Tulang femur tersusun atas 2 tipe tulang yaitu tulang kortikal atau tulang kompak (*compact bone*) dan tulang trabekula atau tulang spons (*spongy bone*). Tulang kortikal atau kompak merupakan tulang yang memiliki struktur padat dan terletak di permukaan luar (Gibbon, 2007). Tulang kortikal terdiri dari sistem-sistem Harvesian atau osteon yang tersusun padat. Sistem Harvesian memiliki sebuah saluran pada bagian tengah yang disebut kanal Harvesian. Kanal Harvesian dikelilingi oleh cincin-cincin konsentris atau lamela di sela-sela matriks, di dalam kanal Harvesian terdapat pembuluh darah yang tersusun parallel

Osteoblas adalah sel tulang berbentuk kuboid inti satu dan bertanggung jawab dalam proses formasi/pembentukan tulang. Osteoblas berfungsi dalam proses formasi (pembentukan matriks tulang) (Openstax, 2013). Osteoblas mensekresikan enzim alkalin fosfatase yang berperan dalam proses pembentukan matriks tulang (Kierszenbaum, 2002). Osteoblas juga mensekresikan protein kolagen untuk membantu dalam proses mineralisasi tulang (Rucci, 2008).

Osteosit adalah sel tulang yang mengalami perkembangan dari osteoblas (Openstax, 2013). Osteosit sudah menetap dalam lakuna dan merupakan perkembangan dari osteoblas yang berhenti membentuk matriks tulang (Erickson *et al*, 1992; Puzas, 1993). Osteosit berperan dalam mempertahankan konsentrasi mineral matriks (Openstax, 2013).

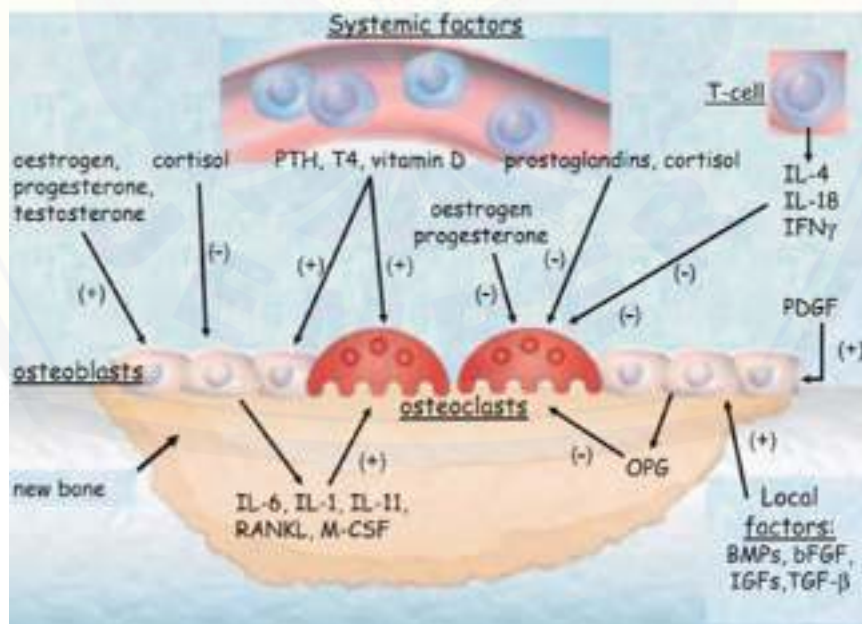
Tulang sebagai penyusun kerangka tubuh mengalami proses regenerasi secara terus-menerus yang dinamakan *remodelling tulang* (Hartono, 2000). Proses *remodelling* tulang meliputi dua tahapan aktivitas seluler yang melibatkan osteoklas untuk resorpsi dan osteoblas untuk formasi. Tahapan aktivitas tersebut dimulai dengan osteoklas melakukan resorpsi dengan cara mensekresikan enzim lisosom yaitu enzim kolagenase dan katepsin K untuk melarutkan matriks tulang (Arnett, 2003). Tahapan selanjutnya adalah osteoklas meninggalkan daerah resorpsi dan dilanjut dengan osteoblas menginvasi daerah yang telah diresorpsi oleh osteoklas (Sihombing *et al*, 2012). Osteoblas mensekresikan enzim alkalin fosfatase dan protein kolagen untuk membentuk matriks tulang (Rucci, 2008). Osteoblas yang sudah berhenti membentuk matriks tulang akan berkembang menjadi osteosit dan berperan dalam mempertahankan matriks tulang (Openstax, 2013). Jumlah osteoklas yang lebih banyak dari jumlah osteoblas berpengaruh terhadap penurunan ketebalan tulang trabekula (Laswati *et al.*, 2015). Perubahan struktur trabekula menyebabkan penurunan densitas tulang (El-morsy *et al*, 2012).

2.2 Dampak Defisiensi Estrogen Terhadap Densitas Tulang

Estrogen merupakan hormon steroid yang diproduksi oleh sel-sel granulosa ovarium (Dellman dan Brown, 1992). Estrogen yang terdapat secara

alami pada tubuh berupa estradiol-17 β (E2), estron (E1) dan estriol (E3).Ketiganya merupakan steroid dengan 18 atom karbon yang terbentuk dari kolesterol (Gruber *et al.*, 2002).Diantara ketiga jenis estrogen tersebut estradiol-17 β (E2) adalah yang paling dominan (Ganong, 2003).Salah satu fungsi hormon estrogen untuk menjaga agar tulang-tulang dalam tubuh tidak keropos, menjaga keseimbangan antara faktor penyerapan tulang dan faktor pembentukan tulang (Hartono, 2000).

Hormon estrogen berperan penting dalam metabolisme tulang, mempengaruhi aktivitas dan menjaga kesetimbangan kerja osteoblas maupun osteoklas melalui produksi parakrin terutama oleh osteoblas.Osteoblas memiliki reseptor alpha dan beta (ER α dan ER β) didalam sitosol (Monroe *et al.*, 2003).Meskipun kedua reseptor ER α dan ER β berinteraksi dengan ligan estrogen yang sama yaitu estradiol-17 β , keduanya memiliki perbedaan. Osteoblas mengekspresikan reseptor beta (ER β) 10 kali lipat dari reseptor estrogen alpha (ER α) (Monroe *et al.*, 2003).Peranan estrogen dalam menentukan densitas tulang dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 PerananEstrogen Dalam Menentukan Densitas Tulang (Tsartsalis *et al.*, 2012).

Hormon estrogen dalam kondisi setimbang akan mencapai osteoblas dan beraktivitas melalui reseptor yang terdapat di dalam sitosol osteoblas (Khajuria *et al.*, 2011). Hormon estrogen akan berikatan dengan reseptor $ER\beta$ pada osteoblas, dengan adanya ikatan antara hormon estrogen dengan reseptor $ER\beta$ pada osteoblas dapat menstimulasi proses formasi (pembentukan matriks tulang). Osteoblas kemudian mensintesis enzim alkalik fosfatase untuk mendeposisi ion-ion kalsium dan fosfat ke matriks tulang (Rucci, 2008). Hormon estrogen juga dapat meningkatkan sekresi TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) yang berfungsi sebagai mediator untuk menstimulus osteoblas menuju bagian lakuna dan merangsang ekspresi OPG (*osteoprotegerin*) dari osteoblas dan sel stroma (Bell, 2003). OPG (*osteoprotegerin*) dihasilkan oleh osteoblas dan berfungsi sebagai penyeimbang dengan mencegah RANK (*Receptor activator of nuclear factor kappa- β*) pada osteoklas berikatan dengan RANKL (*Receptor activator of nuclear factor kappa- β Ligand*) pada osteoblas yang lebih lanjut dapat menghambat resorpsi tulang dan meningkatkan densitas tulang (Norman, 2003). Efek utama estrogen pada tulang adalah menurunkan jumlah dan aktivitas osteoklas sehingga mampu mengurangi proses resorpsi tulang dan meningkatkan pertumbuhan tulang (Gunawan, 2007).

Hormon estrogen pada sel-sel tulang secara tidak langsung memiliki peran dalam menurunkan berbagai sitokin yang bekerja meningkatkan diferensiasi dan maturasi sel osteoklas seperti IL-1 (*Interleukin-1*), IL-6 (*Interleukin-6*), TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-Alpha*), PGE2 (*Prostaglandin- E2*) dan M-CSF (*Macrophage Colon & Stimulating Factor*) yang dihasilkan oleh *bone marrow stromal cells* dan sel *mononuclear*. Faktor-faktor ini dapat meningkatkan proses resorpsi tulang (Riggs, 2000).

Ovariectomi merupakan tindakan pengangkatan ovarium pada sistem reproduksi betina yang dapat menyebabkan produksi estrogen berkurang serta meningkatkan resorpsi tulang, dan menurunnya densitas tulang (Hartiningsih dan Anggraeni, 2016). Defisiensi estrogen atau penurunan kadar hormon estrogen dapat menstimulasi proses osteoklastogenesis. Osteoklas yang *mature* dapat

mensintesis enzim proteolitik untuk mencerna matriks tulang. Osteoklastogenesis berpengaruh terhadap penurunan densitas tulang (Arnett, 2003).

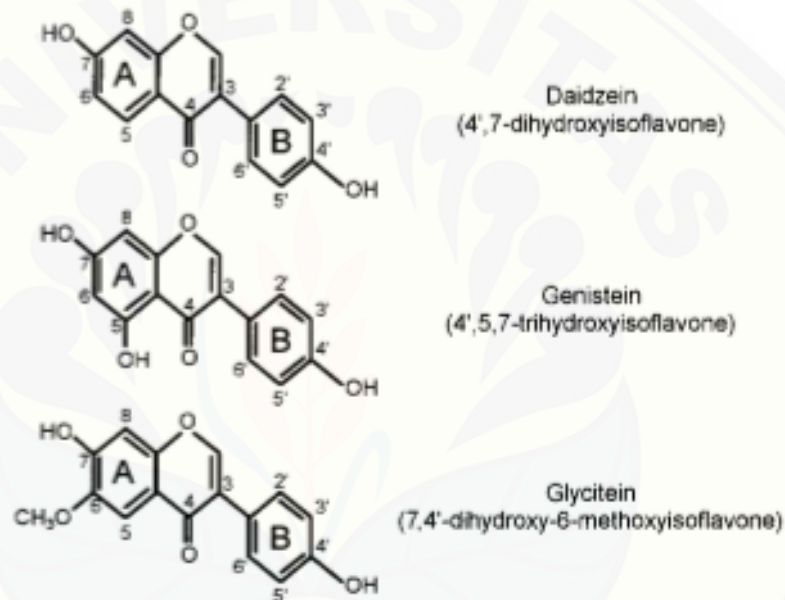
Proses pembentukan dan diferensiasi osteoklas secara tidak langsung distimulus oleh interaksi antara kedua molekul yang dihasilkan oleh osteoblas yaitu OPG(*osteoprotegerin*) dan RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor kappa β Ligand*), kedua komponen tersebut memiliki efek yang berlawanan dalam *remodelling* tulang. Defisiensi estrogen menstimulus RANK (*Receptor Activator of Nuclear Factor kappa β*) yang disekresi oleh osteoklas dan akan berikatan dengan RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor kappa β Ligand*) untuk aktivasi osteoklastogenesis (Muller, 2003).

Defisiensi estrogen juga dapat menstimulasi proses osteoklastogenesis dengan cara meningkatkan IL-1 (*Interleukin-1*), IL-6 (*Interleukin-6*), TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-Alpha*), PGE2 (*Prostaglandin-E2*) dan M-CSF (*Macrophage Colon & Stimulating Factor*) yang merupakan faktor-faktor dalam meningkatkan proses resorpsi tulang (Riggs, 2000). Penurunan kadar hormon estrogen juga berpengaruh pada peningkatan absorpsi kalsium di usus dan reabsorpsi kalsium di ginjal. Hal ini mengakibatkan kadar kalsium di dalam darah mengalami penurunan atau hipokalsemia. Hipokalsemia dapat menstimulus pelepasan hormon paratiroid yang dapat meningkatkan resorpsi tulang untuk meningkatkan kadar kalsium dalam darah (Hartono, 2000).

2.3 Potensi Kedelai Hitam Dalam Meningkatkan Densitas Tulang

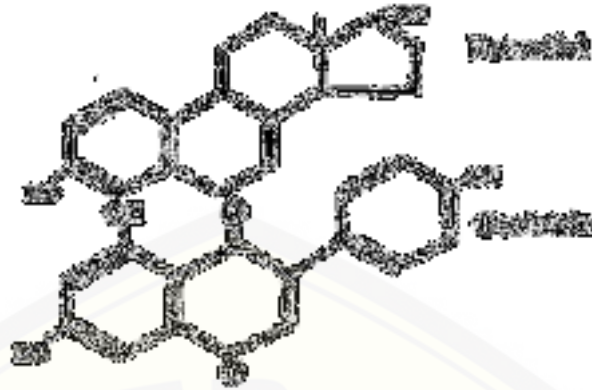
Fitoestrogen adalah hasil metabolit sekunder tanaman yang diketahui memiliki kandungan senyawa non steroid yang struktur dan fungsinya mirip dengan estrogen (Ariyanti dan Apriliana, 2016). Senyawa fitoestrogen dapat berupa isoflavon, lignin dan coumestan, yang dapat ditemukan pada biji-bijian terutama kacang-kacangan, buah-buahan dan sayuran. Struktur kimia isoflavon mirip dengan estradiol sehingga senyawa ini memberikan efek estrogenik (Chen *et al.*, 2015).

Kedelai hitam merupakan salah satu tanaman yang termasuk dalam famili *Leguminosae* yang mengandung senyawa seperti isoflavon, asam amino esensial, saponin, dan antioksidan. Kadar isoflavon pada kedelai hitam paling tinggi dibandingkan dengan kedelai kuning ataupun famili *Leguminosae* lainnya seperti koro kratok (Rahma, 2010). Kandungan isoflavon dalam kedelai hitam terdiri atas genistein 56.9 % , glycitein 2.6 % dan daidzein 40.5 % (Nakamura *et al*, 2001). Struktur kimia isoflavon kedelai hitam tampak pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Struktur Kimia Isoflavon (Messina, 1999).

Isoflavon mempunyai struktur yang mirip dengan estrogen. Kemiripan struktur antara estrogen dengan isoflavon serta adanya reseptor menyebabkan isoflavon dapat berikatan dengan reseptor estrogen pada berbagai jaringan tubuh termasuk tulang. Isoflavon mempunyai afinitas untuk mengikat reseptor $ER\beta$ betha, potensi ini memberikan efek positif pada tulang karena isoflavon dapat berperan dalam membantu memperbaiki metabolisme tulang (Kuipper *et al.*, 1997). Menurut Messina (1999) efek estrogenik isoflavon dan kesamaan struktur kimia antara isoflavon kedelai dan estradiol terbukti dapat meningkatkan densitas mineral tulang pada wanita pascamenopause.



Gambar 2.5 Struktur kimia estradiol dan genistein (Brzezinki, dan Debi, 1999).

Pemberian isoflavon genistein dari kedelai dengan dosis 55 mg/kg/hari selama 18 minggu dapat meningkatkan densitas tulang pada tikus ovariektomi bilateral (Reinwald *et al.*, 2010). Pengaruh fitoestrogen dari ekstrak jus tomat dengan dosis 220 mg/kg setiap hari selama 4 minggu dapat meningkatkan densitas tulang pada tikus Wistar pasca ovariektomi dengan masa defisiensi estrogen selama 2 minggu. Lebih lanjut disebutkan bahwa adanya kandungan senyawa isoflavon pada ekstrak jus tomat dapat meningkatkan ekspresi *ER α* pada sel osteoblas secara signifikan, sehingga dapat menurunkan proses resorpsi tulang (Laswati *et al.*, 2015).

2.4 Hipotesis

Pemberian ekstrak tepung kedelai hitam dapat meningkatkan densitas tulang femur mencit ovariektomi.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Waktu penelitian dimulai dari Juli 2018 – Maret 2019. Penelitian dilakukan di Laboratorium Zoologi dan Laboratorium Botani Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Pembuatan preparat histologi dan pengukuran densitas tulang dilakukan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

3.2 Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian ini yaitu kandang mencit ukuran 34 cm x 25 cm x 12 cm dari plastik dan penutup dari ram kawat, botol minum mencit, timbangan analitik, papan bedah, *hecting set*, ekskavator, *sput injection* (Terumo Syringe 1 cc/ml) 0,45 x 13 mm, *sput injection* (Terumo Syringe 3 ml) 0,65 x 32 mm, silet, klem arteri, jarum sutura nomor 2, gelas ukur 100 ml, *beaker glass* 500 ml, *beaker glass* 250 ml, botol *Scott* 1000 ml, cawan porselen 75 cc, spatula, corong plastik kecil, saringan tepung 60 mesh, baki stainless steel, sendok, cup ekstrak kecil, rotary evaporator, waterbath, oven (*Incucell*), *staining jar*, flakon, skalpel, dan mikroskop cahaya biasa merk *Nikon H600L* yang dilengkapi dengan digital kamera *DS Fi2 300* megapixel dan *soft ware* pengolah gambar *Nikkon Image System*.

3.3 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mencit (*Mus musculus*L.) betina strain Balb/C umur 60 hari yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya (PUSVETMA), pakan pellet (BR1) (PT. Chareon Pokphand Indonesia Animal Feedmill Co. Ltd Jakarta), kedelai hitam (*Glycine soja*) yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi Malang (BALITKABI), aquades, benang silk nomor 3 (*One med*), benang catgut nomor 3 (*One med*), ketamine 10 %, *xyla*, betadine (*Povidone iodine*), alcohol 70 %, *One med*).

antibiotik (Levofloxacin), cairan infus 0,9%, *Sodium Chloride*, pakan pellet (BR1), *tissue*, kasa steril, kertas saring, *chloroform*, masker, *gloves*, kain saring, gelas objek, gelas penutup, larutan fiksatif PBS formalin.

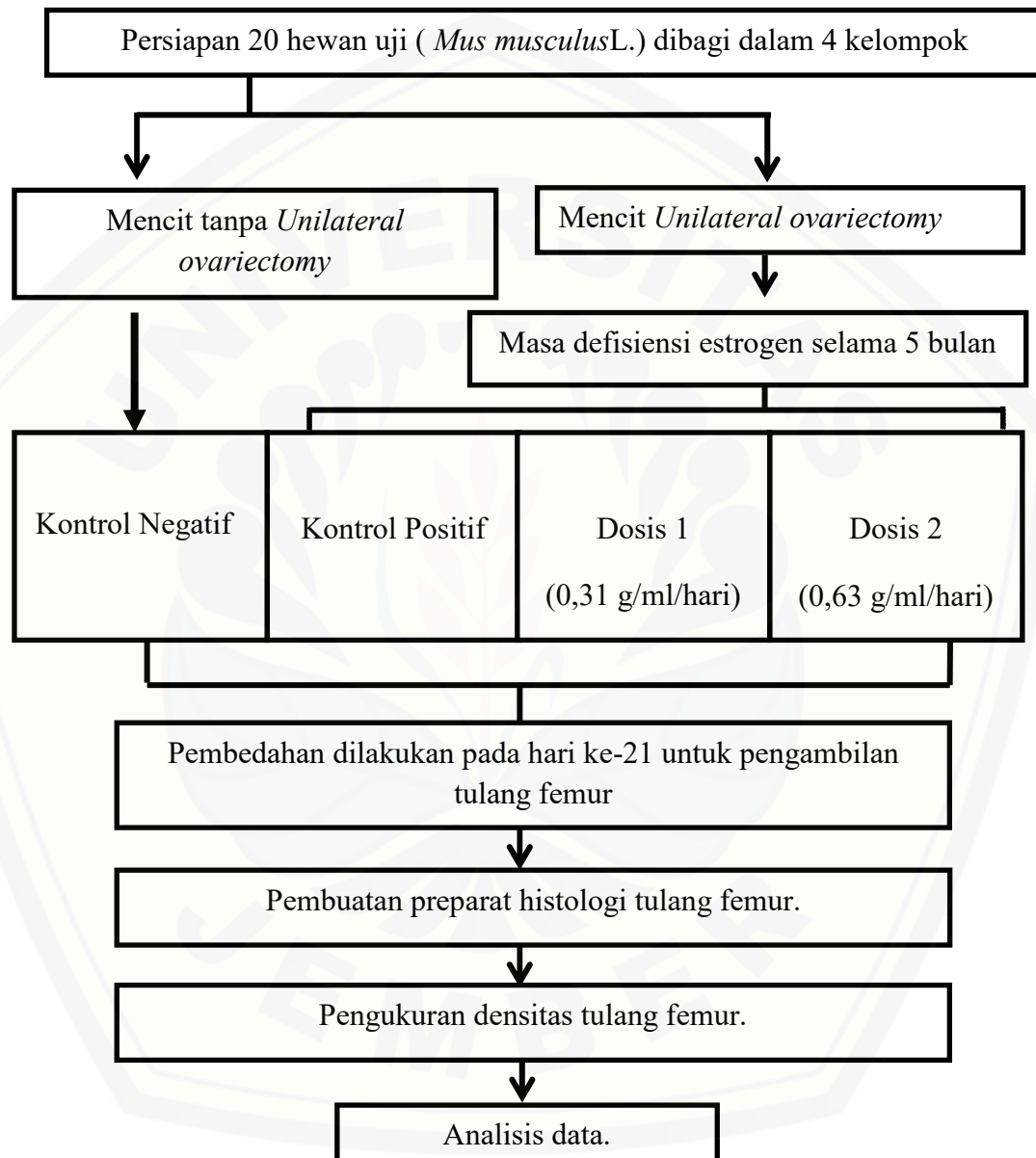
3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan 4 perlakuan dan masing-masing dengan 5 kali ulangan. Variabel bebas pada perlakuan ini adalah dosis pemberian ekstrak tepung kedelai hitam. Variabel terikatnya adalah densitas tulang femur mencit. Penelitian ini menggunakan 20 ekor mencit (*Mus musculus* L.) betina strain Balb/C. Pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

- Kontrol negatif (K-) : mencit tanpa ovariectomi unilateral dan tanpa ekstrak tepung kedelai hitam
- Kontrol positif (K+) : mencit ovariectomi unilateral tanpa ekstrak tepung kedelai hitam.
- Dosis 1 (D1) : mencit ovariectomi unilateral yang diberi ekstrak tepung kedelai hitam dengan dosis 0,31g/ml/hari selama 20 hari.
- Dosis 2 (D2) : mencit ovariectomi unilateral yang diberi ekstrak tepung kedelai hitam dengan dosis 0,63 g/ml/hari selama 20 hari.

3.5 Alur Penelitian

Alur penelitian secara garis besar dapat dilihat pada Gambar 3.1



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.6 Tahapan Penelitian

Tahapan dalam penelitian ini yaitu: persiapan hewan uji, preparasi ovariektomi unilateral mencit, pembuatan ekstrak kedelai hitam, perlakuan hewan uji, pembuatan preparat tulang femur, pengamatan densitas tulang femur dan analisis data.

3.6.1 Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah *Mus musculus*L. betina strain Balb/C yang diperoleh dari PUSVETMA. Mencit ditempatkan dalam bak plastik ukuran 34 cm x 25 cm x 12 cm dengan alas sekam padi dan serbuk gergaji kayu steril dengan tutup kawat. *Mus musculus*L. dipelihara dengan diberi pakan pellet merk BR-1.

3.6.2 Preparasi Ovariektomi Unilateral Mencit

Ovariektomi unilateral yaitu pengambilan salah satu ovarium melalui pembedahan. Mencit dibius dengan ketamine 10 % dan *xyla* dengan perbandingan 1:1 sebanyak 0,05 ml. Langkah pertama yaitu mencit diletakkan secara terlentang pada papan bedah yang selanjutnya diolesi air sabun anti bakteri dan dicukur rambut bagian medial perut. Setelah dilakukan pencukuran kemudian dioleskan betadine yang bertujuan untuk mencegah kontaminasi mikroba. Langkah berikutnya yaitu dilakukan pembedahan secara perlahan hingga lapisan muskulus daerah abdomen terbuka. Langkah berikutnya dilakukan penyayatan dengan menggunakan gunting ujung tumpul dan pinset pada kulit bagian luar (*M. oblikus abdominis eksternus*) dengan lebar 1,5 cm dan kulit bagian dalam (*M. oblikus abdominis internus*) dengan lebar 1 cm. Selanjutnya ovarium dipotong pada daerah antara oviduk dan ovarium dengan beberapa tahapan yaitu dijepit pada daerah ujung oviduk dengan klem arteri dan diikat bagian ujung oviduk dengan silk. Kemudian ovarium sebelah kanan dipotong secara perlahan dengan gunting *matzenbaum*. Organ yang telah dikeluarkan direposisi kembali dalam abdomen

dan diberi 0,5 ml larutan *Sodium Chloride* 0,9 %. Proses penutupan dengan cara dijahit pada bagian *M. oblikus abdominis internus* menggunakan benang *cat gut* ukuran 3 sedangkan *M. oblikus abdominis eksternus* menggunakan benang silk ukuran 3. Selanjutnya diberi betadine pada daerah yang luka. Injeksi antibiotik (*Levofloxacin*) dilakukan dengan dosis 0,05 ml. Perawatan luka pada masa penyembuhan dapat dilakukan dengan pemberian parasetamol selama 1 minggu (Strom *et al.*, 2012).

3.6.3 Pembuatan Ekstrak Kedelai Hitam

Kedelai hitam ditimbang, kemudian dioven dalam suhu 40 - 45°C selama 2-3 hari. Selanjutnya digrinder dan diayak dengan ayakan 60 mesh. Setelah terbentuk tepung kedelai hitam ditimbang dan dimaserasi dalam alkohol 70 % dengan perbandingan 1:4 (200 gram tepung kedelai hitam: 800 ml alkohol 70 %) dan dihomogenkan, kemudian dimaserasi selama 2 x 24 jam untuk memisahkan supernatan dan pellet. Supernatan disaring dengan kain saring dan kertas saring untuk mendapatkan filtratnya. Filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam *rotary evaporator* dengan suhu 90°C hingga diperoleh filtrat tanpa alkohol. Filtrat tanpa alkohol dipanaskan di waterbath selama ± 8 jam untuk mendapatkan *crude extract* dalam bentuk pasta (Hastuti, 2015).

3.6.4 Perlakuan Hewan Uji

Perlakuan pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak kedelai hitam (*Glycin soja*) yang diberikan secara oral menggunakan jarum sonde lambung selama 20 hari berturut-turut. Pemberian ekstrak kedelai hitam dimulai pada bulan ke-5 setelah tindakan ovariektomi. Dosis yang digunakan pada penelitian ini 0,31 g/ml/hari dan 0,63 g/ml/hari (Abdi, 2017). Pemberian ekstrak kedelai hitam dilakukan dengan cara mencampurkan pasta ekstrak kedelai hitam pada 1 ml aquades. Pembedahan untuk pengambilan tulang femur sebelah kanan dilakukan pada hari ke-21 setelah pemberian dosis. Setelah itu dilanjutkan dengan pembuatan preparat histologi.

3.6.5 Pembuatan Preparat Tulang Femur

Setelah pemberian perlakuan selama 20 hari masing-masing kelompok perlakuan dianestesi dengan kloroform dan diletakkan di atas papan bedah dengan posisi telentang, kemudian dilakukan pembedahan dan diambil tulang femur kanan (bagian epifisis, metafisis dan diafisis). Pembuatan preparat tulang diawali dengan proses fiksasi dan dilanjut dengan proses dekalsifikasi tulang untuk menghilangkan Ca^{2+} yang ada di dalam jaringan, sehingga jaringan tulang menjadi lunak dan dapat dilakukan proses selanjutnya (Sumaryati, 2012). Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode parafin yang dilakukan dengan *carafiksasi, dehidrasi, clearing, infiltrasi, embedding, section, affixing dan mounting* (Suntoro, 1983). Prosedur pembuatan preparat histologi femur yaitu:

a. *Fiksasi dan Dekalsifikasi*

Femur mencit yang telah diambil dicuci dengan NaCl 0,9%, direndam dalam botol flakon berisi larutan fiksatif PBS formalin pH 7,4 selama 3 jam kemudian dicuci alkohol 70 %. Setelah difiksasi, dimasukkan dalam wadah yang berisi 200 ml larutan *Von Ebner's*, kemudian didiamkan dalam suhu kamar selama 24 jam. Dekalsifikasi dilakukan dengan cara mengambil 5 ml larutan perendam, ditambah 1 ml larutan ammonium oksalat 5%, dan diamati ada atau tidak adanya endapan putih. Jika masih terlihat adanya endapan putih, maka proses dekalsifikasi belum sempurna dan dilakukan pengujian dekalsifikasi ulang dengan memindahkan tulang pada 200 larutan *Von Ebner's* baru dan didiamkan selama 2 jam kemudian dibilas dengan aquades dan difiksasi ulang dengan PBS pH 7,4 selama 2 jam (sumaryati, 2012).

b. *Dehidrasi dan Clearing*

Proses dehidrasi dilakukan menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertingkat mulai 70 %, 80 %, 95 % dan absolut masing-masing selama 1,5 jam. Kemudian dimasukkan dalam alkohol absolut dan xylol dengan perbandingan 3:1, 1:1 dan 1:3 masing-masing selama 30 menit. Proses selanjutnya adalah *clearing* tulang femur dijernihkan dengan xylol selama semalam.

c. *Infiltrasi dan Embedding* (penanaman)

Infiltrasi parafin dilakukan dengan menggunakan parafin yang telah dicairkan didalam oven. Infiltrasi parafin dilakukan pada suhu 48-55°C menggunakan xylol:paraffin selama 30 menit dan paraffin I, II dan III masing-masing selama 30 menit. Setelah infiltrasi kemudian dilakukan penanaman organ pada blok parafin yang sudah dicairkan.

d. *Penyayatan (Sectioning)* dan perekatan (*Affixing*)

Hasil embedding yang akan disayat direkatkan pada holder dengan menggunakan skalpel dan bunsen. Penyayatan tulang femur dilakukan secara membujur dengan menggunakan *rotary microtom* dengan ketebalan 8 μm -10 μm . Sayatan direkatkan pada gelas objek yang telah dilapisi perekat gliserin dan albumin.

e. *Pewarnaan (Staining)*

Langkah pertama dalam proses pewarnaan yaitu proses deparafinisasi menggunakan xylol I dan II masing-masing selama 15-30 menit. Kemudian dilakukan rehidrasi bertingkat mulai dari alkohol absolut, 95%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% dan aquades masing-masing selama 2 menit. Langkah selanjutnya dilakukan dengan pewarnaan *Haematoxylin* selama 2-3 menit, kemudian dicuci air mengalir. Preparat dimasukkan kembali dalam alkohol bertingkat dari 20% hingga 70%, setelah itu dilakukan pewarnaan *Eosin* selama 10 menit dilanjutkan alkohol bertingkat hingga Xilol I dan II masing-masing selama 2 menit.

f. *Penutupan (Mounting)*

Irisan diberi entellan terlebih dahulu kemudian ditutup dengan *cover glass*, dikeringkan diatas hot *plate* agar terbebas dari gelembung udara dan dapat diamati pada mikroskop.

3.6.6 Pengukuran Densitas Tulang Femur

Pengukuran densitas tulang dilakukan dengan menggunakan *software* pengolah gambar Nikkon Image System yang telah terkalibrasi, pada pembesaran

100x. Seluruh pemeriksaan ini menggunakan mikroskop cahaya biasamerk *Nikon H600L* yang dilengkapi dengandigital camera *DS Fi2 300megapixel* dan *software* pengolah gambar *Nikkon Image System*. Pengukuran densitas tulang dilakukan pada bagian metafisis tulang femur. Densitas tulang dinyatakan dalam persen, data setiap sampel diperoleh dengan cara membagi luas area tulang trabekula (μm^2) yang teramati dengan luas seluruh area pengukuran (μm^2) (Laswati *et al.*, 2015).

3.6.7 Analisis Data

Hasil pengamatan densitas tulang kemudian dianalisis menggunakan analisis deskriptif Uji *One Way Anova* dengan kepercayaan 95 % atau $\alpha = 0,05$ untuk melihat pengaruh pemberian ekstrak kedelai hitam pada mencit *Unilateral ovariectomy*. Selanjutnya, untuk mengetahui beda nyata antar kelompok uji dilakukan analisis *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) (Steel and Torrie, 1993).

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, pemberian ekstrak kedelai hitam (*Glycine soja*) dengan dosis 0,31 g/ml/hari dapat meningkatkan densitas tulang femur mencit (*Mus musculus*) yang telah di ovarietomi secara unilateral dengan masa defisiensi estrogen selama 5 bulan.

5.2 Saran

Penelitian ini merupakan langkah awal untuk mengetahui potensi ekstrak kedelai hitam (*Glycine soja*) terhadap densitas tulang femur mencit (*Mus musculus*) yang telah diovariectomi secara unilateral dengan masa defisiensi estrogen selama 5 bulan. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan peningkatan dosis dan penambahan waktu dalam pemberian dosis terhadap mencit yang mengalami defisiensi estrogen akibat diovariectomi secara unilateral, sehingga didapatkan hasil yang optimal terhadap peningkatan densitas tulang.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdi, Y. F. R. 2017. Efek Pemberian Ekstrak Tepung Kedelai Hitam (*Glycine soja*) Terhadap Leukosit Mencit (*Mus musculus* L.) Implantasi Pasca Ovariektomi. *Skripsi*.FMIPA Universitas Jember.
- Ariyanti, H., dan Apriliana, E. 2016. Pengaruh Fitoestrogen Terhadap Gejala Menopause. *Majority*.5(5).
- Arnett, T., 2003.*Bone Structure and Bone Remodelling*. London: University College London.
- Astawan, M., Tutik, W., dan Muhammad, I. 2003. Karakteristik Fitokimia Tepung Tempe Kecambah Kedelai. *J.Gizi Pangan*. 11 (1) ; 35-42.
- Badziad, A. 2003.*Menopause, Danropause, dan TSH*. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka.
- Baron, R. 2008.*Anatomy and Ultrastructure of Bone-Histogenesis, Growth and Remodeling*.*Endotext*.
- Bell, N. H. 2003. RANK Ligand And The Regulation Of Skeletal Remodeling. *J Clin Invest*. 111(8): 1120-1122.
- Brzezinki, A. dan A. Debi. 1999. Phytoestrogens: the “natural” selective estrogen receptor modulators?.*European Journal o Obsetrics & Gynecology*. 85:47-51.
- Cassidy, A., P. Albertazzi, L.I. Nielsen, W. Hall, G. Williamson, I. Tetens, S. Atkins, H. Cross, Y. Manios, A.Wolk, C. Steiner and F. Branca. 2006.

Critical Review of Health Effects of Soyabean Phyto-oestrogens in Postmenopausal Women. *Proceedings of the Nutrition Society*.65: 76-92.

Chen, M.N., C-C.Lin, and C. Liu. 2015. Efficacy of phytoestrogens for menopausal symptoms: a meta-analysis and systemic review. *Climateric*. 18(2):1-20.

Dellman, H. and Brown, E. 1992.*Buku Teks Histologi Veteriner II. Third Edition*. Alih bahasa : R. Hartono. Jakarta: Universitas Indonesia Press.

Dellmann, H., dan Brown, E. 1989. *Buku teks Histologi Veteriner I. 3rd Ed. Penerjemah Jan Tambayong*. Jakarta: Buku Kedokteran, EGC.

El-Morsy, A.S., Beshir, S.R., Farrag, K. A. E., Mohamed, M.S and Hamam, G.G. 2012. The Effects Of Different Nutritional Supplements On Experimentally Induced Osteoporosis In Male Albino Rats: A Scanning Electron Microscopic Study. *The Egyptian Journal of Histology*. 35:220-228.

Erickson, E.F., Kasem, L. dan Aarhus,1992. *The celluler basis of bone remodeling*. Triangle: 45-57.

Ganong, W.F., 2003. *Review of Medical Physiology*.International Edition.Mc Graw Hill Book. San Francisco.

Gibbon, V. 2007. Minimally Invasive Human Bone, Extraction Method for DNA Analysis. *Intensive Course in Biological Anthropology*. 1: 97-101.

Gruber C.J, Tschugguei W, Schneebege, C dan Huber J.C., 2002. Production and action of estrogens.*N Engl J Med*. 346:340-50.

Gunawan, S.G., 2007.*Farmakologi dan Terapi*. Jakarta : FKUI.

Guyton & Hall. 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Terjemahan oleh Irawati et al.* Jakarta: EGC.

Hartiningsih dan Anggraeni. D. 2016. Ekspresi Tartrate-Resistant Acid Phosphatase-5b pada Epifisis Tulang Femur Tikus Ovariectomi yang Mengonsumsi Calcitriol dan Raloxifene. *Jurnal Veteriner*. 17(1).

Hartono, M. 2000. *Mencegah dan Mengatasi Osteoporosis*. Jakarta : Puspa Swara.

Hasanah, M. 2018. Efek Pemberian Ekstrak Tepung Kedelai Hitam (*Glycine soja*) Terhadap Histologi Femur Mencit (*Mus musculus*) Bunting Pasca Ovariectomi Unilateral. *Skripsi*. FMIPA Universitas Jember.

Hastuti, N.A. 2015. *Efek Pemberian Ekstrak Kedelai (Glycine max) Terhadap Ekspresi Caspase-3 Mencit Galur C3H Model Karsinogenik Payudara* Tesis. Malang: Program Studi Magister Kebidanan. Universitas Brawijaya.

Idris, A.I. 2012. *Ovariectomy Or Orchidectomy In Rodents Article*. UK : Springer Science+ Business Media, LLC.

Khajuria, D.K., Rema R., Roy M. 2011. Drugs for the management of osteoporosis: a review. *rev bras reumatol*. 51 (4) : 365-382.

Kierszenbaum, A. 2002. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. St. Louis: Mosby. Inc. An Affiliate of Elsevier.

Kuiper, G.G.J.M., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblod, J., Nilson, S., Gustafsson, J.A. 1997. Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors α and β . *Endocrinology Journal* . 138:863-870.

- Laswati, H., H. Hendarto, D. Irawati, dan L. Mahaputra. 2015. Jus Tomat Meningkatkan Kepadatan Tulang Tikus Menopause. *Jurnal Veteriner*. 16(3).
- Messina, M.J. 1999. Legumes and Soybeans: Overview of Their Nutritional Profiles and Health Effects. *Am. J. Clin. Nutr.* 70.
- Monroe, D.G., Getz, B.J., Johnsen, S.A., Riggs, L.B., Khosla, S. and. Spelsberg, T.C. 2003. Estrogen Receptor Isoform-Specific Regulation of Endogenous Gene Expression in Human Osteoblastic Cell Lines Expressing Either ER α or ER β . *Journal of Cellular Biochemistry*. 90:315–326.
- Mulyono. 1999. Kandungan mineral tulang pada sampel wanita pascamenopause Indonesia di Jakarta: pengukuran dengan menggunakan Dual Energy X-Ray Absorptiometry [Tesis]. Jakarta: Program Studi Ilmu Kedokteran Olah Raga. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia
- Muller RJ and Richards RG. 2003. Immunohistological Identification of The Osteoclast Formation Regulator Osteoprotegerin Ligan (OPGL/RANKL/TRANCE) in Human Bone Tissue. *European Cells and Materials*. 5 (2). : 42-43.
- Muhammad, N., Razali, S., Shuid, A.N., N., Mohamed, N., & Soelaiman, I.N. 2013. Membandingkan Kesan antara Fraksi-kaya Tokotrienol, Kalsium dan Estrogen Terhadap Metabolisme Tulang Tikus Terovarietomi. *Sains Malaysiana*. 42(11) : 1591–1597.
- Nakamura, Y., Kaihara, A., Yoshii, K., Tsumura, Y., Ishimitsu, S., & Tonogai, Y. 2001. Content and Composition of Isoflavonoids in Mature or Immature Beans and Bean Sprouts Consumed in Japan. *Journal of Health Science*. 47(4) : 394 – 406.

Openstax. 2013. *Anatomy an Physiology*. Rice University. Textbook.

Ott, S. M. 2018. Cortical or Trabecular Bone: What's the Difference?. *Am J Nephrol*. 47:373–375.

Patricia A. D dan Michael I. S. 2006. Bone Biology and the Clinical Implications for Osteoporosis. *Physical Therapy*. 86: 77-91.

Pearce, E.C. 2016. *Anatomi dan Fisiologi*. Jakarta : PT. Gramedia Pustaka Utama.

Putte, C.V., J.Regan, dan A. Russo. 2016. *Seeley's Essentials of Anatomy dan Physiology*. New York: McGraw-Hill Education.

Puzas, V.E., 1993. *The osteoblast*. Di dalam: Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism. Faves MJ, editor. 2nd Ed. Raven Press Ltd. hlm.15-20.

Rahma, H. 2010. *Karakteristik senyawa bioaktif isovlavon dan uji aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol tempe berbahan baku kedelai hitam (Glycine soja), Koro Hitam (Lablab purpureus), dan koro kratok (Phaseolus lunatus)*. Tesis. Surakarta: Progam Pascasarjana Universitas Sebelas Maret.

Reinwald, S., Mayer, L. P., Hoyer, P. B., Turner, C. H., Barnes, S., & Weaver, C. M. 2010. A longitudinal study of the effect of genistein on bone in two different murine models of diminished estrogen-producing capacity. *Journal of Osteoporosis*.

Riggs, B. L. 2000. The Mechanisms Of Estrogen Regulation Of Bone Resorption. *The Journal of Clinical Investigation*. 106(10).

- Rucci, N. 2008. Molecular Biology Of Bone Remodelling: Mini Review. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. 5(1): 49-56.
- Sabri, M., D. N. Ayumi., M. Jalaluddin., Hamny., C. D. Iskandar., H. Alfian. The Effect Of Sipatah-patah (*Cissus quadrangularis* Salisb) Extract On The Femur Bone Density of White Rat (*Rattus norvegicus*) with Model Ovariectomy. *Jurnal Medika Veterinaria*. 13 (1):5-14.
- Safrida. 2008. *Perubahan kadar hormon estrogen pada tikus yang diberi tepung kedelai dan tepung tempe* [Tesis]. Bogor : Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Samuels, A., M.J. Perry., A. E. Goodship., W.D. Fraser dan J.H. Tobias. 2000. Is High-dose Estrogen-induced Osteogenesis in the Mouse Mediated by an Estrogen Receptor?. *Bone*. 27 (1): 41-46.
- Seibel, M., 2005. Biochemical markers of bone turnover part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev*. 26: 97-122.
- Sihombing, I., Wangko, S. dan Kalangi, S.J.R., 2012. Peran Estrogen Pada Remodelling Tulang. *Jurnal Biomedik*. 4(3): 18-28.
- Steel, R. and Torrie J. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistik*. Sumantri, B. Penerjemah Gramedia Pustaka. Jakarta. Terjemahan dari Principles and Procedures of Statistic.
- Strom, O., J., A. Theodorsson, E. Ingberg, I.M. Isaksson dan E. Theodorsson. 2012. Ovariectomy and 17 β -estradiol Replacement in Rats and Mice: A Visual Demonstration. *Journal of Visualized Experiments*. 64: 1-4.
- Sumaryati. 2012. *Dekalsifikasi Metode Von Ebner"s. Prosedur Kerja Baku/Standart Operating Procedure (SOP)*. No: P-014. Yogyakarta:

Laboratorium Histologi dan Biologi Sel Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada.

Suntoro, S.H. 1983. *Metode Pewarnaan*. Jakarta: Bantara Karya Aksara.

Suparman, E. 2006. Fitoestrogen/HRT: Pro Dan Kontra. *Jurnal Ilmiah*. Manado: Universitas Sam Ratulangi.

Tobias J H. 2003. At the crossroads of skeletal responses to estrogen and exercise. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*. 14(10): 441-443.

Tortora, G. dan Derrickson, B. 2009. *Principles of Anatomy and Physiology*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.

Tsartsalis AN, Dokos C, Kaiafa GD, Tsartsalis DN, Kattamis A, Hatzitolios AI, Savopoulos CG. 2012. Statins, Bone Formation And Osteoporosis: Hope Or Hype?. *Hormones*. 11(2): 126-139.

Ward, B. R. 1986. *The Human Body Series: The Skeleton and Movement*. Semarang : PT. Mandira.

Whitten PL, Patisaul HB. 2001. Cross-species and inter assay comparison of phytoestrogen action. *J Environ Health Perspect*. 109:5-20.

Yamaguchi, M. 2002. Isoflavone and Bone metabolism: its cellular mechanism and preventive role in bone loss. *Journal of Health science*. 48(3):209-222.

Zimmermann, Elizabeth A., Schaible, E., Gludovatz, B., Schmidt, F.N., Riedel, C., Krause, M., Vettorazzi, E., Acevedo, E., Hahn, M., Püschel, K., Tang, N., Amling, M., Ritchie, R.O dan Busse, B. 2016. Intrinsic Mechanical Behavior Of Femoral Cortical Bone In Young, Osteoporotic And

Bisphosphonatetreated Individuals In Low- And High Energy Fracture Conditions. *Scientific Reports*



LAMPIRAN

A. Penentuan Dosis Ekstrak Kedelai Hitam

- Penentuan dosis dihitung berdasarkan penelitian Safrida (2008), yaitu 10 gram berat kering (BK)/100 gram berat badan (BB) tikus.

- Konfersi pasta dari berat kering kedelai hitam.

Berat Kering kedelai hitam	:	Berat Pasta
3700 gram	:	56,4 gram
1 gram	:	0,086 gram

10 gram BK / 100 gram BB tikus

$$\frac{10 \text{ gram BK}}{100 \text{ gram BB}} = 0,1 \text{ gram BK / gram BB tikus}$$

- Rata-rata BB tikus = 200 gram

$$0,1 \times 200 = 20 \text{ gram BK / 200 gram BB mencit}$$

- Konfersi 200 gram tikus \rightarrow 20 gram BB mencit = 0,14.

$$20 \times 0,14 = 2,8 \text{ gram}$$

- Dikonfersikan ke pasta.

$$2,8 \times 0,086 = 0,24 \text{ gram pasta / 20 gram BB mencit}$$

$$\frac{0,24}{20} = 0,12 \text{ gram pasta / gram BB mencit}$$

- Rata-rata BB mencit perlakuan = 35 gram.

$$0,12 \times 35 = 0,42 \text{ gram}$$

- Penentuan dosis diambil dari acuan yaitu 0,42 gram (Dosis 2), setengah lebih rendah = 0,31 gram (Dosis 1) dan setengah lebih tinggi = 0,63 gram (Dosis 3).

B. Hasil Analisis *One Way Anova* Pengaruh Ekstrak Kedelai Hitam Terhadap Densitas Tulang

Descriptives

Densitas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol negatif	5	7,629199 6	1,48578077	,6644613 6	5,784359 1	9,474040 1	6,33564	9,96006
Kontrol Positif	5	,6301040	,39759137	,1778082 7	,1364291	1,123778 9	,12823	1,01972
Dosis 1	5	2,079974 0	,45018041	,2013268 0	1,521001 2	2,638946 8	1,73973	2,80000
Dosis 2	5	2,478072 0	,90347395	,4040458 4	1,356260 9	3,599883 1	1,32000	3,84036
Total	20	3,204337 4	2,84259790	,6356242 1	1,873960 6	4,534714 2	,12823	9,96006

Descriptives

Test of Homogeneity of Variances

Densitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,613	3	16	,226

ANOVA

Densitas

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	139,989	3	46,663	55,148	,000
Within Groups	13,538	16	,846		
Total	153,527	19			

DENSITAS

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05		
	1	2	3	1
Kontrol Positif Dosis 1	5	,630104 0		
Dosis 2	5		2,07997 40	
Kontrol negatif	5		2,47807 20	7,62919 96
Sig.		1,000	,504	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

C. Pengukuran Densitas Tulang

Pengukuran Densitas Tulang

Sebelum pemeriksaan ini menggunakan mikroskop cahaya biasa merk Nikon H500L yang dilengkapi dengan digital camera DS F12 300 megapixel dan software pengolah gambar Nikon Image System yang terkalibrasi pada perbesaran 100 x



Pengukuran densitas tulang dilakukan pada bagian metafisis tulang femur



Densitas tulang dinyatakan dalam persen, data setiap sampel diperoleh dengan cara membagi luas area tulang trabekule (μm^2) yang teramati dengan luas seluruh area pengukuran (Leswati et al., 2015).