



**STRUKTUR HISTOLOGI FEMUR MENCIT (*Mus musculus L.*) STRAIN
SWISS WEBSTER OVARIKTOMI PASCA PEMBERIAN
EKSTRAK TEPUNG TEMPE KEDELAI**

SKRIPSI

Oleh:

Arlina Mustika Sari

NIM 111810401051

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

2015



**STRUKTUR HISTOLOGI FEMUR MENCIT (*Mus musculus L.*) STRAIN
SWISS WEBSTER OVARIKTOMI PASCA PEMBERIAN
EKSTRAK TEPUNG TEMPE KEDELAI**

SKRIPSI

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

Oleh:

Arlina Mustika Sari

NIM 111810401051

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

2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada:

1. ayahanda Hendro Kaserijanto dan ibunda Siti Khuzaimah yang telah mendampingi, menjaga, dan memberikan segalanya baik berupa dukungan moral, material, doa, serta kasih sayang yang tiada hentinya kepada saya;
2. ketiga saudara laki-laki saya Priyo Hendro Purwanto, Agung Nugroho, dan Anang Ndaru Pambagyo yang selalu memotivasi dan menjadi inspirasi bagi saya;
3. bapak ibu guru TK Tunas Muia, SDN 1 Karangharjo, SMPN 1 Genteng, dan SMAN 1 Genteng yang telah memberikan ilmu dan bimbingannya dengan penuh kesabaran;
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

“Cobalah tidak untuk menjadi seseorang yang sukses, tetapi menjadi seseorang yang bernilai”
(Albert Einstein)*

“Bertakwalah pada Allah maka Allah akan mengajarimu. Sesungguhnya Allah Maha Mengetahui segala sesuatu.” Salah satu kunci mendapatkan ilmu adalah:
TAQWA.
(Surat Al-Baqarah ayat 282)**

*) Albert-Einstein <http://iphincow.com/albert-einstein/>

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

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Arlina Mustika Sari

NIM : 111810401051

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Struktur Histologi Femur Mencit (*Mus Musculus L.*) Strain Swiss Webster Ovariektomi Pasca Pemberian Ekstrak Tepung Tempe Kedelai” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini didanai oleh Dra. Mahriani, M.Si dan hasil penelitian tidak dapat dipublikasikan tanpa izin 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, 10 November 2015

Yang Menyatakan

Arlina Mustika Sari

NIM 111810401051

SKRIPSI

**STRUKTUR HISTOLOGI FEMUR MENCIT (*Mus musculus L.*) STRAIN
SWISS WEBSTER OVARIETOMI PASCA PEMBERIAN
EKSTRAK TEPUNG TEMPE KEDELAI**

Oleh:

Arlina Mustika Sari

NIM 111810401051

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota : Eva Tyas Utami, S.Si, M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul "Struktur Histologi Femur Mencit (*Mus Musculus L.*) Strain Swiss Webster Ovariektomi Pasca Pemberian Ekstrak Tepung Tempe Kedelai" telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember.

Tim Penguji,

Ketua,

Sekretaris,

Dra. Mahriani, M.Si

NIP 195703151987022001

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

NIP 197306012000032001

Anggota I,

Anggota II,

Dr. Hidayat Teguh W., M.Pd

NIP 195805281988021001

Dra. Susantin Fajariyah, M.Si

NIP 196411051989022001

Mengesahkan

Dekan,

Prof. Drs. Kusno, DEA., Ph.D.

NIP 196101081986021001

RINGKASAN

Struktur Histologi Femur Mencit (*Mus Musculus L.*) Strain Swiss Webster Ovariectomi Pasca Pemberian Ekstrak Tepung Tempe Kedelai; Arlina Mustika Sari; 111810401051; 2015; 45 Halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Osteoporosis merupakan penyakit metabolisme tulang yang ditandai dengan pengurangan densitas tulang yang sebagian besar terjadi pada perempuan pasca menopause (Junqueira dan Carneiro, 1997). Salah satu penyebabnya adalah defisiensi estrogen (Djoko, 1997; Ang-sy, 1994). Dengan menurunnya estrogen pasca menopause, wanita akan kehilangan mineral tulang dengan sangat cepat, yaitu 3% per tahun yang menyebabkan resiko fraktur tulang menjadi lebih besar (Dawson-Hughes, 1996). Osteoporosis terutama terjadi pada tulang yang sebagian besar tersusun dari jaringan konselus, seperti korpus vertebralis, tilang pipih pada tengkorak, skapula, ilium, dan trabekula metafisis tulang panjang (Jubb *et al.*, 1991).

Penanggulangan osteoporosis pada umumnya menggunakan metode terapi Sulih Hormon (TSH) estrogen sintetis. Beberapa penelitian klinis menyebutkan bahwa Terapi Sulih Hormon (TSH) dengan dosis yang tepat, secara efektif dapat mengurangi resiko terjadinya osteoporosis, namun selain membutuhkan biaya yang mahal dalam jangka panjang TSH estrogen sintetis dapat menimbulkan beberapa efek penyakit berbahaya diantaranya kanker rahim dan kanker payudara (Nurrochmad *et al.*, 2010). Oleh sebab itu, banyak dilakukan penelitian untuk mencari alternatif terapi hormon estrogen eksogen berbahan dasar alami yang dapat bekerja secara efektif. Salah satu jenis hormon estrogen alami yang dapat digunakan adalah fitoestrogen yang merupakan substansi pada tanaman yang secara struktural maupun fungsional mirip dengan estradiol (Cassidy, 2003; Duffy, 2007).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak tepung tempe kedelai terhadap peningkatan jumlah osteoblas dan penurunan jumlah

osteoklas pada femur mencit betina galur Swiss Webster ovariektomi. Metode yang digunakan adalah metode eksperimental murni menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis perlakuan dan lamanya pemberian ekstrak tepung tempe kedelai. Variabel terikatnya adalah jumlah osteoblas dan osteoklas tulang femur mencit yang diovariektomi. Pada penelitian ini digunakan 30 ekor mencit (*Mus musculus* L.) strain Swiss Webster ovariektomi umur 90 hari dengan berat rata-rata 35 gram. Hewan uji tersebut dibagi dalam lima kelompok, masing-masing menggunakan tiga ulangan, dengan pembagian sebagai berikut: kontrol negatif (tidak diovariektomi dan tidak diberi ekstrak tepung tempe kedelai), kontrol positif (diOVX, tetapi tidak diberi ekstrak tepung tempe kedelai), Dosis 1 (diovariektomi, diberi ekstrak tepung tempe kedelai 0,12 gram/ml /hari), Dosis 2 (diOVX dan diberi ekstrak tepung tempe kedelai 0,24 gram/ml /hari), Dosis 3 (diOVX dan diberi ekstrak tepung tempe kedelai 0,63 gram/ml /hari). Parameter yang diamati pada penelitian ini meliputi jumlah dari sel osteoblas dan sel osteoklas pada preparat penampang membujur histologi metafisis femur mencit dengan ciri – ciri sel osteoblas berbentuk kubus atau kolumnar dalam keadaan aktif atau berbentuk pipih jika dalam keadaan tidak aktif, serta sel osteoklas yang berukuran besar berbentuk tidak beraturan, dan berinti banyak.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak tepung tempe kedelai pada dosis 0,21 g/ml/hari, 0,42 g/ml/hari dan 0,63 g/ml/hari mengakibatkan peningkatan rata-rata jumlah sel osteoblas dan penurunan rata-rata jumlah sel osteoklas selama 10 hari dan 20 hari pada mencit betina strain Swiss Webster ovariektomi. Pemberian ekstrak tepung tempe kedelai dengan dosis 0,63 gram/ml/hari selama 10 hari dan dosis 0,42 gram/ml/hari selama 20 hari mampu meningkatkan jumlah sel osteoblas dan menurunkan jumlah sel osteoklas pada mencit betina strain Swiss Webster ovariektomi.

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: ” Struktur Histologi Femur Mencit (*Mus Musculus L.*) Strain Swiss Webster Ovariectomi Pasca Pemberian Ekstrak Tepung Tempe Kedelai”. 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 Eva Tyas Utami, S.Si.,M.Si. selaku Dosen Pembimbing yang telah sabar meluangkan waktu dan pikirannya untuk memberikan pengarahan, bimbingan, dan motivasi hingga terselesaikannya skripsi ini;
2. Dr. Hidayat Teguh W., M.Pd. dan Dra. Susantin Fajariyah, M.Si. selaku dosen penguji yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, kritik dan saran guna terselesaikannya skripsi ini dengan baik;
3. Dr. Rer. Nat Kartika Senjarini, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang sejak mahasiswa baru hingga terselesaikannya skripsi ini mendampingi dan mengarahkan saya;
4. seluruh dosen pengajar, staff akademik, teknisi (bu Evi, bu Ulva, pak Tris), satpam fakultas yang telah mendukung dan membantu dalam masa perkuliahan hingga terselesaikannya skripsi ini;
5. staff teknisi LPPT 4 pak Wasino, staff laboratorium Patologi Anatomi Fakultas kedokteran UGM pak Yunadir dan pak Mantri, serta staff laboratorium Patologi Anatomi Fakultas kedokteran hewan UGM drh. Sugiono dan pak lilik yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian ini;
6. ayahanda Hendro Kaserijanto dan ibunda Siti Khuzaimah yang telah mendampingi, mendukung dan mendoakan demi terselesaikannya skripsi ini;

7. Muhammad Nasikhul Ibad sebagai teman terbaik yang selalu membantu, memotivasi, dan mendampingi saya hingga skripsi ini terselesaikan dengan baik;
8. teman perjuangan team research kombi zoologi tercinta Dia Qori Yaswinda, Nidaul Hikmah, Riza Oktaviana, mbak Gusti, mbak Cici, mbak Maya atas bantuan, semangat, dan kebersamaannya dalam suka, duka, sehat, dan sakit;
9. saudara seperjuangan AMPHIBI yang super sekali kebersamaan, semangat, dan kenangannya hingga sampai pada akhir masa perkuliahan dan tercapainya cita-cita bersama S.Si.

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, 10 November 2015

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	3
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Struktur Histologi Femur	5
2.1.1 Bioremodeling Tulang (Osifikasi)	6
2.1.2 Struktur Sel Tulang	8
2.2 Osteoporosis pada Kondisi Hipoestrogenik Pasca Menopause	10
2.3 Peran Hormon Estrogen dalam Homeostatis Bioremodeling Tulang	12
2.4 Kandungan Senyawa Aktif Tempe Kedelai	13
2.5 Hipotesis	14

BAB 3. METODE PENELITIAN	15
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	15
3.2 Alat dan Bahan	15
3.2.1 Alat	15
3.2.1.1 Alat Pemeliharaan Mencit.....	15
3.2.1.2 Alat Ovariectomi (OVX)	15
3.2.1.3 Alat Ekstraksi Tepung Tempe Kedelai	15
3.2.1.4 Alat Pembuatan Sediaan Preparat Histologi	15
Femur Mencit	15
3.2.2 Bahan	16
3.2.2.1 Bahan Pemeliharaan Mencit.....	16
3.2.2.2 Bahan Ovariectomi (OVX).....	16
3.2.2.3 Bahan Ekstraksi Tepung Tempe Kedelai	16
3.2.2.4 Bahan Pembuatan Sediaan Preparat Histologi	
Femur Mencit	16
3.3 Rancangan Penelitian	17
3.3 Prosedur Penelitian	17
3.5 Metode	18
3.5.1 Persiapan Hewan Uji	18
3.5.2 Pembuatan Mencit Ovariectomi	19
3.5.2 Pembuatan Ekstrak Tepung Tempe Kedelai	20
3.5.3 Perlakuan Hewan Percobaan	20
3.5.4 Pembuatan Sediaan Preparat Histologi Femur Mencit 20	
3.5.5.1 Fiksasi dan Dekalsifikasi.....	21
3.5.5.2 Dehidrasi dan Clearing.....	21
3.5.5.3 Embedding dan Sectioning.....	22
3.5.5.4 <i>Staining, Mounting</i> dan Pengamatan.....	22
3.5 Parameter Penelitian	23
3.6 Analisis Data	23
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	24
4.1 Pengaruh Ekstrak Tepung Tempe Kedelai terhadap	

Jumlah Osteoblas pada Gambaran Histologi Femur	
Mencit Strain Swiss Webster Ovariectomi (OVX).....	24
4.2 Pengaruh Ekstrak Tepung Tempe Kedelai terhadap	
Jumlah Osteoklas pada Gambaran Histologi Femur	
Mencit Strain Swiss Webster Ovariectomi (OVX).....	27
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	33
5.1 Kesimpulan.....	33
5.2 Saran	33
DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN.....	40

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 4.1 Rata-rata jumlah osteoblas pada preparat histologi femur mencit strain Swiss Webster ovariektomi pasca pemberian ekstrak tepung tempe kedelai 10 dan 20 hari	24
Tabel 4.2 Rata-rata jumlah osteoklas pada preparat histologi femur mencit strain Swiss Webster ovariektomi pasca pemberian ekstrak tepung tempe kedelai 10 dan 20 hari	28

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Histologi Femur.....	6
Gambar 2.2. Siklus remodeling tulang.....	7
Gambar 2.3 Struktur sel osteogenik, osteoblas, osteosit, dan osteoklas	10
Gambar 2.4 Srtuktur kimia estrogen endogen dan fitoestrogen.....	14
Gambar 3.1 Alur penelitian.....	18
Gambar 4.1 Grafik pengaruh ekstrak tepung tempe kedelai terhadap jumlah osteoblas pada preparat histologi femur mencit strain Swiss Webster ovariektomi pasca pemberian ekstrak tepung tempe kedelai 10 dan 20 hari	27
Gambar 4.2 Grafik pengaruh ekstrak tepung tempe kedelai terhadap jumlah osteoklas pada preparat histologi femur mencit strain Swiss Webster ovariektomi pasca pemberian ekstrak tepung tempe kedelai 10 dan 20 hari	30
Gambar 4.3 Struktur histologi femur mencit daerah metafisis dengan pengecatan HE (Haematoxilin-Eosin)	31
Gambar 4.4 Struktur histologi femur mencit daerah metafisis dengan pengecatan HE (Haematoxilin-Eosin)	32

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Penentuan Dosis	40
B. Hasil Uji Statistik <i>One way</i> ANOVA Pengaruh Ekstrak Tepung Tempe Kedelai terhadap Jumlah Sel Osteoblas Pada Struktur Histologi Femur Mencit Strain Swiss Webster Ovariectomi	41
C. Hasil Uji Statistik <i>One way</i> ANOVA Pengaruh Ekstrak Tepung Tempe Kedelai terhadap Jumlah Sel Osteoklas Pada Struktur Histologi Femur Mencit Strain Swiss Webster Ovariectomi	43

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tulang adalah jaringan aktif yang secara metabolik mengalami remodeling secara kontinyu oleh dua proses, yaitu pembentukan (formasi) oleh sel osteoblas dan penyerapan (resorpsi) oleh sel osteoklas (Seibel, 2005). Tulang berfungsi sebagai kerangka penopang, tulang, sebagai tempat penyimpanan sebagian besar kalsium (Ca) tubuh dan berperan mempertahankan Ca darah dalam kisaran normal melalui keseimbangan antara resorpsi tulang dan formasi tulang (Manolagas, 2000; Nakamura *et al.*, 2003). Apabila proses resorpsi tulang melebihi aktivitas formasi tulang maka dapat menyebabkan terjadinya osteoporosis (Speroff dan Fritz, 2005).

Osteoporosis merupakan penyakit metabolisme tulang yang ditandai dengan pengurangan densitas tulang yang sebagian besar terjadi pada perempuan pasca menopause (Junqueira dan Carneiro, 1997). Salah satu penyebabnya adalah defisiensi estrogen (Djoko, 1997; Ang-sy, 1994). Dengan menurunnya estrogen pasca menopause, wanita akan kehilangan mineral tulang dengan sangat cepat, yaitu 3% per tahun yang menyebabkan resiko fraktur tulang menjadi lebih besar (Dawson-Hughes, 1996). Osteoporosis terutama terjadi pada tulang yang sebagian besar tersusun dari jaringan konselus, seperti korpus vertebralis, tulang pipih pada tengkorak, skapula, ilium, dan trabekula metafisis tulang panjang (Jubb *et al.*, 1991). Berdasarkan analisis data resiko osteoporosis yang dilakukan oleh Departemen Kesehatan RI bersama PT. Fonterra Brands Indonesia tahun 2006, menyatakan bahwa prevalensi osteoporosis mencapai 41,75 %. Artinya, setiap 2 dari 5 penduduk Indonesia beresiko terkena osteoporosis. Angka ini lebih tinggi dari prevalensi dunia yang hanya 1 dari 3 beresiko terkena osteoporosis (Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2012)

Penanggulangan osteoporosis pada umumnya menggunakan metode terapi Sulih Hormon (TSH) estrogen sintetik. Beberapa penelitian klinis menyebutkan bahwa Terapi Sulih Hormon (TSH) dengan dosis yang tepat, secara efektif dapat

mengurangi resiko terjadinya osteoporosis, namun selain membutuhkan biaya yang mahal dalam jangka panjang TSH estrogen sintetis dapat menimbulkan beberapa efek penyakit berbahaya diantaranya kanker rahim dan kanker payudara (Nurrochmad *et al.*, 2010). Oleh sebab itu, banyak dilakukan penelitian untuk mencari alternatif terapi hormon estrogen eksogen berbahan dasar alami yang dapat bekerja secara efektif.

Salah satu jenis hormon estrogen alami yang dapat digunakan adalah fitoestrogen yang merupakan substansi pada tanaman yang secara struktural maupun fungsional mirip dengan estradiol (Cassidy, 2003; Duffy, 2007). Senyawa fitoestrogen tersebut diantaranya adalah *isoflavon*, *lignans*, *coumestans*, dan *tripterene glycosides* (Achadiat, 2003). Beberapa penelitian mengkaji kandungan fitoestrogen pada tanaman yang dapat digunakan sebagai alternatif terapi estrogen eksogen diantaranya yaitu Silvia (2012), yang menyatakan bahwa ekstrak etanol 70 % buah kacang panjang dengan kandungan flavonoid cukup tinggi menunjukkan efek antiosteoporosis optimum pada dosis 100 mg/200 gram BB tikus. Penelitian oleh Nurdiana (2011), menyatakan bahwa ekstrak kacang tunggak yang memiliki kandungan fitoestrogen dengan dosis 0,5 ml/kg BB dapat menurunkan jumlah osteoklas pada tikus ovariektomi selama 1 dan 2 bulan. Selain itu, penelitian lain dilakukan Dianingati *et al.*, (2013), menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak kulit jeruk bali yang mengandung fitoestrogen dengan susu tinggi kalsium (dosis 500 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB) berpotensi meningkatkan densitas tulang tikus betina ovariektomi.

Berdasarkan uraian diatas, perlu dilakukan penelitian menggunakan ekstrak tepung tempe kedelai sebagai sumber fitoestrogen yang potensial. Tempe merupakan makanan sebagai sumber gizi baik yang dikonsumsi oleh mayoritas masyarakat Indonesia. Tempe terbuat dari biji kedelai mengandung 99% isoflavon yang dapat mengurangi resiko osteoporosis (Naim *et al.*, 1974 ; Messina, 1999). Penelitian ini penting dilakukan untuk mengkaji pengaruh fitoestrogen yang terkandung dalam ekstrak etanol 70% tepung tempe kedelai sebagai alternatif terapi sulih hormon estrogen eksogen pada wanita pasca menopause untuk dapat mengurangi resiko osteoporosis.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, diperoleh rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah ekstrak tepung tempe kedelai berpengaruh terhadap peningkatan jumlah osteoblas dan penurunan jumlah osteoklas pada femur mencit betina galur Swiss Webster ovariektomi?
2. Berapakah dosis pemberian ekstrak tepung tempe kedelai yang berpengaruh terhadap peningkatan jumlah osteoblas dan penurunan osteoklas pada femur mencit betina galur Swiss Webster ovariektomi?
3. Berapakah lama waktu pemberian ekstrak tepung tempe kedelai yang berpengaruh terhadap peningkatan jumlah osteoblas dan penurunan osteoklas pada femur mencit betina galur Swiss Webster ovariektomi?

1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah diatas, tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh ekstrak tepung tempe kedelai terhadap peningkatan jumlah osteoblas dan penurunan jumlah osteoklas pada femur mencit betina galur Swiss Webster ovariektomi.
2. Mengetahui dosis pemberian ekstrak tepung tempe kedelai yang berpengaruh terhadap peningkatan jumlah osteoblas dan penurunan osteoklas pada femur mencit betina galur Swiss Webster ovariektomi.
4. Mengetahui lama waktu pemberian ekstrak tepung tempe kedelai yang berpengaruh terhadap peningkatan jumlah osteoblas dan penurunan osteoklas pada femur mencit betina galur Swiss Webster ovariektomi.

1.5 Manfaat

Hasil yang didapatkan dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai manfaat tepung tempe kedelai sebagai salah satu alternatif terapi sulih hormon estrogen eksogen pada wanita pasca menopause untuk dapat mengurangi resiko osteoporosis.

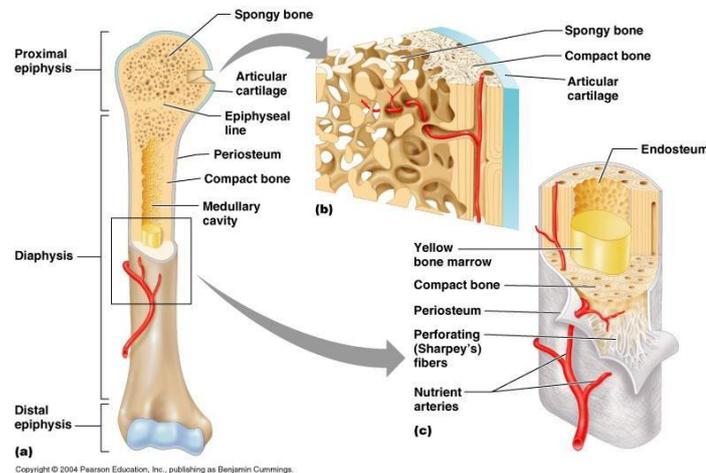
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Struktur Histologi Femur

Sebagai unsur utama sistem rangka dewasa, jaringan tulang berguna untuk penopang jaringan, melindungi organ vital seperti yang terdapat pada tengkorak, rongga dada, mengandung sumsum tulang didalamnya, dan tempat pembentukan sel-sel darah. Secara fisiologi, tulang juga berfungsi sebagai tempat penimbunan atau pembebasan kalsium, fosfat dan ion-ion lain untuk mempertahankan konsentrasi yang terkendali dalam cairan tubuh (Junqueira dan Carneiro, 2007). Tulang adalah jaringan aktif yang secara metabolik mengalami remodeling secara kontinyu oleh dua proses, yaitu pembentukan (formasi) dan penyerapan (resorpsi) tulang (Seibel, 2005). Menurut Djojosoebagio (1996), tulang terdiri atas sel-sel (osteoblas, osteosit, osteoklas), matriks organik yang disusun oleh kolagen dan bahan dasar yang mengandung mukopolisakarida, serta mineral.

Berdasarkan klasifikasi bentuknya, tulang femur termasuk dalam tulang panjang. Tulang ini memiliki *corpus* berbentuk tubular, diafisis, dan juga dijumpai epifisis pada bagian ujungnya. *Corpus* mempunyai *civitas medullaris* dibagian tengah yang berisi sum sum tulang, bagian luarnya terdiri dari tulang kompakta yang dilingkupi oleh selubung jaringan ikat yang disebut *periosteum*. Ujung tulang panjang tersusun atas tulang spongiosa yang diselimuti oleh selapis tipis tulang kompak. Selama masa pertumbuhan, diafisis dipisahkan dengan daerah epifisis oleh lempeng tulang rawan yaitu lempeng epifisis, yang merupakan tempat terjadinya perpanjangan tulang (Geneser, 1994). Penampang memanjang lempeng epifisis yang sedang tumbuh mempunyai empat daerah, dimulai dari epifisis ke arah diafisis yaitu zona *resting* kartilago, zona proliferasi yaitu kondrosit membelah diri dengan cepat membentuk deretan sejajar sepanjang sumbu tulang, zona maturasi (hipertropi) yaitu sel kondrosit membesar dimana sitoplasmanya menimbun glikogen, dan zona kalsifikasi serta osifikasi terjadi

kematian kondrosit (Dellman dan Brown, 1989). Struktur histologi femur dapat dilihat pada Gambar 2.1.



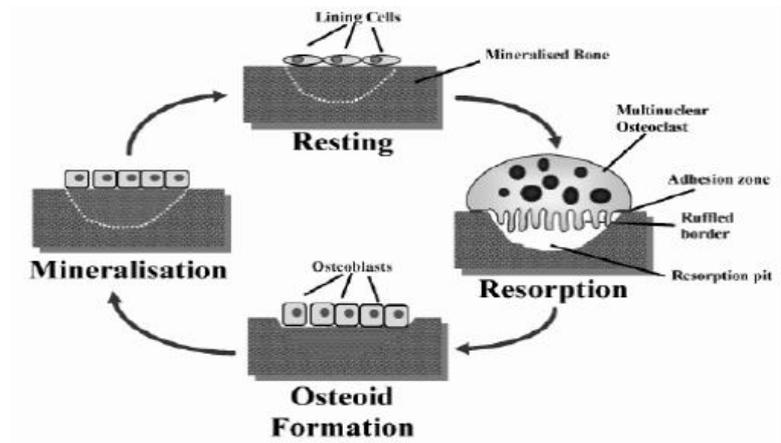
Gambar 2.1 Histologi femur (Tortora dan Dericson, 2011)

Secara dinamis, tulang terus menerus melakukan proses penyusunan jaringan tulang baru dan perombakan jaringan tulang lama yang disebut sebagai remodeling tulang. Pada individu muda proses ini berlangsung 200 kali lebih cepat jika dibandingkan dengan individu dewasa. Proses remodeling yang berhubungan langsung dengan fungsi homeostasis mineral tulang dipengaruhi hormon dalam tubuh seperti parathormon, kalsitonin, dan estrogen (Junqueira dan Carneiro, 2005).

2.1.1 Bioremodeling Tulang (Osifikasi)

Siklus remodeling tulang dimulai dari perekrutan perkursor osteoklas yang kemudian berdiferensiasi menjadi osteoklas setelah menerima signal dari osteoblas. Osteoklas yang sudah matur mensintesis enzim proteolitik yang mencerna matriks kolagen dan terjadi proses resorpsi tulang yang merupakan tahap awal siklus remodeling. Fase selanjutnya dari siklus ini adalah proteoblas ditarik dari steam sel mesenkim ke dalam sumsum tulang. Osteoblas yang sudah matur mensintesis matriks tulang terutama kolagen tipe I dan juga mengatur mineralisasi tulang baru. Selain itu, beberapa dari osteoblas tersebut akan

terjebak dalam mineralisasi tulang yang kemudian menjadi osteosit (Thomas, 2012). Siklus bioremodeling tulang dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Siklus remodeling tulang (Seibel, 2005)

Pada individu normal, siklus remodeling tulang berjalan seimbang kecuali pada tahap pertumbuhan yang dialami oleh anak-anak yaitu proses pembentukan berjalan lebih aktif daripada proses resorpsi. Dalam keadaan seperti ini tulang dapat merespon tekanan kondisi lingkungan yang disesuaikan dengan kekuatan mekanis yang dimiliki untuk mencegah resiko terjadinya fraktur (Sylvia & Loraine, 1995). Berdasarkan asal embriologisnya osifikasi dibagi menjadi dua jenis yaitu osifikasi intramembran dan osifikasi endokondral.

a. Osifikasi Intramembran

Osifikasi intramembran berasal dari sel mesenkim yang berdiferensiasi menjadi osteoblas pada pusat osifikasi secara langsung tanpa melalui pembentukan kartilago terlebih dahulu. Selama proses osifikasi, sel-sel mesenkim berproliferasi ke area yang memiliki vaskularisasi tinggi pada jaringan penghubung embrionik dalam pembentukan pusat osifikasi primer. Sel-sel ini kemudian mensintesis matriks tulang di bagian periperal dan berlanjut hingga membentuk osteoblas. Setelah itu, tulang akan dibentuk lagi dan digantikan oleh struktur jaringan lamela dewasa. Osifikasi intramembran bertujuan untuk pembentukan tulang pipih, pertumbuhan tulang pendek, dan penebalan tulang panjang (Leeson et al, 1996 : Junqueira dan Carneiro, 2005).

b. Osifikasi Endokondral

Osifikasi endokondral merupakan proses mineralisasi jaringan tulang yang terbentuk melalui pembentukan kartilago terlebih dahulu. Proses terjadinya osifikasi ini secara tidak langsung melalui pembentukan tulang rawan terlebih dahulu yang kemudian akan berganti menjadi struktur tulang dewasa. Osifikasi ini terjadi pada pembentukan tulang panjang yang berawal dari pemanjangan dan perluasan kartilago melalui proliferasi kondrosit dan deposisi matriks kartilago. Selanjutnya, kondrosit yang berada di sentral kartilago mengalami pemasakan menuju hipertropik kondrosit. Setelah pusat osifikasi primer terbentuk maka rongga sumsum tulang akan meluas menuju ujung-ujung epifisis tulang rawan dan kondrosit tersusun dalam kolom-kolom memanjang pada tulang. Pada tahapan terakhir osifikasi ini berlangsung pada zona-zona tulang yang berlangsung secara berurutan (Leeson *et al*, 1996: Junqueira dan Carneiro, 2005).

2.1.2 Struktur Sel Tulang

Osteoblas

Osteoblas merupakan bentuk dari diferensiasi sel osteoprogenitor. Secara struktural osteoblas merupakan sel yang berbentuk kubus atau kolumnar dalam keadaan aktif dan berbentuk pipih dalam keadaan tidak aktif, memiliki diameter antara 20-30 μm yang terlihat sangat jelas di daerah sekitar lapisan osteoid tempat jaringan tulang baru terbentuk. Membran plasma osteoblas bersifat khas yaitu kaya enzim alkali fosfatase yang konsentrasinya dalam serum digunakan sebagai indeks adanya pembentukan tulang. Sel osteoblas yang sudah matur memiliki banyak aparatus golgi yang berkembang baik sebagai sel sekretori, sitoplasma yang bersifat basofilik, dan terdapat banyak retikulum endoplasma. Sel ini berfungsi untuk menginisiasi dan mengontrol proses mineralisasi osteoid. Selain, itu osteoblas juga menghasilkan faktor pertumbuhan bersama dengan protein tulang morfogenetik dan berperan dalam sintesis reseptor hormon (Kierszenbaum, 2002). Dalam penelitian Ried (1996) disebutkan bahwa di dalam osteoblas ditemukan reseptor dari hormon estrogen dan kalsitriol.

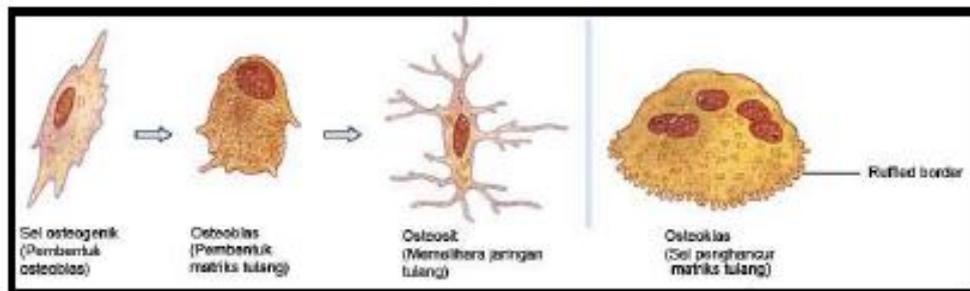
Osteosit

Osteosit merupakan sel yang telah dewasa pada tulang, berperan dalam mengatur metabolisme seperti pertukaran nutrisi dan zat sisa dengan darah. Proses pertukaran ini diperantarai oleh suatu kanal yang terdapat pembuluh darah dan berfungsi sebagai penyalur yang disebut sebagai kanalikuli (Lian dan Stein, 1996). Osteosit merupakan hasil diferensiasi sel osteoblas yang terletak diantara lamela matriks dalam lakuna pada saat pembentukan lapisan permukaan tulang berlangsung. Sel osteosit secara aktif terlibat dalam mempertahankan matriks tulang dan kematian sel yang diikuti oleh proses resorpsi matriks tersebut sehingga osteosit memiliki peran lebih penting pada saat perbaikan tulang daripada proses pembentukan tulang (Junqueira dan Carneiro, 2005) ; Tortora dan Derrickson, 2009). Osteosit memiliki struktur lebih kecil dari osteoblas karena kehilangan sebagian dari komponen sitoplasmanya. Struktur osteosit muda menyerupai sel osteoblas dewasa yang memiliki aparatus golgi dan retikulum endoplasma kasar yang terlihat lebih jelas, serta terdapat lisosom dalam jumlah banyak. Osteosit dapat berhubungan dengan osteosit lainnya melalui penjuruan sitoplasma melewati kanalikuli yang berfungsi untuk membantu koordinasi respon tulang terhadap stress atau deformasi (Stevenson dan Marsh, 1992).

Osteoklas

Osteoklas adalah sel raksasa berasal dari peleburan monosit yang terkonsentrasi di endosteum dan dapat melepaskan enzim lisosom untuk memecah protein dan mineral pada matriks ekstraselulernya. Osteoklas berasal dari sel progenitor yang berbeda dengan sel tulang lainnya, karena tidak berasal dari sel mesenkim, melainkan dari jaringan mieloid yaitu monosit atau makrofag pada sumsum tulang (Smith, 1993 ; Ott, 2002). Osteoklas merupakan fusi dari beberapa monosit sehingga bersifat multinukleus (10-20 nukleus) berukuran besar yang berada di tulang kortikal atau tulang trabekular (Markus *et al*, 1996). Osteoklas berfungsi dalam mekanisme osteoklastogenesis, aktivasi resorpsi kalsium tulang dan kartilago, serta merespon sistem hormonal yang dapat menurunkan struktur dan fungsi tulang (Boyle *et al*, 2003). Dalam proses resorpsi tulang osteoklas

mensekresi enzim kolagenase dan enzim proteinase yang berfungsi untuk melarutkan matriks organik dalam tulang, serta asam laktat dan asam sitrat yang berguna untuk memecah garam-garam yang terkandung di dalam tulang (Telford dan Bridgman, 1995). Melalui proses ini, osteoklas ikut berperan dalam sejumlah proses fisiologi didalam tubuh yaitu mempertahankan keseimbangan kalsium darah, pertumbuhan dan perkembangan tulang, serta perbaikan tulang setelah mengalami fraktur (Derek *et al*, 2007). Aktivitas osteoklas dipengaruhi oleh beberapa hormon, yaitu: hormon sitokinin, hormon paratiroid (PTH), dan hormon tiroid berupa kalsitonin. Osteoklas bersama dengan hormon paratiroid (PTH) berperan dalam pengaturan kadar kalsium dalam darah sehingga dijadikan target pengobatan osteoporosis (Junqueira dan Carneiro, 2005; Tortora dan Derrickson, 2009).



Gambar 2.2 Struktur sel osteogenik, osteoblas, osteosit, dan osteoklas (leeson *et al.*, 1996)

2.2 Osteoporosis Pada Kondisi Hipoestrogenik Pasca Menopause

Akibat bertambahnya usia, secara fisiologi menyebabkan hilangnya sebagian massa tulang yang disebut osteopenia. Jika dibiarkan, keadaan ini akan semakin buruk karena osteopenia yang melewati ambang batas untuk terjadinya fraktur (Fracture threshiod) disebut sebagai osteoporosis. Keadaan ini memiliki ciri-ciri yaitu jumlah komponen tulang yang mengisi jaringan berkurang, namun secara struktural masih dalam keadaan normal (Isbagio, 1995). Menurut Sennang *et al* (2006), Osteoporosis merupakan penyakit metabolisme tulang yang ditandai dengan pengurangan densitas tulang, kemunduran mikroarsitektur tulang, dan peningkatan fragilitas tulang sehingga mengakibatkan resiko fraktur yang lebih besar. Resiko bertambahnya angka penderita osteoporosis semakin meningkat

dengan bertambahnya populasi manusia lanjut usia. Sebagian besar kasus osteoporosis melibatkan perempuan pasca menopause yang disebut sebagai osteoporosis Tipe 1 (Post Menopausal Osteoporosis) (Djoko, 1997).

Secara alamiah, pada usia klimakterium (40 tahun) seorang wanita akan mengalami masa menopause yang ditandai dengan penurunan hormon estrogen yang dapat menimbulkan terganggunya sistem reproduksi. Menopause adalah suatu masa yang dialami oleh wanita yang ditandai menurunnya fungsi ovarium yaitu dengan tidak adanya pertumbuhan folikel. Kejadian ini dimulai ketika seorang wanita berumur 45 – 54 tahun mengalami amenorea selama 12 bulan. Pada wanita normal, jumlah folikel di dalam ovariumnya sudah ditentukan pada saat fetus. Jumlah folikel ini tidak akan mengalami peningkatan, tetapi setelah memasuki masa pubertas jumlah ini justru akan mengalami pengurangan setiap bulannya. Satu folikel akan berkembang maksimal dan diikuti dengan atresia (kerusakan beberapa folikel). Folikel dalam ovarium khususnya pada sel teka dan sel granulosa berperan dalam sintesis hormon estrogen (Hafez, 2000). Akibatnya, setelah terjadi menopause seorang wanita akan mengalami penurunan kadar estrogen dalam tubuhnya, meskipun hormon estrogen ini masih dapat dikonfersikan dari jaringan tubuh terutama lemak dan otot. Namun senyawa estrogen yang dihasilkan adalah estron, yaitu jenis estrogen yang memiliki aktivitas estrogenik lebih rendah dibandingkan dengan jenis estrogen dari hasil pertumbuhan folikel dalam ovarium yaitu estradiol (DeGroot, 1995).

Akibat penurunan estrogen tersebut, seorang wanita yang memasuki masa menopause akan mengalami berbagai macam gejala, baik dalam jangka pendek maupun dalam jangka panjang. Dalam jangka pendek wanita menopause akan mengalami ketidakstabilan vasomotor (berdebar-debar, banyak berkeringat, sakit kepala), gejala psikologis (mudah tersinggung, emosi labil, pelupa), urogenital (vagina kering, nyeri senggama, keluhan urethra), kulit dan rambut akan mengering, serta kerapuhan kuku, sedangkan dalam jangka panjang akan menimbulkan efek seperti osteoporosis, penyakit kardiovaskuler, dan Dementia Alzheimer (Pramono, 1998).

Pada tipe ini, akan terjadi osteoporosis spinal (trabekular) yang mengakibatkan terjadinya fraktur tulang belakang. Seiring dengan bertambahnya usia resiko osteoporosis tipe ini juga terjadi pada tulang panjang (kortikal) yang menyebabkan terjadinya fraktur femur (Silvia, 2012).

2.3 Peran Hormon Estrogen dalam Homeostasis Bioremodeling Tulang

Estrogen merupakan hormon seks steroid yang memegang peran sangat penting dalam metabolisme tulang, mempengaruhi aktivitas osteoblas maupun osteoklas, dan menjaga keseimbangan kerja dari kedua sel tersebut melalui pengaturan produksi faktor parakrin utamanya oleh sel osteoblas. Osteoblas memiliki reseptor alpha dan betha ($ER\alpha$ dan $ER\beta$) didalam sitosol. Dalam proses diferensiasinya osteoblas mengekspresikan reseptor betha ($ER\beta$) 10 kali lipat dari reseptor estrogen alpha ($ER\alpha$) (Monroe *et al.*, 2003). Sub tipe reseptor inilah yang melakukan pengaturan homeostasis tulang dan terjadinya osteoporosis (Quaedackers *et al.*, 2001). Selain itu dalam kondisi normal, diferensiasi preosteoblas menjadi osteoblas melalui reseptor yang dimilikinya mampu menurunkan sekresi sitokin yaitu: Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) dan Tumor Necrosis Factor-Alpha ($TNF-\alpha$) yang dapat menstimulasi aktivitas osteoklas dalam penyerapan tulang,. Disisi lain, hormon estrogen dapat merangsang ekspresi osteoprotegerin (OPG) dan $TGF-\beta$ (Transforming Growth Factor- β) pada sel osteoblas dan sel stroma yang lebih lanjut dapat menghambat penyerapan tulang dan meningkatkan apoptosis sel osteoklas (Norman, 2003).

Defisiensi estrogen dapat menstimulasi proses osteoklastogenesis yang menyebabkan kehilangan massa tulang. Pemberian estrogen eksogen dapat menstimulasi pembentukan tulang kembali. Estrogen berperan penting dalam mengatur efek hormon paratiroid (PTH) pada tulang yang mana pada kadar tertentu dapat menurunkan kadar kalsium dalam serum, urin, dan hydroxyprolive pada wanita pasca menopause. Hormon estrogen juga berpengaruh pada metabolisme vitamin D, mengakibatkan penurunan absorpsi kalsium di usus yang disebabkan karena menurunnya kadar $1,25-OH-D_3$. Selain itu estrogen dapat

merangsang sekresi calcitonin yang mempunyai efek menghambat kerja osteoklas dalam meresorpsi tulang (Singer, 1997).

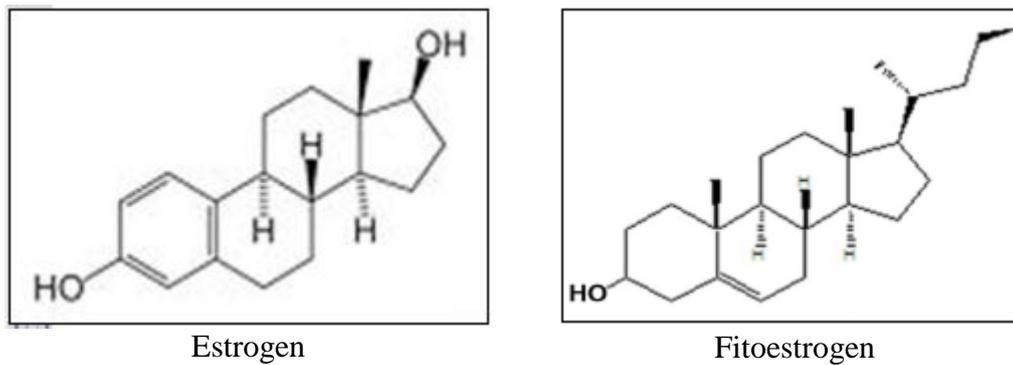
2.4 Kandungan Senyawa Aktif Tempe Kedelai

Tempe kedelai merupakan makanan tradisional Indonesia yang berasal dari biji kedelai yang telah melalui proses fermentasi menggunakan jamur *Rhizopus sp.* Tepung tempe kedelai memiliki 2 komponen utama yang berhubungan dengan osteoporosis yaitu fitoestrogen dan kalsium. Fitoestrogen dalam kacang kedelai adalah deidzein dan genistein yang memiliki struktur serta komposisi kimiawi mirip dengan β -estradiol atau estrogen pada wanita yang berperan dalam peningkatan reabsorpsi kalsium pada proses osteoblastik (Gambar 2.3) (Gyton dan Hall, 2008).

Murata *et al.*, (1967) menyatakan bahwa pada umumnya jumlah asam amino bebas, baik esensial maupun nonesensial dalam kedelai meningkat akibat proses fermentasi. Selain itu, keterlibatan mikroorganisme pada saat proses pembuatan tempe akan menyebabkan perubahan menjadi bergizi tinggi dan mudah dicerna akibat aktivitas enzim protease kapang yang menyebabkan protein terurai menjadi asam amino bebas. Tempe mempunyai kandungan protein yang tinggi dengan nilai PER (*Protein Efisiensi Ratio*) yang hampir setara dengan susu skim. Selain sebagai sumber gizi yang baik, tempe merupakan sumber isoflavon yang penting karena menurut analisis kuantitatif kromatogram HPLC pada tepung tempe mengandung 43,237 mg/100g berat basah atau 48,873 mg/100g berat kering (Nurdin, 2002)

Isoflavon merupakan salah satu bagian terbesar dalam golongan flavonoid. Pada tanaman kacang-kacangan senyawa ini ditemukan dalam jumlah yang cukup besar yaitu 0,25%. Sebanyak 99% isoflavon pada kedelai terdiri dari 64% genistein, 23% deidzein, dan 13% glicetin 7-0- β -glikosida (Naim *et al.*, 1974). Sari (2002) menyatakan bahwa jumlah komponen genistein dan daidzein dalam tepung kedelai berkisar 3,4 mg/100g, sedangkan pada tempe komponen genistein dan daidzein mencapai hampir sembilan kali lipatnya, yaitu 26,7 mg/100g. Fungsi estrogenik dapat terjadi karena fitoestrogen memiliki 2 gugus OH (hidroksil) yang

berjarak 1,0-11,5 Å pada intinya, sama dengan inti dari hormon estrogen. Dengan struktur pokok yang sama tersebut maka substrat ini akan memiliki afinitas tertentu untuk dapat menduduki *estrogen reseptors*.



Gambar 2.3 Struktur kimia estrogen endogen dan fitoestrogen (Guyton, 1996)

2.5 Hipotesis

Ekstrak tepung tempe kedelai dapat meningkatkan jumlah osteoblas dan menurunkan jumlah osteoklas pada femur mencit (*Mus musculus L.*) betina galur Swiss Webster yang diovariectomi.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Maret - Juni 2015. Tempat penelitian di Laboratorium Zoologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember, serta Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Unit 4 (LPPT 4) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari :

3.2.1.1 Alat Pemeliharaan Mencit

Kandang hewan percobaan 34 cm x 25 cm x 12 cm (bak plastik dan penutup dari ram kawat besi), botol minum mencit, jarum sonde lambung berujung tumpul (20 gauge, 5 cm).

3.2.1.2 Alat Ovariektomi (OVX)

Papan bedah, timbangan analitik 200 gram (OHAUS), *sprit injection* (Terumo Syringe 1 cc/ml) 0,45 x 13 mm, *sprit injection* (Terumo Syringe 3 ml) 0,65 x 32 mm, eskavator, *hecting set*, silet, jarum sutura no.2 (One Med).

3.2.1.3 Alat Ekstraksi Tepung Tempe Kedelai

Beaker glass 1000 ml, *beaker glass* 600 ml, *beaker glass* 200 ml, gelas ukur 100 ml, Botol schott 1000 ml, botol *schott* 500 mL, corong plastik kecil, pipet tetes, spatula, cawan porselen 75 cc, *grinder*, saringan tepung 60 mesh, *lab stirrer electricity*, *rotary evaporator*, *water bath*, baki *stainless steel*, oven (INCUCCELL), pisau, baki plastik, talenan, sendok, cup.

3.2.1.4 Alat Pembuatan Sediaan Preparat Histologi Tulang Femur Mencit

Timbangan analitik (OHAUS), sendok reagen, gelas ukur 1000 ml, botol reagen 1000 ml atau tabung erlenmeyer 1000 ml, *magnetic stirrer*, pH meter (*Mettler Toledo Seven Easy*), corong kaca, *object glass*, *cover glass*, *rotary microtom*, *staining jar*, botol flakon, *holder*, skalpel, oven (INCUCCELL), *hot plate*, mikroskop binokuler (Olympus) dengan aplikasi optilab viewer.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari:

3.2.2.1 Bahan Pemeliharaan Mencit

Mencit betina galur Swiss Webster usia 90 hari berat rata-rata 35 gram yang diperoleh dari LPPT 4 Universitas Gadjah Mada-Yogyakarta, *pellet* (CP 511), aquades, ekstrak tepung tempe kedelai, sekam padi, serbuk gergaji kayu.

3.2.2.2 Bahan Ovariektomi (OVX)

Paracetamol, ketamil 10%, *xyla*, benang *silk* no.3 (One Med), benang *cat gut* no.3 (One Med), betadin 10% (Povidone Iodine), alkohol 70% (Mediss), antibiotik (Levofloxacin), cairan infus 0,9% sodium chloride (Cotsu-NS), kasa steril (One Med), benang *silk* (One Med), benang *cat gut* (One Med), *povidone iodine*, *gloves*, masker, tisu.

3.2.2.3 Bahan Ekstraksi Tepung Tempe Kedelai

Tepung tempe kedelai, alkohol 70%, kain saring, kertas saring, tisu.

3.2.2.4 Bahan Pembuatan Sediaan Preparat Histologi Femur Mencit

Kloroform, sodium chlorida (Na Cl) (Merck), asam chlorida (HCl) (Merck), aquadest pH 7-7,5 (H₂O), ammonium oxalat (NH₄)₂ C₂O₄.H₂O (Merck), kain kasa (One Med), alkohol bertingkat, alkohol absolut, parafin, gliserin, albumin, HE (Hematoxylin - eosin), xylol, entelan.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis perlakuan dan lamanya pemberian ekstrak tepung tempe kedelai. Variabel terikatnya adalah jumlah osteoblas dan osteoklas tulang femur mencit yang diovariectomi. Pada penelitian ini digunakan 30 ekor mencit (*Mus musculus L.*) strain Swiss Webster ovariektomi umur 90 hari dengan berat rata-rata 35 gram. Hewan uji tersebut dibagi dalam lima kelompok, masing-masing menggunakan tiga ulangan, dengan pembagian sebagai berikut:

Kelompok 1: Kontrol negatif (tidak diovariectomi, tidak diberi ekstrak tepung tempe kedelai)

Kelompok 2: Kontrol positif (diovariectomi, tidak diberi ekstrak tepung tempe kedelai)

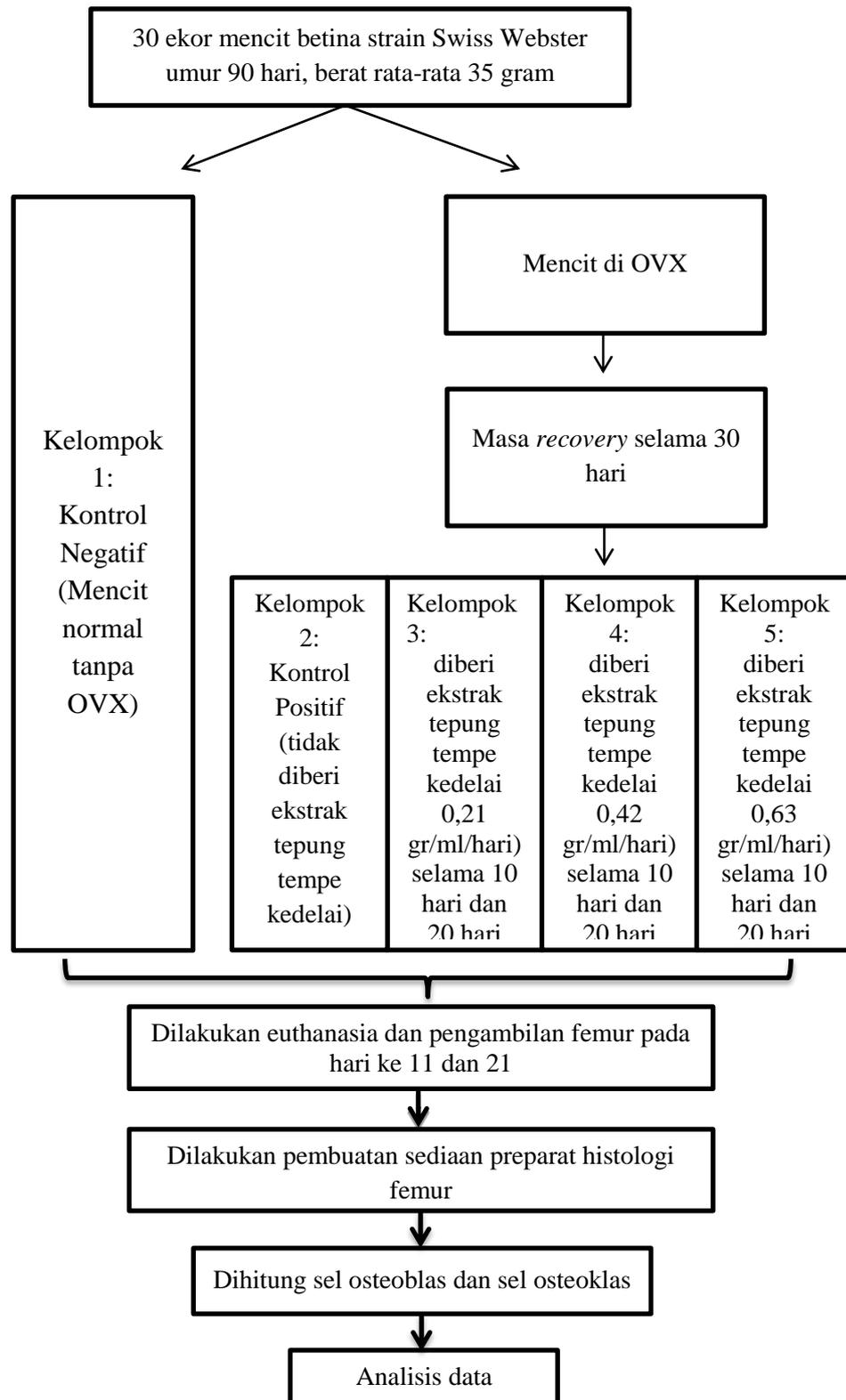
Kelompok 3: Dosis 1 (diovariectomi, diberi ekstrak tepung tempe kedelai 0,21 gram/ml /hari, selama 10 dan 20 hari yang dimulai pada hari ke-31 pasca ovariektomi)

Kelompok 4: Dosis 2 (diovariectomi, diberi ekstrak tepung tempe kedelai 0,42 gram/ml /hari, selama 10 dan 20 hari yang dimulai pada hari ke-31 pasca ovariektomi)

Kelompok 5: Dosis 3 (diovariectomi, diberi ekstrak tepung tempe kedelai 0,63 gram/ml /hari, selama 10 dan 20 hari yang dimulai pada hari ke-31 pasca ovariektomi)

3.4 Prosedur Penelitian

Penelitian ini merupakan salah satu penelitian pemanfaatan tepung tempe kedelai yang digunakan sebagai alternatif untuk mengurangi resiko osteoporosis. Alur penelitian yang dilakukan dalam penelitian pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.5 Metode

3.5.1 Persiapan Hewan Uji

Subjek penelitian ini terdiri dari 30 ekor mencit betina strain Swiss Webster ovariektomi umur 90 hari yang dipelihara dan diadaptasikan pada kandang yang terbuat dari plastik dan penutup ram kawat berukuran 34 cm x 25 cm x 12 cm beralas sekam padi dan serbuk gergaji kayu. Kandang pemeliharaan ini diletakkan pada ruangan dengan suhu $\pm 27^{\circ}\text{C}$ dan kelembaban relatif 77 % sebagai kondisi umumnya. Mencit diberi pakan standart berupa *pellet* (CP 511) dengan pemberian per hari 1/10 berat badan mencit (gram) dan minum aquades secara *ad libitum*.

3.5.2 Pembuatan Mencit Ovariektomi (OVX)

Prosedur ovariektomi yang dilakukan yaitu dengan mengambil kedua ovarium mencit. Mencit usia 90 hari dengan berat rata-rata 35 gram dianasthesi dengan ketamil 10% dan xyla dengan perbandingan 1:1 sebanyak 0,05 ml per mencit secara intramuskular. Sebelum dilakukannya operasi pembedahan, dilakukan sterilisasi pada papan bedah dan alat bedah dengan cara disemprot menggunakan alkohol 70%. Kemudian mencit diletakkan terlentang diatas papan operasi yang selanjutnya diolesi air sabun anti bakteri dan dicukur rambut bagian medial perut. Dioleskan antiseptik *povidone iodine* yang bertujuan untuk mencegah kontaminasi mikrobial. Langkah berikutnya yaitu diinsisi secara perlahan hingga membuka lapisan muskulus daerah abdomen (*M. obliquus abdominis eksternus* 1,5 cm dan *M. oblikus abdominis internus* 1 cm). Setelah terbuka, dikeluarkan ovariumnya dan dipotong pada daerah antara *oviduct* dan ovarium dengan beberapa tahapan yang pertama dijepit pada daerah ujung *oviduct* dengan klem arteri, kemudian diikat benang *silk* bagian pangkal batas klem arteri dan dipotong secara perlahan menggunakan gunting matzenbaum. Setelah ovarium berhasil diangkat, langkah selanjutnya yaitu arteri clamp dilepas, organ reproduksi kembali direposisi, dan diberi cairan infus 0,5 ml.

Langkah terakhir yang dilakukan yaitu penutupan bagian muskulus (*M. obliquus abdominis eksternus* dan *M. oblikus abdominis internus*) dengan cara dijahit menggunakan cat gut ukuran 3.0 dengan pola sederhana terputus. Pada

bagian kulit paling luar dijahit pola terputus menggunakan benang *silk* ukuran 3.0, selanjutnya dilakukan desinfeksi menggunakan *povidone iodine* pada daerah insisi, dan diinjeksi antibiotik Levofloxacin 0,05 ml . Perawatan luka pada masa penyembuhan dapat dilakukan dengan pemberian paracetamol (1 sendok teh / 200 ml aquades) selama 1 minggu secara *ad libitum*.

3.5.3 Pembuatan Ekstrak Tepung Tempe Kedelai

Tempe murni umur fermentasi 2 hari dicacah halus, ditimbang berat basah, kemudian dioven dalam suhu 40-45°C selama 2 hari, selanjutnya di *grinder* dan diayak dengan ayakan 60 mesh. Setelah di timbang berat kering, selanjutnya tepung tempe dimaserasi dalam alkohol 70% dengan perbandingan 1:4, *distirer* elektrik 500 rpm selama 15 menit dan didiamkan selama 2 x 24 jam. Langkah berikutnya yaitu disaring untuk mendapatkan filtrat, dimasukkan ke dalam *rotari evaporator* selama \pm 4-5 jam dengan suhu 80°C hingga didapatkan filtrat alami tanpa alkohol. Proses terakhir adalah diletakkan dalam cawan porselen dan dimasukkan pada *water bath* suhu 70°C selama \pm 8 jam untuk menghasilkan ekstrak tepung tempe dengan hasil konstan yang diharapkan ekstrak tidak mengandung air.

3.5.4. Perlakuan Hewan Percobaan

Perlakuan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah dengan memberikan ekstrak tepung tempe kedelai yang diberikan secara oral (metode *gavage*) menggunakan jarum sonde lambung. Dosis perlakuan dapat ditentukan berdasarkan penelitian Safrida (2008), yaitu dosis harian tikus ovariektomi yang diberi tepung tempe kedelai 10 gram berat kering/ 100 gram berat badan yang dikonversi menurut kebutuhan harian mencit dalam bentuk ekstrak (pasta) disesuaikan dengan masing-masing berat badan yang dirata-rata/kelompok uji. Pemberian ekstrak tepung tempe kedelai dimulai pada hari ke-31 pasca ovariektomi dengan cara mencairkan takaran pasta sesuai dosis yang ditetapkan (Lampiran A) dengan 1ml aquades/mencit/hari selama 10 hari dan 20 hari.

3.5.5 Pembuatan Sediaan Preparat Histologi Femur Mencit

Pada hari ke-11 dan ke-21 tiga mencit dari masing-masing kelompok perlakuan *dieuthanasia* menggunakan cairan kloroform dengan cara perinhalasi, kemudian dilakukan pembedahan dan diambil femurnya. Pembuatan preparat tulang dilakukan dengan dekalsifikasi untuk menghilangkan Ca^{2+} yang ada di dalam jaringan tulang, sehingga jaringan menjadi lunak dan dapat diproses dengan metode parafin (Handari, 1983). Pembuatan preparat histologi tulang dapat dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

3.5.5.1 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 jaringan tulang difiksasi secara kimiawi, dimasukkan dalam wadah yang berisi 200 ml larutan *Von Ebner's*, kemudian didiamkan dalam suhu kamar selama 24 jam. Pada hari berikutnya dilakukan uji proses dekalsifikasi yang dilakukan berhasil sempurna atau tidak 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.

Setelah pengujian selesai, proses dekalsifikasi jaringan tulang dilanjutkan dengan cara mengganti larutan perendaman dengan 200 ml larutan *Von Ebner's* baru yang diambil dari stok dan tambahkan 1 ml HCl pekat. Pengujian dekalsifikasi diulang sampai tidak terlihat adanya endapan putih. Jika masih terlihat adanya endapan putih pada pengujian, maka proses dekalsifikasi dilanjutkan dengan cara yang sama dan ditambahkan HCl pekat 1 ml pada setiap pengulangan. Setelah proses dekalsifikasi berhasil sempurna, jaringan tulang dipindahkan dalam larutan *Von Ebner's* baru yang ditambah dengan HCl sama seperti volum penambahan terakhir dan didiamkan selama 24 jam. Jaringan tulang yang selesai didekalsifikasi dibungkus dengan kain kassa, dicuci pada air mengalir minimal selama 2 jam, dibilas jaringan tulang dengan aquades dan

selanjutnya difiksasi ulang menggunakan PBS formalin pH 7,4 selama 2 jam (Sumaryati. 2012)

3.5.5.2 *Dehidrasi dan Clearing*

Proses dehidrasi dilakukan dengan merendam jaringan tulang pada alkohol bertingkat konsentrasi 70% hingga 95% masing-masing 1-2 jam. Selanjutnya digunakan alkohol absolut dan xylol dengan perbandingan 3:1, 1:1 dan 1:3 selama 30 menit. Proses berikutnya adalah penjernihan dengan menggunakan larutan xilol selama 3 jam.

3.5.5.3 *Embedding dan Sectioning*

Sampel diinfiltrasi dengan hard parafin pada suhu 48-55⁰C yang dilakukan secara bertingkat menggunakan xylol : parafin selama 30 menit dan parafin I, II, III selama 1 jam. Berikutnya, sampel direkatkan pada holder menggunakan skalpel dan bunsen yang kemudian dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan \pm 8-10 μ m. Selanjutnya, sayatan direkatkan pada gelas objek yang telah dilapisi gliserin dan albumin, disimpan dalam inkubator 4⁰C selama 24 jam, lalu dilakukan pewarnaan menggunakan *Harris Hematoxylin-Eosin* (HE).

3.5.5.4 *Staining, Mounting dan Pengamatan*

Pewarnaan dilakukan setelah sediaan preparat dideparafinisasi dengan cara direndam dalam larutan xylol *I* dan xylol *II* selama 30 menit, selanjutnya dicelupkan dalam alkohol bertingkat yang dimulai dari alkohol absolut, 95%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% masing-masing 2 menit, lalu dicuci pada air mengalir. Sediaan preparat dimasukkan dalam pewarna hematoxilin selama 15 detik, dicuci kembali dengan air mengalir, dibilas dengan alkohol bertingkat hingga konsentrasi 70%. Proses pewarnaan berikutnya yaitu memasukkan sediaan preparat dalam eosin selama 10 menit, dilanjutkan dengan dicelupkan pada alkohol bertingkat. Proses terakhir yaitu dimasukkan sediaan preparat dalam larutan clearing xylol yang bertujuan untuk memberi warna bening pada jaringan.

Preparat histologi ditetesi entellan kemudian ditutup dengan *cover glass* dikeringkan dalam *hot plate* yang bertujuan untuk menghilangkan gelembung udara, dilabeli untuk memudahkan proses pengamatan, dan dilanjutkan dengan pengamatan jumlah osteoblas dan osteoklas pada preparat menggunakan mikroskop binokuler (Olympus) perbesaran 400x dan aplikasi optilab viewer.

3.6 Parameter Penelitian

Parameter yang diamati pada penelitian ini meliputi jumlah dari sel osteoblas dan osteoklas dalam sediaan preparat metafisis femur mencit. Pengamatan rata-rata jumlah sel osteoblas dan sel osteoklas pada daerah metafisis merupakan metode sederhana yang dapat digunakan sebagai penanda aktivitas sel dalam proses remodeling tulang. Perhitungan dilakukan secara manual pada saat pengamatan menggunakan mikroskop binokuler (Olympus) perbesaran 400x dan aplikasi optilab viewer dengan ciri – ciri sel :

- a. Osteoblas : sel berbentuk kubus atau kolumnar dalam keadaan aktif, dan berbentuk pipih jika dalam keadaan tidak aktif.
- b. Osteoklas : sel berukuran besar, bentuknya tidak beraturan, dan berinti banyak.

3.7 Analisi Data

Data hasil penelitian yang diperoleh akan ditabulasi dan dilakukan analisis statistik secara kuantitatif menggunakan uji *one way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95% atau nilai sig. $\alpha = 0,05$. Selanjutnya, untuk mengetahui beda nyata antar kelompok uji dilakukan analisis *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) (Steel and Torrie, 1993).