



**EFEK EKSTRAK KEDELAI HITAM (*Glycine soja*) TERHADAP
JUMLAH SEL OSTEOKLAS DAN OSTEOKLAS FEMUR
MENCIT (*Mus musculus*) STRAIN SWISS WEBSTER
OVARIEKTOMI UNILATERAL**

SKRIPSI

**Oleh:
Fita Aprilia
NIM 121810401067**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2017**



**EFEK EKSTRAK KEDELAI HITAM (*Glycine soja*) TERHADAP
JUMLAH SEL OSTEOLAS DAN OSTEOKLAS FEMUR
MENCIT (*Mus musculus*) STRAIN SWISS WEBSTER
OVARIEKTOMI UNILATERAL**

SKRIPSI

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

Oleh:

Fita Aprilia

NIM 121810401067

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2017**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada:

1. Ayahanda Purnomo dan Ibunda Hayati 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. Saudara saya Tony Frustantio dan istrinya Fariza Devina yang selalu memberikan motivasi serta menjadi inspirasi bagi saya;
3. Bapak ibu guru TK Pg.Olean, SDN 4 Dawuhan, SMPN 1 Situbondo dan SMAN 1 Situbondo 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)*

“Barang siapa yang keluar untuk mencari ilmu maka ia berada di jalan Allah sampai ia kembali”
(HR Tirmidzi)**

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

***) Almath, MF. 2003. *1100 Hadist Terpilih*. Jakarta: Gema Insani Press.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fita Aprilia

NIM : 121810401067

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efek Ekstrak Tepung Kedelai Hitam (*Glycine soja*) Terhadap Jumlah Sel Osteoblas dan Osteoklas Tulang Femur Mencit (*Mus Musculus L.*) Strain Swiss Webster Ovariectomi Unilateral” 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, 21 Februari 2017

Yang Menyatakan

Fita Aprilia

NIM 121810401067

SKRIPSI

**EFEK EKSTRAK KEDELAI HITAM (*Glycine soja*) TERHADAP
JUMLAH SEL OSTEOLAS DAN OSTEOKLAS FEMUR
MENCIT (*Mus musculus*) STRAIN SWISS WEBSTER
OVARIEKTOMI UNILATERAL**

Oleh:

Fita Aprilia

NIM 121810401067

Pembimbing

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

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Ekstrak Tepung Kedelai Hitam (*Glycine soja*) Terhadap Jumlah Sel Osteoblas dan Osteoklas Tulang Femur Mencit (*Mus Musculus L.*) Strain Swiss Webster Ovariektomi Unilateral” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember.

Tim Penguji,

Ketua,

Dra. Mahriani, M.Si
NIP 195703151987022001

Anggota I,

Dra. Susantin Fajariyah, M.Si
NIP 196411051989022001

Sekretaris,

Eva Tyas Utami, S.Si., M.Si
NIP 197306012000032001

Anggota II,

Dr. Hidayat Teguh W., M.Pd
NIP 195805281988021002

Mengesahkan

Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D
NIP 196102041987111001



RINGKASAN

Efek Ekstrak Tepung Kedelai Hitam (*Glycine soja*) Terhadap Jumlah Sel Osteoblas dan Osteoklas Tulang Femur Mencit (*Mus Musculus L.*) Strain Swiss Webster Ovariektomi Unilateral; Fita Aprilia; 121810401067; 2017; 36 Halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Kedelai hitam merupakan tumbuhan *leguminosae* atau tumbuhan penghasil biji, yang mengandung senyawa fenolik dan isoflavon. Kedelai hitam merupakan salah satu makanan yang berfungsi sebagai sumber fitoestrogen karena isoflavon yang terkandung dalam kedelai hitam memiliki struktur yang mirip dengan estrogen endogen. Kemiripan struktur pada genestein dan daidzein tersebut menyebabkan reseptor estrogen dalam tubuh dapat berikatan dengan daidzein maupun genestein. Senyawa fitoestrogen yang terkandung dalam kedelai hitam jika dikonsumsi secara terus menerus dapat meningkatkan kadar estrogen dalam tubuh. Hormon tersebut dapat menekan resorpsi tulang sehingga mengakibatkan terhambatnya proses kerapuhan tulang. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak tepung kedelai hitam terhadap jumlah osteoblas dan osteoklas pada femur mencit strain Swiss Webster yang diovariektomi secara unilateral.

Penelitian dilakukan di laboratorium Zoologi dan Botani Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember serta di Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor. Metode yang digunakan adalah metode eksperimental murni menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis pemberian ekstrak tepung kedelai hitam. Variabel terikatnya adalah jumlah osteoblas dan osteoklas tulang femur mencit yang diovariektomi secara unilateral. Pada penelitian ini digunakan 30 ekor mencit (*Mus musculus L.*) strain Swiss Webster 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 (mencit tidak diovariektomi unilateral dan tidak diberi ekstrak tepung kedelai hitam), kontrol positif (mencit diovariektomi, tetapi tidak diberi ekstrak tepung

kedelai hitam), Dosis 1 (mencit diovariectomi unilateral, diberi ekstrak tepung kedelai hitam 0,12 g/ml/hari), Dosis 2 (mencit diovariectomi unilateral dan diberi ekstrak tepung kedelai hitam 0,24 g/ml/hari), Dosis 3 (mencit diovariectomi unilateral dan diberi ekstrak tepung kedelai hitam 0,63 g/ml/hari). Perlakuan dimulai pada hari ke-61 pasca ovariektomi unilateral dengan cara melarutkan pasta dan aquades sesuai dosis yang ditetapkan. Pemberian ekstrak tepung kedelai hitam dilakukan secara *gavage* selama 10 hari. Parameter yang diamati pada penelitian ini meliputi jumlah dari sel osteoblas dan sel osteoklas pada preparat penampang membujur histologi metafisis femur.

Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa pemberian ekstrak tepung kedelai hitam selama 10 hari pada mencit yang diovariectomi secara unilateral berpengaruh terhadap peningkatan rata-rata jumlah osteoblas dan penurunan rata-rata jumlah osteoklas pada femur mencit strain swiss webster yang diovariectomi secara unilateral. Perlakuan ekstrak tepung kedelai hitam pada dosis 0,63 g/ml/hari selama 10 hari pada mencit strain swiss webster yang diovariectomi secara unilateral dapat meningkatkan rata-rata jumlah osteoblas. Pemberian ekstrak tepung kedelai hitam pada dosis 0,21 g/ml/hari selama 10 hari dapat menurunkan rata-rata jumlah osteoklas pada mencit yang diovariectomi secara unilateral. Rata-rata jumlah osteoblas memiliki nilai korelasi negatif terhadap rata-rata jumlah osteoklas. Hal ini menunjukkan bahwa bertambahnya rata-rata jumlah osteoblas disertai dengan penurunan rata-rata jumlah osteoklas.

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 Ekstrak Tepung Kedelai Hitam (*Glycine soja*) Terhadap Jumlah Sel Osteoblas dan Osteoklas Tulang Femur Mencit (*Mus Musculus L.*) Strain Swiss Webster Ovariektomi Unilateral”. 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. Eva Tyas Utami, S.Si.,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, satpam fakultas yang telah mendukung dan membantu dalam masa perkuliahan hingga terselesaikannya skripsi ini;
5. Rangga Martha Putra Pratama yang selalu memberi semangat dan memotivasi saya;
6. Teman perjuangan team research laboratorium Zoologi Yurinda Maria Ulfa, Dwi Erlinda, Dewi Lina, Nindita Primasari, Yenny Febriana, Maulfi Dwi, Sofiyawati



7. Elok, Lidya Mazziyatun atas bantuan, semangat dan kebersamaannya dalam suka, duka, sehat dan sakit;
8. teman satu kamar Rekanda Isnaqoima, dan MMG yang selalu mendukung disaat susah maupun senang dan memberi semangat yang sangat menghibur.
9. saudara seperjuangan BIOZVA atas semangat dan kenangannya hingga sampai pada akhir masa perkuliahan dan tercapainya cita-cita bersama.

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, 21 Februari 2017

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	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Batasan Masalah	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Struktur Tulang Femur dan Proses <i>Remodelling</i> Tulang	4
2.2 Peran Hormon Estrogen Terhadap Metabolisme Tulang	7
2.3 Defisiensi Estrogen Akibat Ovariectomi Unilateral	8
2.4 Kandungan Isoflavon dan Mineral Dalam Kedelai Hitam	9
2.5 Hipotesis	10
BAB 3. METODE PENELITIAN	11
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	11

3.2	Alat dan Bahan.....	11
3.2.1	Alat	11
3.2.2	Bahan.....	11
3.3	Rancangan Penelitian.....	12
3.4	Alur Penelitian	13
3.5	Prosedur Penelitian	14
3.6	Parameter Pengamatan Pada Penelitian.....	17
3.7	Analisis Data.....	17
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	18
4.1	Efek Ekstrak Tepung Kedelai Hitam Terhadap Jumlah Osteoblas pada Histologi Tulang Femur Mencit Strain Swiss Webster Ovariectomi Unilateral.....	18
4.2	Efek Ekstrak Tepung Kedelai Hitam Terhadap Jumlah Osteoklas pada Histologi Tulang Femur Mencit Strain Swiss Webster Ovariectomi Unilateral.....	20
BAB 5.	KESIMPULAN DAN SARAN	25
5.1	Kesimpulan	25
5.2	Saran	25
DAFTAR PUSTAKA		26
LAMPIRAN.....		31

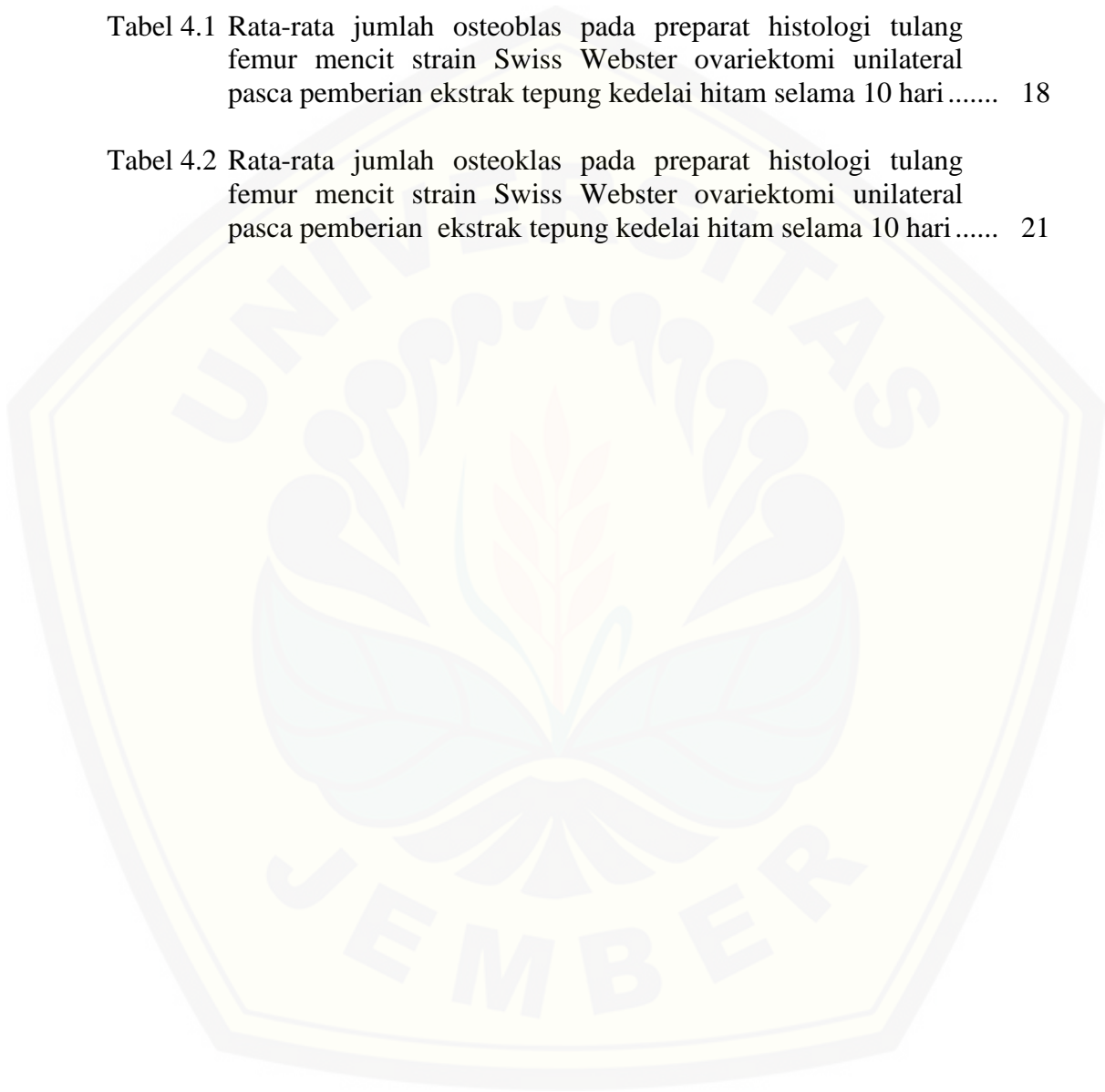


DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 4.1 Rata-rata jumlah osteoblas pada preparat histologi tulang femur mencit strain Swiss Webster ovariektomi unilateral pasca pemberian ekstrak tepung kedelai hitam selama 10 hari 18

Tabel 4.2 Rata-rata jumlah osteoklas pada preparat histologi tulang femur mencit strain Swiss Webster ovariektomi unilateral pasca pemberian ekstrak tepung kedelai hitam selama 10 hari 21





DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur anatomi tulang femur.....	4
Gambar 2.2 Jaringan tulang Femur	6
Gambar 2.3 Siklus <i>remodelling</i> tulang	7
Gambar 3.1 Alur penelitian	13
Gambar 4.1 Grafik pengaruh ekstrak tepung kedelai hitam selama 10 hari terhadap rata-rata jumlah osteoblas pada preparat histologi femur mencit strain Swiss Webster yang diovariectomi secara unilateral	20
Gambar 4.2 Grafik pengaruh ekstrak tepung kedelai hitam selama 10 hari terhadap rata-rata jumlah osteoblas pada preparat histologi femur mencit strain Swiss Webster yang diovariectomi secara unilateral	22
Gambar 4.3 Struktur histologi femur mencit pada preparat membujur di daerah metafisis dengan pengecatan HE (<i>Haematoxilin-Eosin</i>) perbesaran 400x.....	23



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Penentuan Dosis.....	31
B. Hasil Uji Statistik <i>One way</i> ANOVA Pengaruh Ekstrak Tepung Kedelai Hitam terhadap Jumlah Sel Osteoblas Pada Metafisis Histologi Femur Mencit Strain Swiss Webster Ovariektomi Unilateral.....	32
C. Hasil Uji Statistik <i>One way</i> ANOVA Pengaruh Ekstrak Tepung Kedelai Hitam terhadap Jumlah Sel Osteoklas Pada Metafisis Histologi Femur Mencit Strain Swiss Webster Ovariektomi Unilateral.....	34
D. Hasil Uji Korelasi Hubungan Antara Jumlah Sel Osteoblas Dengan Sel Osteoklas Pada Metafisis Femur Mencit Strain Swiss Webster Unilateral Ovariektomi	36

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kedelai hitam merupakan tumbuhan *leguminosae* atau tumbuhan penghasil biji, yang mengandung senyawa fenolik dan isoflavon. Kedelai hitam merupakan makanan yang berfungsi sebagai sumber fitoestrogen yang kaya akan kandungan mineral kalsium, dan fosfor serta isoflavon daidzein, genistein, dan glisitein (Nakajima *et al.*, 2005). Menurut Nurrahman (2015) kandungan genestein dalam kedelai hitam yaitu $0,65 \pm 0,07$ mg/g dan Daidzein $3,67 \pm 0,41$ mg/g. Senyawa fitoestrogen yang terkandung dalam kedelai hitam jika dikonsumsi dapat meningkatkan kadar estrogen dalam tubuh (Astawan, 2003). Sehingga fitoestrogen dapat digunakan sebagai terapi sulih hormon untuk mengganti defisiensi hormon estrogen. Hormon ini menekan resorpsi tulang sehingga dapat menghambat proses kerapuhan tulang.

Menurut Derek (2007), tulang tersusun atas sel penyusun tulang (osteoblas, osteosit, osteoklas), matriks organik, serta mineral. Tulang merupakan jaringan aktif yang secara metabolik mengalami *remodelling* secara kontinyu oleh dua proses, yaitu pembentukan (formasi) dan penyerapan (resorpsi) tulang (Seibel, 2005). Apabila proses resorpsi tulang melebihi aktivitas formasi secara terus menerus, maka hal tersebut dapat menyebabkan terjadinya osteoporosis pada tulang (Speroff dan Fritz, 2005).

Proses *remodelling* tulang sangat dipengaruhi oleh hormon, diantaranya adalah hormon paratiroid, testosteron, dan estrogen. Estrogen merupakan salah satu hormon seks steroid yang berperan dalam metabolisme tulang, yang mempengaruhi perkembangan sel osteoblas maupun osteoklas dan menjaga keseimbangan kerja dari kedua sel tersebut. Hormon estrogen mempengaruhi *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) yang dapat merangsang ekspresi *osteoprotegerin* (OPG) dan *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa- β* (RANK) pada osteoblas dan sel stroma (Norman, 2003). Osteoprotegerin merupakan sitokin yang berfungsi sebagai inhibitor dari RANK pada prekursor-

osteoklas untuk berikatan dengan RANK-ligand. Hal ini menyebabkan terhambatnya pematangan sel osteoklas, sehingga resorpsi tulang terhambat (Takayanagi, 2007). *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) berfungsi sebagai faktor pertumbuhan (*growth factor*) yang merupakan mediator untuk menarik sel osteoblas ke tempat tulang yang telah diserap oleh sel osteoklas. Penurunan kadar estrogen berpengaruh terhadap peningkatan jumlah osteoklas yang menyebabkan resorpsi tulang meningkat dan mempercepat proses kerapuhan tulang (Suarsana *et al.*2011).

Beberapa penelitian yang mengkaji pengaruh fitoestrogen terhadap aktifitas tulang telah banyak dilakukan. Penelitian Nurdiana (2011) menyatakan bahwa ekstrak kacang tunggak yang memiliki kandungan fitoestrogen dengan dosis 0,5 ml/kg berat badan dapat menurunkan jumlah osteoklas pada tikus ovariektomi yang dipertahankan selama 1 dan 2 bulan. Berdasarkan latar belakang tersebut, perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh fitoestrogen pada kedelai hitam terhadap jumlah sel osteoblas dan osteoklas.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dari penelitian ini yaitu:

1. Apakah pemberian ekstrak tepung kedelai hitam dapat mempengaruhi peningkatan rata-rata jumlah sel osteoblas dan penurunan rata-rata jumlah osteoklas pada tulang femur mencit strain Swiss Webster yang diovariektomi secara unilateral?
2. Berapakah dosis pemberian ekstrak tepung kedelai hitam yang berpengaruh terhadap peningkatan rata-rata jumlah osteoblas dan penurunan rata-rata jumlah osteoklas pada tulang femur mencit strain Swiss Webster yang diovariektomi secara unilateral?



1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah diatas, penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kedelai hitam terhadap rata-rata jumlah sel osteoblas dan osteoklas pada tulang femur mencit strain Swiss Webster yang diovariectomi secara unilateral
2. Mengetahui dosis pemberian ekstrak tepung kedelai hitam yang berpengaruh terhadap rata-rata jumlah osteoblas dan osteoklas pada tulang femur mencit strain Swiss Webster yang diovariectomi secara unilateral.

1.4 Batasan Masalah

Penelitian dilakukan perhitungan rata-rata jumlah osteoblas dan osteoklas pada daerah metafisis preparat tulang femur mencit strain Swiss Webster.

1.5 Manfaat Penelitian

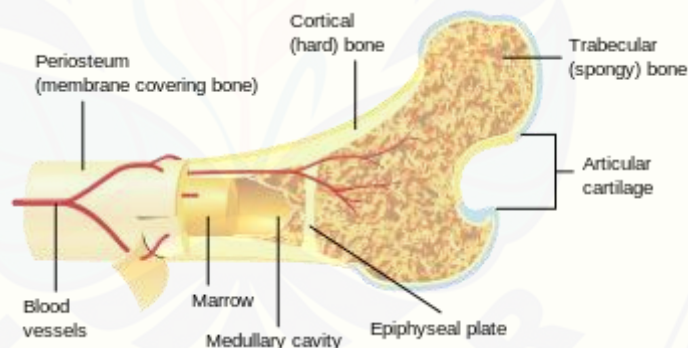
Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi mengenai alternatif terapi sulih hormon estrogen oleh kedelai hitam yang berfungsi sebagai fitoestrogen alami serta pengaruhnya terhadap kehilangan massa tulang (osteoporosis).



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Struktur Tulang Femur dan Proses *Remodelling* Tulang

Tulang femur merupakan tulang yang termasuk dalam kelompok tulang panjang berdasarkan bentuknya. Tulang femur memiliki *corpus* berbentuk tubular yang terbagi menjadi beberapa bagian yaitu bagian epifisis, metafisis serta difisis (Gambar 2.1). Daerah diantara epifisis dan metafisis terdapat daerah tulang rawan yang disebut lempeng epifisis (Baron, 2006). Tulang femur tersusun atas 2 tipe jaringan dasar yaitu jaringan tulang kortikal dan tulang trabekular. Jaringan tulang kortikal merupakan jaringan tulang yang terkalsifikasi dan memadat, sedangkan jaringan tulang trabekular merupakan jaringan tulang yang memiliki aktifitas metabolik yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan tulang kortikal serta relatif kurang padat, dan hanya 5-20% tulang trabekular yang terkalsifikasi (Dellman dan Brown, 1989).



Gambar 2.1 Struktur Anatomi Tulang Femur (Tortora dan Dericson, 2011)

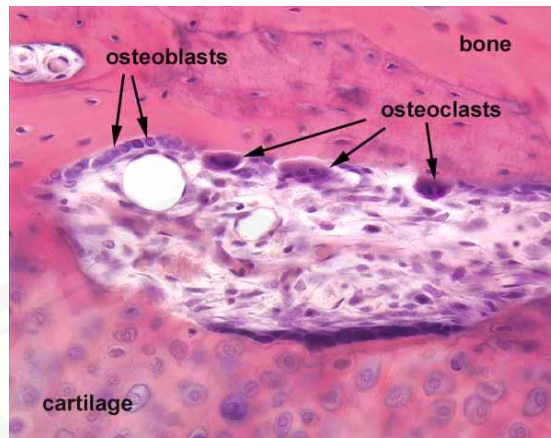
Jaringan tulang trabekular terdiri atas beberapa sel (osteoblas, osteosit, osteoklas), matriks organik, serta mineral (Djojosoebagio, 1996). Tulang secara aktif mengalami *remodelling* secara kontinyu oleh dua proses, yaitu pembentukan (formasi) dan penyerapan (resorpsi) tulang yang dipengaruhi oleh adanya sel osteoblas dan osteoklas (Seibel, 2005).

Osteoblas merupakan sel berinti tunggal, berasal dari sel mesenkim yang

bersifat pluripotent serta ditemukan dipermukaan tulang. Sel osteoblas bertanggung jawab pada proses pembentukan dan mineralisasi tulang (Arnett, 2003). Secara struktural osteoblas merupakan sel berbentuk kubus atau kolumnar, yang memiliki diameter antara 20-30 μm (Leeson *et al.*, 1996). Membran plasma osteoblas terdapat enzim alkali fosfatase yang berperan dalam proses pembentukan tulang. Sel osteoblas 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).

Osteoklas merupakan sel yang berasal dari *hematopoietic stem cell* (sel hematopoietik) yang merupakan prekursor monosit/makrofag, bersifat multinukleat serta memiliki ukuran yang besar (Baron, 2006). Osteoklas berperan pada proses resorpsi tulang dengan cara mensekresikan enzim lisosom yaitu enzim kolagenase dan katepsin K yang dapat melarutkan matriks tulang (Arnett, 2003). Melalui proses ini, osteoklas berperan dalam proses fisiologi didalam tubuh salah satunya adalah mempertahankan keseimbangan kalsium darah dalam tubuh (Derek *et al.*, 2007).

Aktivitas osteoblas dan osteoklas dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu: sitokin, hormon paratiroid, hormon tiroid berupa kalsitonin dan hormone estrogen. Proses *remodelling* tulang berhubungan langsung dengan fungsi homeostasis mineral tulang dipengaruhi hormon dalam tubuh seperti parathormon, kalsitonin, dan estrogen (Junqueira dan Carneiro, 2005). Membran kutub basolateral dari osteoklas memiliki reseptor hormon dan substansi lainnya. Osteoklas bekerja dengan memisahkan komponen-komponen mikro melalui penetrasi membran. Struktur histologi sel osteoblas dan osteoklas dapat dilihat pada Gambar 2.2

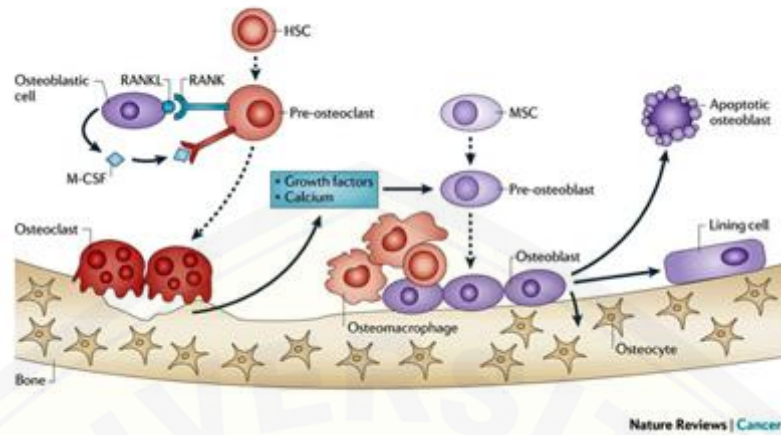


Gambar 2.2 Jaringan tulang femur (Leeson *et al.*, 1996).

Proses *remodelling* tulang berlangsung di permukaan tulang melalui proses resorpsi dan pembentukan tulang. Resorpsi tulang oleh osteoklas memerlukan waktu antara 7-10 hari dan proses pembentukan tulang oleh osteoblas memerlukan waktu antara 2-3 bulan. Secara fisiologi, tulang berfungsi sebagai tempat penimbunan atau pembebasan kalsium, fosfat dan ion-ion lain untuk mempertahankan konsentrasi yang terkendali dalam cairan tubuh. Proses *remodelling* yang berhubungan langsung dengan fungsi homeostasis mineral tulang dipengaruhi hormon dalam tubuh seperti parathormon, kalsitonin, dan estrogen (Junqueira dan Carneiro, 2007).

Siklus *remodelling* tulang dimulai dari perekrutan perkusor osteoklas yang kemudian berdiferensiasi menjadi osteoklas setelah menerima signal dari osteoblas berupa Receptor activator of nuclear factor kappa- β (RANKL) Osteoklas yang sudah mature mensintesis enzim proteolitik yang mencerna matriks kolagen dan terjadi proses resorpsi tulang yang merupakan tahap awal siklus *remodelling*. Fase selanjutnya dari siklus ini adalah proteoblas ditarik dari stem sel mesenkim ke dalam sumsum tulang. Osteoblas yang sudah matang mensintesis matriks tulang terutama kolagen tipe I dan juga mengatur mineralisasi tulang baru (Thomas, 2012). Siklus *remodelling* tulang dapat dilihat pada Gambar 2.3





Gambar 2.3 Siklus *remodelling* tulang (Seibel, 2005)

2.2 Peran Hormon Estrogen Terhadap Metabolisme tulang

Estrogen merupakan hormon steroid yang dihasilkan oleh sel teka interna pada folikel ovarium, corpus luteum, plasenta dan dalam jumlah sedikit oleh korteks adrenal dan testes. Estrogen terdapat dalam bentuk estradiol-17 β , estron dan estriol. Estrogen dapat menimbulkan respon terhadap aktivitas reproduksi pada wanita seperti perkembangan sifat seksual sekunder, perilaku persiapan kawin (estrus), mempersiapkan uterus untuk implantasi dan menyiapkan perkembangan kelenjar mammae (Hafez, 2000). Estrogen juga berperan dalam metabolisme tulang yaitu, mempengaruhi aktivitas osteoblas maupun osteoklas dan menjaga keseimbangan kerja dari kedua sel tersebut. Osteoblas memiliki reseptor alpha dan betha (ER α dan ER β) di dalam sitosol. Dalam proses diferensiasinya osteoblas mengekspresikan reseptor beta (ER β) 10 kali lipat dari reseptor estrogen alpha (ER α) (Monroe *et al.*, 2003).

Pada saat kadar estrogen dalam kondisi normal, diferensiasi preosteoblas menjadi osteoblas mampu menurunkan sekresi sitokin yaitu: Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) dan Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) yang dapat menstimulasi aktivitas osteoklas dalam penyerapan tulang. Disisi lain, hormon estrogen dapat meningkatkan sekresi TGF- β (Transforming Growth Factor- β) yang berfungsi sebagai mediator untuk menarik sel osteoblas menuju lakuna dan



dapat merangsang ekspresi osteoprotegerin (OPG) dari osteoblas dan sel stroma yang berfungsi sebagai reseptor penyeimbang dengan mencegah RANK pada osteoklas berikatan dengan RANKL (Norman, 2003). Defisiensi estrogen dapat menstimulasi proses osteoklastogenesis yang menyebabkan kehilangan massa tulang. Efek utama estrogen pada tulang adalah menurunkan jumlah dan aktivitas osteoklas sehingga mampu mengurangi proses resorpsi tulang dan meningkatkan pertumbuhan tulang (Gunawan, 2007).

2.3 Defisiensi Estrogen Akibat Ovariectomi Unilateral

Unilateral ovariectomi adalah suatu tindakan pembedahan atau teknik laparotomi untuk pengambilan ovarium secara unilateral atau tunggal. Arjmandi *et al.* (1996) membuktikan bahwa ovariectomi kedua ovarium pada tikus percobaan akan menginduksi osteoporosis pada trabekula tulang rahang karena ovariectomi akan menstimulasi kerja osteoklas, hal ini diakibatkan oleh peranan estrogen terhadap tulang yang dapat menstimulasi perkembangan osteoklas dalam meresorpsi matriks tulang. Hilangnya fungsi ovarium dalam memproduksi hormon seks steroid, seperti estradiol akan menimbulkan kondisi hipoestrogenis yang merupakan faktor utama kehilangan massa tulang atau osteoporosis (Miller *et al.* 1986).

Osteoporosis merupakan penyakit tulang progresif yang ditandai dengan menurunnya densitas tulang dan kerusakan struktur jaringan tulang, sehingga tulang mudah mengalami fraktur (Gunawan, 2007). Peristiwa osteoporosis terjadi jika laju resorpsi tulang secara terus menerus lebih banyak dan lebih cepat dibandingkan laju pembentulan tulang (Morello, 2009). Terjadinya osteoporosis disebabkan oleh karena jumlah dan aktivitas sel osteoklas yang melebihi jumlah dan aktivitas sel osteoblas (sel pembentuk tulang). Keadaan ini pada akhirnya mengakibatkan penurunan massa tulang (Manolagas, 2000).

Pemberian estrogen eksogen dapat menstimulasi sel-sel pembentuk tulang. Hormon estrogen juga berpengaruh pada metabolisme vitamin D, yang dapat berakibat pada penurunan absorpsi kalsium di usus yang disebabkan karena menurunnya kadar *1,25-OH-D*. Selain itu estrogen dapat merangsang sekresi

kalsitonin yang mempunyai efek menghambat kerja osteoklas dalam meresorpsi tulang (Singer, 1997).

2.4 Kandungan Isoflavon dan Mineral pada Kedelai Hitam

Kedelai hitam mengandung isoflavon glikosida dan aglikon. Isoflavon aglikon merupakan jenis isoflavon yang mudah diserap tubuh. Isoflavon dapat meningkatkan enzim antioksidan dalam tubuh (Winarsih, 2007) dan dapat menurunkan kadar LDL pada tikus aterosklerosis (Kholis dan Yanti, 2011). Hastuti (2015) menjelaskan adanya peningkatan isoflavon daidzein dan genistein sebanyak 8 kali lipat dari kedelai hitam mentah menjadi natto kedelai hitam. Efek antioksidan kedelai hitam lebih besar daripada kedelai kuning (Dajanta *et al.*, 2013).

Kedelai hitam sebagai makanan fungsional yang kaya akan kandungan mineral kalsium, dan fosfor serta isoflavon daidzein, genistein, dan glisitein (Nakajima *et al.*, 2005). Mineral kalsium dan fosfor sangat dibutuhkan untuk pertumbuhan dan pemeliharaan tulang sehingga sangat diperlukan untuk mencegah osteoporosis. Isoflavon juga dapat berperan seperti estrogen (*estrogen like*). Menurut Kuiper *et al* (1997), isoflavon pada kedelai hitam mempunyai kemiripan struktur dengan estrogen dan mampu berikatan dengan reseptor beta-estrogen pada tulang. Sifat yang dimiliki oleh isoflavon dapat menggantikan peran estrogen terutama dalam mencegah resorpsi massa tulang sehingga dapat mencegah terjadinya keropos tulang (osteoporosis).

Isoflavon merupakan salah satu golongan flavonoid. Pada tanaman kacang-kacangan senyawa ini ditemukan dalam jumlah yang cukup besar yaitu 0,25%. Sebanyak 99% isoflavon pada kedelai hitam terdiri dari 64% genistein, 23% daidzein, dan 13% glicetin 7-0- β -glikosida (Naim *et al.*, 1974). 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 *reseptors estrogen*.

Adanya kemiripan struktur antara estrogen dengan isoflavon serta adanya

reseptor beta estrogen, menyebabkan isoflavon dapat berikatan dengan reseptor estrogen pada berbagai jaringan tubuh termasuk tulang. Isoflavon memperlihatkan afinitas yang relatif lebih tinggi untuk mengikat reseptor beta estrogen yaitu sekitar 6-8 kali lipat lebih tinggi dibandingkan dengan reseptor alpha (Kuiper *et al.*, 1997). Potensi ini memberikan efek positif pada jaringan tulang karena isoflavon dapat berperan dalam membantu memperbaiki metabolisme tulang.

2.5 Hipotesis

Pemberian ekstrak tepung kedelai hitam berpengaruh terhadap peningkatan rata-rata jumlah osteoblas dan penurunan jumlah osteoklas tulang femur mencit strain Swiss Webster ovariektomi unilateral.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Zoologi dan Laboratorium Botani Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Pembuatan preparat histologi tulang femur dilakukan di Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor. Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2016 sampai Desember 2016.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian terdiri dari kandang mencit ukuran 34 cm x 25 cm x 12 cm dari plastik dan penutup dari ram kawat besi, timbangan analitik 200 x 0,1 gram, jarum sonde lambung ujung tumpul 20 gauge 5 cm, botol minum mencit, papan bedah, *sprit injection* 1cc/ml, silet, ekskavator, *paratus case*, jarum sutura nomor 2, klem arteri, *Needle holder*, pinset anatomi, pinset sirugis, gunting *metzenbaum*, gunting balutan, gunting runcing, *beaker glass* 500ml, *beaker glass* 250 ml, gelas ukur 100 ml, botol *scott* 1000 ml, corong plastik kecil, pipet tetes, spatula, cawan porselen 75cc, saringan tepung 70 *mesh*, *rotary evaporator*, *waterbath*, baki *stainless steel*, baki plastik, sendok plastik, cup ekstrak kecil, *rotary microtome*, oven, botol reagen, mikroskop *Olympus*, optilab, *staining jar*, flakon, oven (*Incucell*), skalpel, dan *hot plate*.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian terdiri atas mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gajah Mada (LPPT-UGM) Yogyakarta, pakan pellet Turbo, aquades steril, ketamine 10%, *xyla*, benang silk nomor 3, benang *catgut* nomor 3, sekam padi steril, serbuk kayu steril, *betadine*, alkohol 70%, antibiotik (*Levofloxacin*), cairan infus 0,9% '*Sodium Chloride* ,kasa steril, *tissue*, *gloves*, masker, kedelai hitam diperoleh dari Balai Litbang Kacang dan Umbi-umbian,

kertas saring, kain saring, gelas objek, gelas penutup, *chloroform*, larutan fiksatif PBS formalin, parafin, gliserin dan albumin, alkohol bertingkat, alkohol absolut, pewarna Hematoxylin dan Eosin (HE), xylol, dan entelan.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang bertujuan untuk menguji pengaruh perlakuan pada kelompok uji yang dibandingkan dengan kelompok kontrol. Variabel bebas pada perlakuan ini adalah dosis pemberian ekstrak tepung kedelai hitam. Variabel terikatnya adalah jumlah sel osteoblas dan osteoklas mencit pasca ovariektomi unilateral.

Penelitian ini menggunakan 30 ekor mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster umur 90 hari dengan berat 35 gram. Mencit dibagi menjadi lima kelompok dengan tiga kali pengulangan selama 10 hari. 3 kelompok mencit ovariektomi unilateral diberi ekstrak tepung kedelai hitam setelah hari 60 masa *recovery* diantaranya:

Kelompok1(KontrolNegatif) : Kelompok kontrol negatif (tanpa ovariektomi unilateral (ULO) serta tanpa ekstrak tepung kedelai hitam).

Kelompok2 (Kontrol Positif): Kelompok kontrol positif (ovariektomi unilateral (ULO) tanpa ekstrak tepung kedelai hitam).

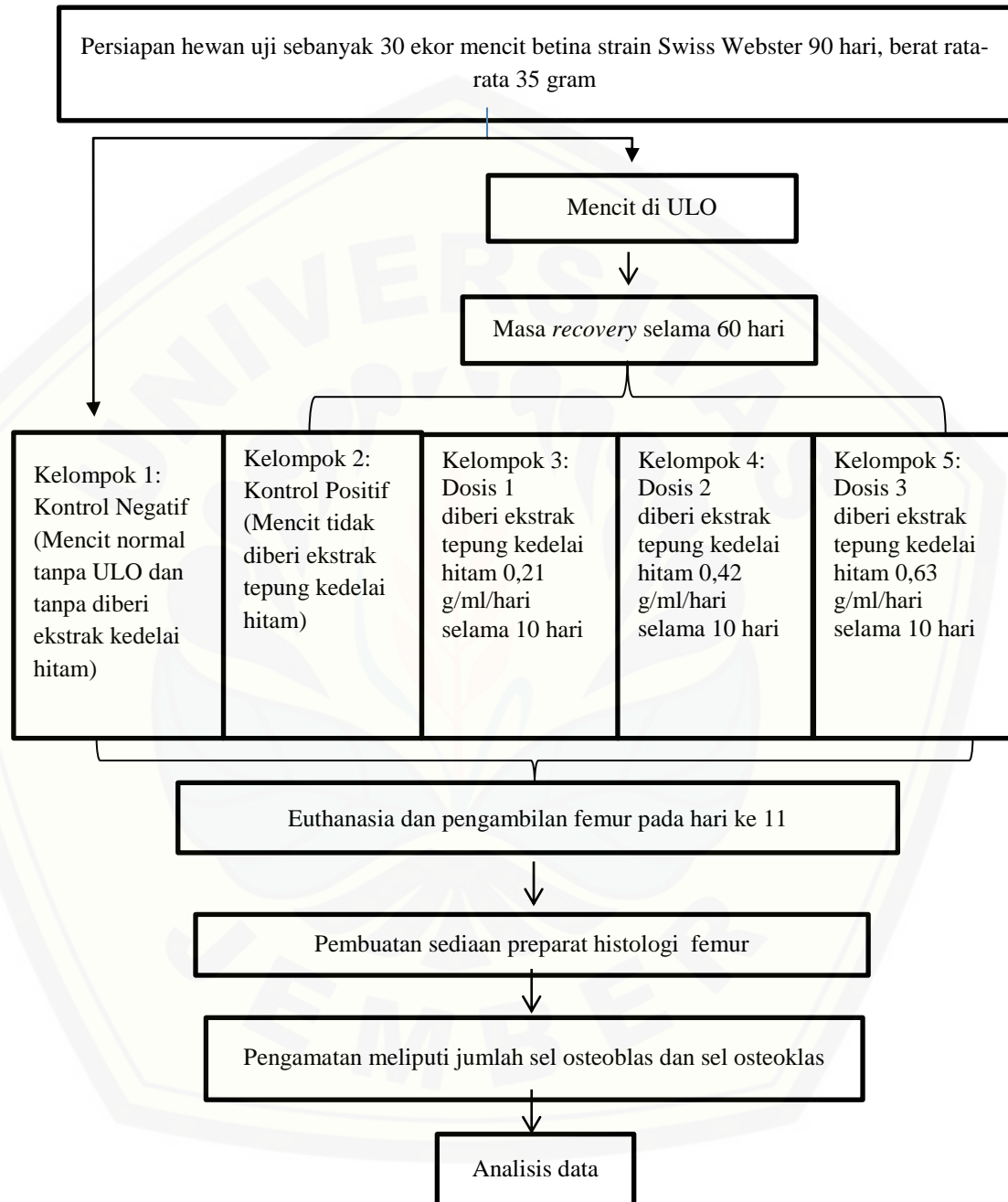
Kelompok 3 (Dosis 1) :Kelompok perlakuan mencit ovariektomi unilateral (ULO) yang diberi ekstrak tepung kedelai hitam dengan dosis 0,21 g/ml/hari selama 10 hari.

Kelompok 4 (Dosis 2) :Kelompok perlakuan mencit ovariektomi unilateral (ULO) yang diberi ekstrak tepung kedelai hitam dengan dosis 0,42 g/ml/hari selama 10 hari.

Kelompok 5 (Dosis 3) :Kelompok perlakuan mencit ovariektomi unilateral (ULO) yang diberi ekstrak tepung kedelai hitam dengan dosis 0,63 g/ml/hari selama 10 hari.

3.4 Alur Penelitian

Alur kegiatan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Alur Kegiatan Penelitian



3.5 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu: persiapan hewan uji, pembuatan ekstrak tepung kedelai hitam, preparasi hewan uji ovariektomi unilateral, perlakuan hewan uji, tahap pengambilan sampel preparat histologi tulang femur dan tahap pengamatan (Sari, 2015).

3.5.1 Persiapan Hewan Uji

Hewan yang digunakan pada penelitian adalah mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster umur 90 hari dengan berat badan 35 gram yang diovariektomi unilateral dan diadaptasikan dalam kandang selama 60 hari masa *recovery*. Mencit ditempatkan dalam kandang berukuran 34 cm x 25 cm x 12 cm dengan alas sekam padi dan serbuk gergaji kayu steril dengan tutup kawat. Mencit diberi pakan standart berupa pellet Turbo dengan pemberian 1/10 dari berat badan mencit dan minum aquades steril secara *ad libitum* serta ditempatkan pada ruangan dengan suhu ruang 27°C .

3.5.2 Preparasi Ovariektomi Unilateral Mencit

Ovariektomi unilateral merupakan suatu teknik pembedahan untuk mengambil salah satu ovarium. Prosedur awal ovariektomi unilateral yaitu dengan membius mencit menggunakan ketamil 10% dan Xyla perbandingan 1:1 sebanyak 0,05 ml secara intramuskular. Mencit dibaringkan secara terlentang pada papan bedah serta pada bagian medial perut mencit diolesi dengan air sabun antibakteri, kemudian dilakukan pencukuran rambut menggunakan silet. Langkah selanjutnya dilakukan pembedahan secara perlahan hingga lapisan muskulus daerah abdomen terbuka, dilakukan penyayatan dengan menggunakan gunting ujung tumpul dan pinset pada kulit bagian luar dengan lebar 1,5 cm dan kulit bagian dalam 1 cm.

Proses selanjutnya yaitu semua bagian organ reproduksi dikeluarkan untuk mencari ovarium. Satu ovarium kemudian dijepit dengan klem arteri dan diikat bagian ujung oviduct dengan benang silk, ovarium dipotong secara perlahan dengan gunting *matzenbaum*.



Organ reproduksi yang telah dikeluarkan direposisi kembali dalam abdomen dan diberi 0,5 ml larutan *Sodium Chloride* 0,9 %. Proses penutupan dilakukan pada bagian *muskulus oblikus abdominis internus* dengan cara dijahit menggunakan *cut gut chromic* ukuran 3.0 sedangkan untuk menjahit *muskulus oblikus abdominis eksternus* digunakan benang silk ukuran 3.0 dan jarum sutura kemudian diolesi dengan betadin. Dilakukan injeksi antibiotik (*Levofloxacin*) pada mencit dengan dosis 0,05 ml serta paracetamol satu sendok teh/200 ml aquades selama satu minggu.

3.5.3 Pembuatan Ekstrak Alkohol Tepung Kedelai Hitam

Biji kedelai hitam ditumbuk kemudian ditimbang berat basahnya, selanjutnya dioven pada suhu 50-60°C selama tiga hari dan digiling dengan menggunakan grinder hingga menjadi tepung. Tepung kedelai hitam diayak dengan ayakan 70 mesh, selanjutnya diberi pelarut alkohol 70% dengan perbandingan 1:4. Larutan dihomogenkan dan dimaserasi selama 2 x 24 jam untuk memisahkan supernatan dan pelet. 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, kemudian filtrat tanpa alkohol dipanaskan di *waterbath* selama \pm 8 jam untuk mendapatkan ekstrak kasar dalam bentuk pasta (Hastuti, 2015)

3.5.4 Perlakuan Hewan Uji

Pada penelitian ini digunakan 30 ekor mencit betina strain Swiss Webster yang dibagi menjadi dua kelompok yaitu mencit yang tidak diovariectomi unilateral dan mencit yang diovariectomi secara unilateral serta dipelihara selama 60 hari untuk masa *recovery*. Mencit yang diovariectomi secara unilateral kemudian dibagi menjadi dua perlakuan yaitu kontrol tanpa pemberian ekstrak dan mencit ovariektomi unilateral yang diberi perlakuan ekstrak tepung kedelai hitam secara oral (*gavage*) dengan dosis 0,21 g/ml/hari, 0,42 g/ml/hari dan 0,63 g/ml/hari selama 10 hari.

3.5.5 Pembuatan Preparat Histologi Tulang Femur Mencit

Pembuatan preparat tulang femur mencit diawali dengan proses dekalsifikasi yang bertujuan untuk menghilangkan Ca^{2+} yang ada di dalam jaringan tulang, sehingga jaringan menjadi lunak (Sumaryati, 2012). Metode yang digunakan untuk pembuatan preparat histologi tulang femur adalah metode parafin dan pewarnaan *Haematoxylin Eosin*. Metode parafin dilakukan dengan urutan fiksasi, dehidrasi, *clearing*, *infiltrasi*, *embedding*, *section*, *affixing* dan *mounting* (Suntoro, 1983). Prosedur pembuatan preparat histologi Tulang Femur Mencit :

a. Fiksasi, Dehidrasi dan *Clearing*

Tulang femur yang telah didekalsifikasi dicuci dengan NaCl 0,9% dimasukkan dalam flakon berisi larutan fiksatif PBS formalin selama 3 jam. Langkah selanjutnya dicuci alkohol 70%. Proses dehidrasi dilakukan menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertingkat mulai 70%, 80%, 95% dan absolut masing-masing 1,5 jam. Hasil proses dehidrasi kemudian dimasukkan ke 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 xilol selama semalam.

b. Infiltrasi dan *Embedding* (penanaman)

Infiltrasi parafin dilakukan dengan menggunakan parafin yang telah dicairkan didalam oven serta dilakukan secara bertingkat menggunakan parafin I,II dan III selama ½ - 1 jam pada suhu 56-58°C. Infiltrasi yang telah selesai dilakukan, kemudian dilanjutkan dengan penanaman organ pada blok parafin yang telah dicairkan.

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

Hasil *embedding* direkatkan pada holder dengan menggunakan skalpel dan bunsen. Disayat preparat secara membujur menggunakan *rotary microtome* dengan ketebalan 8 μm -10 μm . Sayatan direkatkan (*affixing*) pada gelas objek yang telah dilapisi perekat gliserin dan albumin, kemudian disimpan dalam inkubator 4°C selama 24 jam, sediaan diwarnai dengan *Haematoxylin* dan *Eosin*.

d. Pewarnaan (*Staining*)

Preparat tulang femur yang akan dilakukan pewarnaan terlebih dahulu deparafinisasi menggunakan xylol I, II dan III masing-masing 15-30 menit. Proses deparafinisasi yang telah selesai, kemudian dilanjutkan hidrasi bertingkat mulai dari absolut, 95%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% dan aquades masing-masing 2 menit. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan *Haematoxylin* selama 2-3 menit, kemudian dicuci air mengalir. Gelas benda dimasukkan kembali dalam alkohol bertingkat dari 20% hingga 70%. Selanjutnya dilakukan pewarnaan Eosin selama 10 menit dilanjutkan alkohol bertingkat hingga Xilol I dan II selama 2 menit.

e. 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 Parameter Pengamatan Pada Penelitian

Parameter yang diamati pada penelitian ini meliputi jumlah sel osteoblas dan osteoklas pada preparat femur mencit. Jumlah sel osteoblas dan sel osteoklas dihitung pada daerah metafisis yang merupakan penanda aktivitas sel dalam proses *remodelling* tulang. Ciri-ciri sel osteoblas dan osteoklas pada preparat metafisis tulang femur mencit yaitu :

- a. Osteoblas : sel berbentuk kubus dan berinti tunggal.
- b. Osteoklas : sel berukuran besar, bentuknya tidak beraturan dan berinti banyak.

3.7 Analisis Data

Rata-rata jumlah osteoblas dan osteoklas dianalisis secara statistik menggunakan uji *one way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 99% atau nilai sig. $\alpha = 0,01$. Selanjutnya, untuk mengetahui beda nyata antar kelompok uji dilakukan analisis *Duncan Multiple Range Test (DMRT)* serta uji korelasi untuk melihat adanya hubungan antara jumlah osteoblast dan osteoklas (Steel and Torrie, 1993).



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh kesimpulan bahwa ekstrak tepung kedelai hitam selama 10 hari berpengaruh terhadap peningkatan rata-rata jumlah osteoblas dan penurunan rata-rata jumlah osteoklas pada preparat femur mencit strain swiss webster yang diovariectomi secara unilateral. Perlakuan ekstrak tepung kedelai hitam pada dosis 0,63 g/ml/hari selama 10 hari pada mencit strain swiss webster yang diovariectomi secara unilateral dapat meningkatkan rata-rata jumlah osteoblas. Pemberian ekstrak tepung kedelai hitam pada dosis 0,21 g/ml/hari selama 10 hari dapat menurunkan rata-rata jumlah osteoklas pada mencit yang diovariectomi secara unilateral. Rata-rata jumlah osteoblas memiliki nilai korelasi negatif terhadap rata-rata jumlah osteoklas. Hal ini menunjukkan bahwa bertambahnya rata-rata jumlah osteoblas diiringi dengan penurunan rata-rata jumlah osteoklas.

5.2 Saran

Penelitian ini merupakan langkah awal dalam mengkaji potensi ekstrak tepung kedelai hitam sebagai salah satu alternatif terapi sulih hormon estrogen untuk mengurangi resiko osteoporosis pada hewan uji yang mengalami defisiensi estrogen pasca unilateral ovariectomi. Penelitian lebih lanjut, perlu dilakukan pengukuran kadar estrogen dan kalsium dalam darah, serta pengujian aktivitas sel pada tulang trabekula menggunakan pewarnaan Masson Trichome (MT). Penambahan waktu pemberian ekstrak pada hewan uji juga dibutuhkan agar efek ekstrak tepung kedelai hitam lebih optimal.



DAFTAR PUSTAKA

- Albert, B. 1998. *Molecular Biology of The Cell*. 3rd Ed. New York and London. USA: Garland Publishing, Inc.
- Arnett, T., 2003. Bone Structure and Bone Remodelling. London: University College London
- Arjmandi, B.H., Alekel, L., Hollis, B.W., Amin, D., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Guo, P., Kukreja, S.C. 1996. Dietary Soybean Protein Prevents Bone Loss in an Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis. *Journal Nutrition*. 126: 161-167.
- Astawan, M., Tutik, W., Muhammad, I. 2003. Karakteristik Fisikokimia Tepung Tempe Kecambah Kedelai. *J. Gizi Pangan*. 11(1):35-42.
- Baron, R., 2006. *Anatomy and Ultrastructure of Bone Histogenesis, Growth and Remodelling*. Endotext The most accessed source endocrinology for Medical Professionals, [online]. 2016. Available from <http://www.endotext.org/anatomyandultrastructureofbonehistogenesisgrowthandremodelling>
- Cassidy, A., Bingham, S., and Setchell, K. 1995. Biological Effects of Isoflavones In Young Women: Importance of The Chemical Composition of Soyabean Products. *British Journal of Nutrition*. 74: 587-601.
- Dajanta, K., Janpum, P. & Leksing, W. 2013. Antioxidant Capacities, Total Phenolics and Flavonoids in Black and Yellow Soybeans Fermented by *Bacillus subtilis*: A Comparative Study of Thai Fermented Soybeans (thuanao). *International Food Research Journal*. Vol. 20 (6): 3125-3132.
- Dellmann, H., dan Brown, E. 1989. *Buku teks Histologi Veteriner I*. 3rd Ed. Penerjemah Jan Tambayong. Jakarta: Buku Kedokteran, EGC.
- Derek S., Kalangi S., dan Wangko S. 2007. Kerja Osteoklas Pada Perombakan Tulang. *BIK Biomed*.
- Djojosoebagio, S. 1996. *Fisiologi Kelenjar Endokrin*. Jakarta: UI Press.
- Duhe SA. 2003. Swimming versus Voluntary Running Exercise on Bone Health in Ovariectomized Retired Breeder Rats. [Tesis]. Available from: <http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-0626103-161512/unrestricted/Duhe.thesis.pdf>. [Diakses: 22 Desember 2016].

- Elizabeth, A.F. 2007. Investigations of Mechanisms Involved in LPS-Stimulated Osteoclastogenesis. Digital Commons @ University of Connecticut. Paper 155. http://digitalcommons.uconn.edu/sodm_master.
- Ganong, W.F. 2003. Review of Medical Physiology. International Edition. Mc Graw Hill Book. San Francisco.
- Gunawan, S. G. 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Jakarta : FKUI.
- Guyton, C. 1996. *Fisiologi Manusia dan Mekanisme Penyakit (Human physiology and mechanism of disease)*. Terjemahan. Ed ke-3 Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Guyton dan Hall. 2008. *Fisiologi Kedokteran Edisi 11*. Jakarta: Buku Kedokteran, EGC.
- Hafez, B. dan Hafez, E. 2000. *Reproduction in Farm Animal 7th Edition*. USA. Lippincott William & Wilkins : Baltimore
- Hania, H. 2008. *Occurence of Osteoporosis Among Menopausal Women in Gaza Strip* [Tesis]. Gaza: Islamic University.
- 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.
- Junqueira, L. and Carneiro, J. 2005. *Basic Histology: Text and Atlas, Edition 11*. Poule: McGraw-Hill Medical.
- Junqueira, L. and Carneiro, J. 2007. *Histologi Dasar Teks & Atlas*. Edisi 10. Jakarta: EGC Kedokteran.
- 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.
- Leeson, R., Leeson, T. and Paparo, A. 1996. *Buku Ajar Histologi, Edisi 7*. Tambajong,. Editor. Terjemahan dari: *Textbook of Histology*. Jakarta.
- Linder, M. C. 1992, *Nutritional Biochemistry and Metabolism*, (Terj.): Parakkasi A. 1992, *Biokimia Nutrisi dan Metabolisme*. UI Press. Jakarta.: 201-214

- Manolagas, S. 2000. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications For The Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocr. Rev.* 21: 115-137.
- Miller WM, Janosz KEN, Lillystone M J, McCoullough PA.1986. Obesity and lipids. *Current Cardiology Reports*
- 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.
- Monroe, D., Getz, B., Johnsen, S., Riggs, B., Khosla, S. and Spelsberg, T. 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: 315–26.
- Morales-Ledesma, L., Ramírez, D. A., Vieyra, E., Trujillo, A., Chavira, R., Cárdenas, M., & Domínguez, R. (2011). Effects of acute unilateral ovariectomy to pre-pubertal rats on steroid hormones secretion and compensatory ovarian responses. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 9(1): 41.
- Morello, Candis M., Singh, Renu F., Deftos, Leonard J. 2009. *Pharmacotherapy in Primary Care*. USA: The McGraw-Hill.
- Naim, M., Gestetner, B., Zilkah, S., Birk, Y. and Bondi, A. 1974. Soybean isoflavones. Characterization, Determination, and Antifungal Activity. *Journal Agr. F. Chem.* 22: 806-810.
- Nakajima, N., Nobuyuki, N., Kohji, I., Akiko, I., and Hideaki, T. 2005. Analysis of Isoflavone Content in Tempeh, a Fermented Soybean, and Preparation of a New Isoflavone-Enriched Tempeh. *Journal Of Bioscience and Bioengineering*
- Neve, A., Corrado, A., & Cantatore, F. P. (2011). Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell and tissue research*, 343(2), 289-302.
- Norman, H. 2003. RANK Ligand and the Regulation of Skeletal Remodelling. *Journal Clin Invest.* Apr 15. 111 (8): 1120–1122.
- Nurdiana. 2011. Efek Ekstrak Kacang Tunggak Terhadap Osteoblas dan Osteoklas Pada Tikus Dengan Ovariectomi. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 26 (3): 151-155

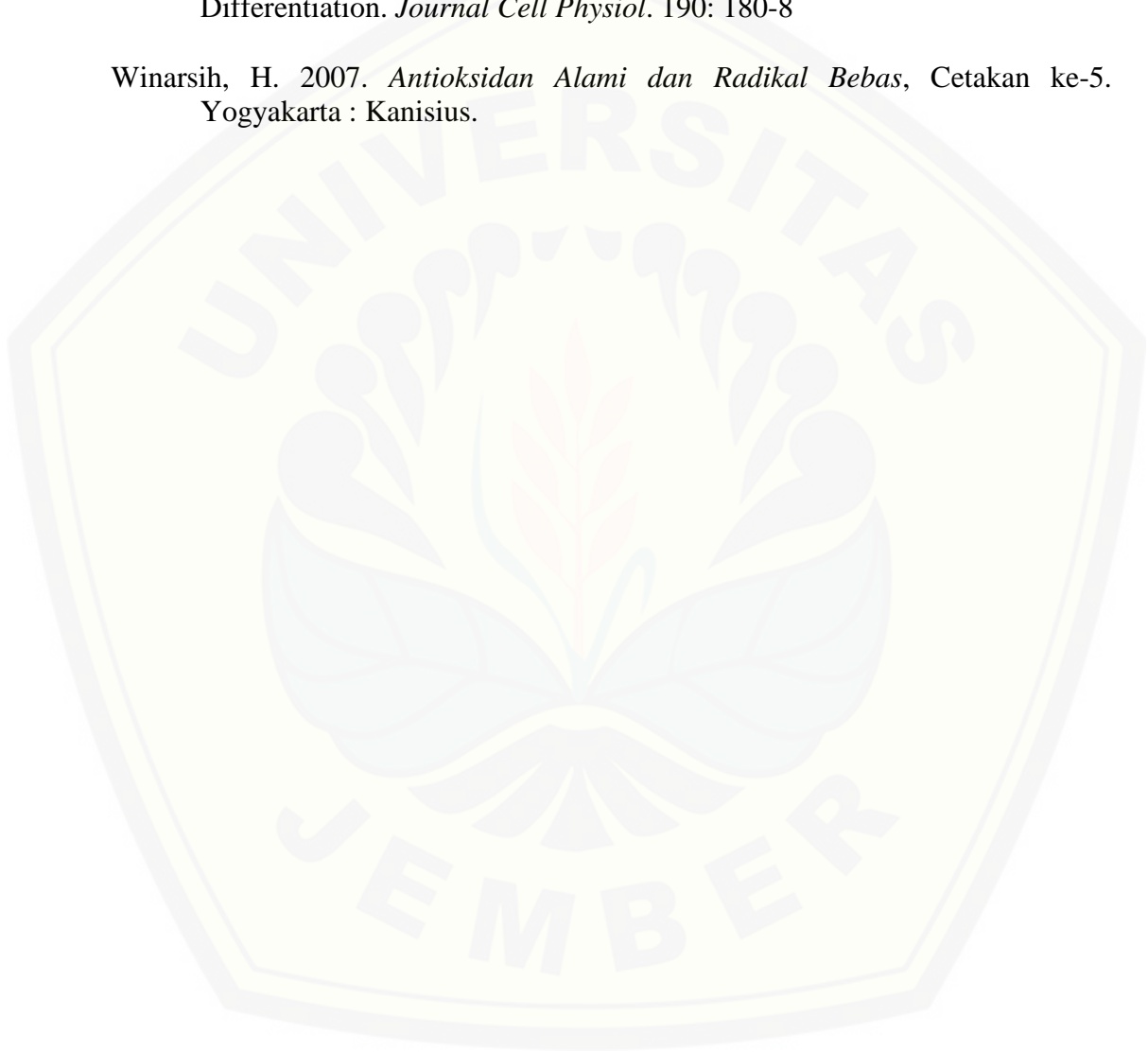
- Nurrahman, Nurhidajah. 2015. Pengaruh Konsumsi Tempe Kedelai Hitam Terhadap Aktivitas Makrofag dan Kadar Interleukin 1 (IL-1) pada Tikus Secara In Vivo. Program Studi Teknologi Pangan, Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Safrida. 2008. *Perubahan kadar hormon estrogen pada tikus yang diberi tepung kedelai dan tepung tempe* [Tesis]. Bogor : Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Sari, M. A. 2015. *Struktur Histologi Femur Mencit (Mus musculus L.) Strain Swiss Webster Ovariectomi Pasca Pemberian Ekstrak Tepung Tempe Kedelai* [Skripsi]. Jember : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Jember.
- Seibel, M. 2005. Biochemical markers of bone turnover part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev.* 26: 97-122.
- Silvia, M. 2012. *Uji Aktivitas Antiosteoporosis Ekstrak Ethanol 70% Buah Kacang Panjang (Vigna unguiculata L.) Walp.) Berdasarkan Penurunan Jumlah Osteoklas pada Growth Plate Tulang Tikus yang Diovariectomi* [Skripsi]. Depok: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.
- Singer, F. 1997. *Metabolic Bone Disease in : Endocrinology and Metabolism.* Eds: Felig, P., Baxter, J., Broadus, A., Frohman, L. 2nd edition. New York. Mc Graw-Hill Book Co.
- Speroff, L. dan Fritz, M. 2005. *Menopause and the Perimenopausal Transition.* In (Speroff, L. and Fritz, MA ed.). *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility.* 7th Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Steel, R. and Torrie J. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistik. Sumantri, B. Penerjemah Gramedia Pustaka. Jakarta. Terjemahan dari Principles and Procedures of Statistic.
- Suarsana, Nyoman, Darmawan, I., Gorda, I. dan Priosoeryanto, P. 2011. Tepung Kaya Isoflavon Meningkatkan Kadar Kalsium, Fosfor dan Estrogen Plasma Tikus Betina Normal. *Jurnal Veteriner.* 12 (3):229-234.
- 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: Bhatara Karya Aksara.

Takayanagi H, 2007. Osteoimmunology: Shared Mechanism and Crosstalk Between The Immune and Bone Systems. Vol. 7. Published on April. Tokyo: Nature Publishing Group. Pp 292–302





- Thomas, S. 2012. Bone Turnover Markers. *Aust Prescr.* 35 : 156-158.
- Tortora, G. dan Derrickson, B. 2009. *Principles of Anatomy and Physiology*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
- Yamaguchi, D., Huang, J., Ma, D. dan Wang, P. 2002. Inhibition of Gap Junction Intercellular Communication by Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields in Osteoblast-Like Models is Dependent on Cell Differentiation. *Journal Cell Physiol.* 190: 180-8
- Winarsih, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*, Cetakan ke-5. Yogyakarta : Kanisius.



LAMPIRAN

A. Penentuan Dosis

- 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
2034,8 gram	:	175,6 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 → 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 = 0,21 gram (Dosis 1) dan setengah lebih tinggi = 0,63 gram (Dosis 3).

B. Hasil Uji Statistik *One way* ANOVA Pengaruh Ekstrak Tepung Kedelai Hitam terhadap Jumlah Sel Osteoblas Pada Metafisis Femur Mencit Strain Swiss Webster Unilateral Ovariectomi

Data Hasil Pengamatan Hari Ke-10

Tests of Normality

perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
jumlah_ob kontrol negatif	.202	6	.200*	.853	6	.167
kontrol positif	.202	6	.200*	.853	6	.167
dosis 1	.206	6	.200*	.852	6	.164
dosis 2	.407	6	.002	.640	6	.001
dosis 3	.379	6	.007	.693	6	.005
jumlah_oc kontrol negatif	.202	6	.200*	.853	6	.167
kontrol positif	.202	6	.200*	.853	6	.167
dosis 1	.407	6	.002	.640	6	.001
dosis 2	.210	6	.200*	.849	6	.156
dosis 3	.230	6	.200*	.840	6	.131

a. Lilliefors Significance Correction



Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
jumlah_ob kontrol negatif	6	177.00	.894	.365	176.06	177.94	176	178
kontrol positif	6	117.00	.894	.365	116.06	117.94	116	118
dosis 1	6	106.67	15.214	6.211	90.70	122.63	90	124
dosis 2	6	114.00	1.549	.632	112.37	115.63	112	115
dosis 3	6	125.00	35.732	14.588	87.50	162.50	99	171
Total	30	127.93	30.317	5.535	116.61	139.25	90	178

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

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
jumlah_ob	Between Groups	19092.533	4	4773.133	15.781	.000
	Within Groups	7561.333	25	302.453		
	Total	26653.867	29			

jumlah_ob

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.01	
		1	2
Duncan ^a dosis 1	6	106.67	
dosis 2	6	114.00	
kontrol positif	6	117.00	
dosis 3	6	125.00	
kontrol negatif	6		177.00
Sig.		.106	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

C. Hasil Uji Statistik *One way* ANOVA Pengaruh Ekstrak Tepung Kedelai Hitam terhadap Jumlah Sel Osteoklas Pada Metafisis Femur Mencit Strain Swiss Webster Unilateral Ovariektomi

Data Hasil Pengamatan Hari Ke-10

Tests of Normality

perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
jumlah_oc kontrol negatif	.202	6	.200*	.853	6	.167
kontrol positif	.202	6	.200*	.853	6	.167
dosis 1	.407	6	.002	.640	6	.001
dosis 2	.210	6	.200*	.849	6	.156
dosis 3	.230	6	.200*	.840	6	.131

a. Lilliefors Significance Correction

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

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
jumlah_ oc kontrol negatif	6	49.00	.894	.365	48.06	49.94	48	50
kontrol positif	6	76.00	.894	.365	75.06	76.94	75	77
dosis 1	6	52.67	9.812	4.006	42.37	62.96	40	59
dosis 2	6	58.67	19.273	7.868	38.44	78.89	38	81
dosis 3	6	59.00	12.617	5.151	45.76	72.24	46	74
Total	30	59.07	14.042	2.564	53.82	64.31	38	81

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
jumlah_oc	Between Groups	2575.200	4	643.800	5.121	.004
	Within Groups	3142.667	25	125.707		
	Total	5717.867	29			

jumlah_oc

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.01	
		1	2
Duncan ^a kontrol negatif	6	49.00	
dosis 1	6	52.67	
dosis 2	6	58.67	58.67
dosis 3	6	59.00	59.00
kontrol positif	6		76.00
Sig.		.169	.017

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

D. Hasil Uji Korelasi Hubungan Antara Jumlah Sel Osteoblas Dengan Sel Osteoklas Pada Metafisis Femur Mencit Strain Swiss Webster Unilateral Ovariektomi

Correlations

		jumlah_ob	jumlah_oc
jumlah_ob	Pearson Correlation	1	-.143
	Sig. (2-tailed)		.452
	N	30	30
jumlah_oc	Pearson Correlation	-.143	1
	Sig. (2-tailed)	.452	
	N	30	30

