



**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK KEDELAI HITAM  
(*Glycine soja* Sieb. Et Zucc.) TERHADAP KADAR KALSIUM  
DAN FOSFOR PADA MENCIT (*Mus musculus* L.)  
PASCA OVARIEKTOMI**

**SKRIPSI**

Oleh :

**Rilla Nofita Putri  
NIM 151810401053**

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



**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK KEDELAI HITAM  
(*Glycine soja* Sieb. Et Zucc.) TERHADAP KADAR KALSIUM  
DAN FOSFOR PADA MENCIT (*Mus musculus* L.)  
PASCA OVARIEKTOMI**

**SKRIPSI**

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

Oleh :

**Rilla Nofita Putri**  
**NIM 151810401053**

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

## PERSEMBAHAN

Dengan nama Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang serta sholawat dan salam yang selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW, skripsi ini penulis persembahkan kepada:

1. Ibunda Ilmiah dan Ayahanda Ngatroji tercinta serta Ibunda Indrik Widiyastuti dan Ayahanda Susiyadi, terimakasih atas segala limpahan do'a, kasih sayang, kesabaran dalam mendidik, pengorbanan dan dukungan tanpa henti;
2. keluarga besar tercinta yang telah memberi do'a, motivasi, dan dukungan;
3. guru-guruku TK Dewi Masyithoh, MI Ma'arif NU 09, SMP Negeri 1 Yosowilangun, SMA Negeri Yosowilangun, serta ustadz-ustadzah TPQ Ath-Thohiriyah yang telah mendidik dan membagikan ilmunya;
4. Almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

## MOTTO

“Jika kalian berbuat baik, sesungguhnya kalian berbuat baik bagi diri kalian sendiri..”

(QS. Al-Isra’ 17: 7)\*)

“Boleh jadi kamu membenci sesuatu, padahal ia amat baik bagimu, dan boleh jadi (pula) kamu menyukai sesuatu, padahal ia amat buruk bagimu, Allah mengetahui, sedang kamu tidak mengetahui”

(QS. Al-Baqarah : 216)\*)

---

\*) Kementerian Agama Republik Indonesia, Yayasan Penyelenggara Penerjemah/Penafsiran Al Qur’an. 2009. Mushaf Al-Qur’an dan Terjemahannya. Bogor: Nur Publishing.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Rilla Nofita Putri

NIM : 151810401053

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efek Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam (*Glycine soja* Sieb. Et Zucc.) terhadap Kadar Kalsium dan Fosfor Pada Mencit (*Mus musculus* L.) Pasca Ovariectomi” adalah benar-benar hasil karya sendiri serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini didanai oleh Dra. Mahriani, M.Si dan dengan sumber dana mandiri tidak dapat dipublikasikan tanpa ijin dari pihak yang mendanai. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 19 Juli 2019

Yang menyatakan,

Rilla Nofita Putri

NIM 151810401053

**SKRIPSI**

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK KEDELAI HITAM  
(*Glycine soja* Sieb. Et Zucc.) TERHADAP KADAR KALSIUM  
DAN FOSFOR PADA MENCIT (*Mus musculus* L.)  
PASCA OVARIEKTOMI**

Oleh  
**Rilla Nofita Putri**  
**NIM 151810401053**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dra. Mahriani, M.Si

Dosen Pembimbing Anggota : Purwatiningsih, Ph.D

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Efek Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam (*Glycine soja* Sieb. Et Zucc.) terhadap Kadar Kalsium dan Fosfor Pada Mencit (*Mus musculus* L.) Pasca Ovariectomi”, 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 II,

Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd  
NIP 195805281988021002

Anggota I,

Purwatiningsih, Ph.D  
NIP 19750505200032001

Anggota III,

Dr. Kahar Muzakhar, M.Si  
NIP 196805031994011001

Mengesahkan  
Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D  
NIP 196102041987111001

## RINGKASAN

**Efek Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam (*Glycine soja*) terhadap Kadar Kalsium dan Fosfor Pada Mencit (*Mus musculus*) Pasca Ovariectomi;** Rilla Nofita Putri, 151810401053; 2019; 34 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

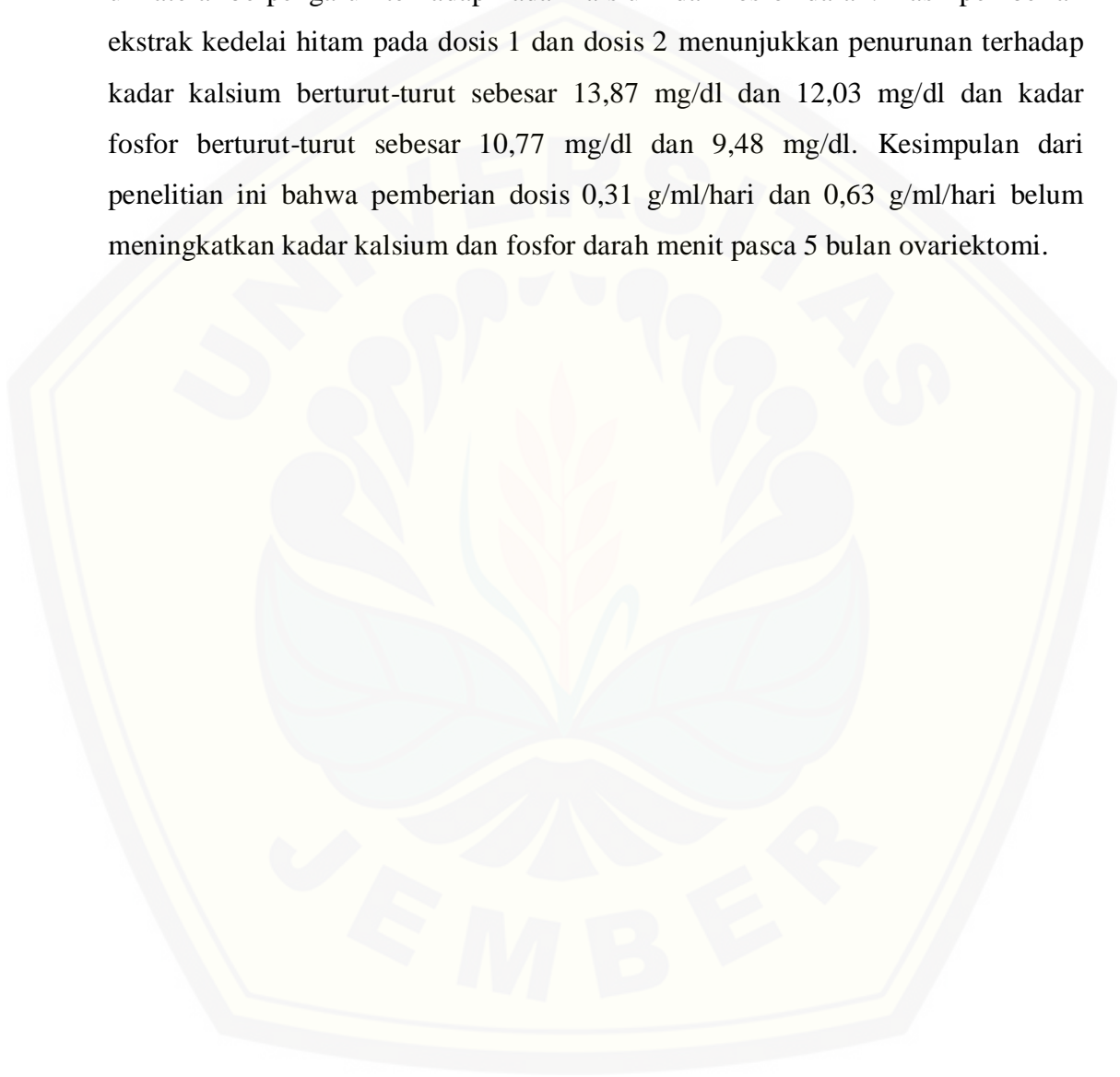
Ovariectomi merupakan tindakan pengangkatan ovarium pada organ reproduksi betina yang dapat menyebabkan defisiensi estrogen di dalam tubuh. Defisiensi estrogen berpengaruh terhadap penurunan kadar kalsium dan fosfor darah. Kedelai hitam merupakan salah satu tumbuhan yang termasuk dalam famili *Leguminoceae* yang mengandung senyawa fitoestrogen berupa isoflavon cukup tinggi. Isoflavon diketahui memiliki struktur yang mirip dengan estrogen endogen sehingga dapat menggantikan hormon estrogen endogen yang mengalami defisiensi.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental murni menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap). Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis pemberian ekstrak kedelai hitam, sedangkan untuk variabel terikatnya adalah kadar kalsium dan fosfor darah mencit yang diovariectomi secara unilateral. Pada penelitian ini digunakan 12 ekor mencit (*Mus musculus* L.) strain Balb/C umur 60 hari. Hewan uji tersebut dibagi menjadi empat kelompok, masing-masing menggunakan tiga ulangan, dengan pembagian sebagai berikut: kontrol negatif (mencit tidak diovariectomi unilateral dan tidak diberi ekstrak kedelai hitam), kontrol positif (mencit diovariectomi, tetapi tidak diberi ekstrak kedelai hitam), perlakuan dosis 1 (mencit diovariectomi unilateral, diberi ekstrak kedelai hitam 0,31 g/ml/hari), perlakuan dosis 2 (mencit diovariectomi unilateral dan diberi ekstrak kedelai hitam 0,63 g/ml/hari). Perlakuan dimulai pada bulan ke-5 pasca ovariectomi unilateral dengan cara melarutkan pasta dan akuades sesuai dosis yang ditetapkan. Pemberian ekstrak tepung kedelai hitam dilakukan secara oral selama 20 hari. Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah kadar kalsium dan fosfor darah mencit. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 99 % dengan taraf signifikansi  $\alpha = 0,01$



yang dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk melihat beda nyata antar kelompok perlakuan.

Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa pemberian ekstrak tepung kedelai hitam selama 20 hari pada mencit yang diovariectomi secara unilateral berpengaruh terhadap kadar kalsium dan fosfor darah. Hasil pemberian ekstrak kedelai hitam pada dosis 1 dan dosis 2 menunjukkan penurunan terhadap kadar kalsium berturut-turut sebesar 13,87 mg/dl dan 12,03 mg/dl dan kadar fosfor berturut-turut sebesar 10,77 mg/dl dan 9,48 mg/dl. Kesimpulan dari penelitian ini bahwa pemberian dosis 0,31 g/ml/hari dan 0,63 g/ml/hari belum meningkatkan kadar kalsium dan fosfor darah menit pasca 5 bulan ovariektomi.



## PRAKATA

Puji Syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam (*Glycine soja* Sieb. Et Zucc.) terhadap Kadar Kalsium dan Fosfor Pada Mencit (*Mus musculus* L.) Pasca Ovariektomi”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Biologi 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., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Purwatiningsih, Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran serta perhatiannya guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi terselesaikannya penulisan skripsi ini;
2. Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd., selaku Dosen Penguji I dan Dr. Kahar Muzakhar, M.Si., selaku Dosen Penguji II yang telah membantu memberikan saran serta kritik dalam penulisan skripsi ini;
3. Ibu Deenda Putri Duta Natalia, S.Tr., selaku Instruktur Laboratorium Politeknik Kesehatan Surabaya yang telah meluangkan banyak waktunya untuk membantu penulis dalam melakukan penelitian;
4. Rendy Setiawan, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing serta memberikan masukan dan saran selama penulis menjadi mahasiswa;
5. Ir. Efie Fadjarayah E.D, M.ST., selaku Teknisi Laboratorium Zoologi yang telah banyak meluangkan waktunya untuk membantu penulis melakukan penelitian;
6. Bapak dan Ibu dosen serta seluruh staf di lingkungan FMIPA Universitas Jember atas segala bimbingan dan keikhlasan dalam membantu penulis selama masa perkuliahan;

7. adik sepupuku yaitu Rizki Amalia, dan keluarga besarku terimakasih atas limpahan do'a, motivasi, pengorbanan, dan semangat yang tiada henti demi terselesaikannya skripsi ini;
8. rekan kerja selama penelitian Isna Kurotul Akyun, Fara Difka Afdilla, Resa Miftahatu Yuniar, Reno Astin Andriyani, Hilda Aunillah, dan Zilfi Dita Fitriyani terima kasih atas kerjasama dan dukungannya, kalian partner kerja sekaligus keluarga baru yang luar biasa;
9. kakak-kakak yaitu Yenny Febriana Ramadhan Abdi, Lidia Maziyyatun, dan Maulfi Dwi Lestari terima kasih atas kerjasamanya, terima kasih atas arahan, bimbingan, dan dukungannya selama penelitian;
10. sahabat-sahabatku Elisa Erni, Ain Nur Rofiko, Alvin Putri Nahdiyatin, Risa Charisatin Nisa', terima kasih atas segala batuan, do'a, motivasi, masukan, dan semangat yang kalian berikan;
11. teman-teman Biogenes15 tercinta (angkatan 2015) Jurusan Biologi Universitas Jember; teman-teman KKN 242 Pesanggrahan, terima kasih atas segala do'a dan dukungannya;
12. semua pihak yang telah memberikan sumbangan tenaga, semangat, dan pikiran yang tidak dapat disebutkan satu persatu oleh penulis dalam kelancaran penulisan skripsi ini.

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

Jember, 19 Juli 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
HALAMAN MOTTO .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN .....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN .....	vi
HALAMAN PENGESAHAN .....	vii
RINGKASAN.....	viii
PRAKATA.....	x
DAFTAR ISI .....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	2
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Batasan Masalah .....	2
1.4 Tujuan .....	3
1.5 Manfaat .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Potensi Kedelai Hitam Sebagai Sumber Fitoestrogen .....	4
2.2 Peran Kalsium dan Fosfor Darah Pada Organ Lain .....	5
2.3 Pengaruh Hormon Estrogen terhadap Keseimbangan Kalsium dan Fosfor dalam Darah.....	7
2.4 Hipotesis .....	9
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>10</b>
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	10
3.2 Alat dan Bahan.....	10

<b>3.3 Rancangan Penelitian.....</b>	<b>11</b>
<b>3.4 Alur Penelitian .....</b>	<b>12</b>
<b>3.5 Prosedur Pelaksanaan Penelitian .....</b>	<b>13</b>
<b>3.6 Parameter Penelitian.....</b>	<b>16</b>
<b>3.7 Analisis Data .....</b>	<b>16</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>17</b>
<b>BAB 5. PENUTUP .....</b>	<b>23</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>23</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>23</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>26</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>30</b>

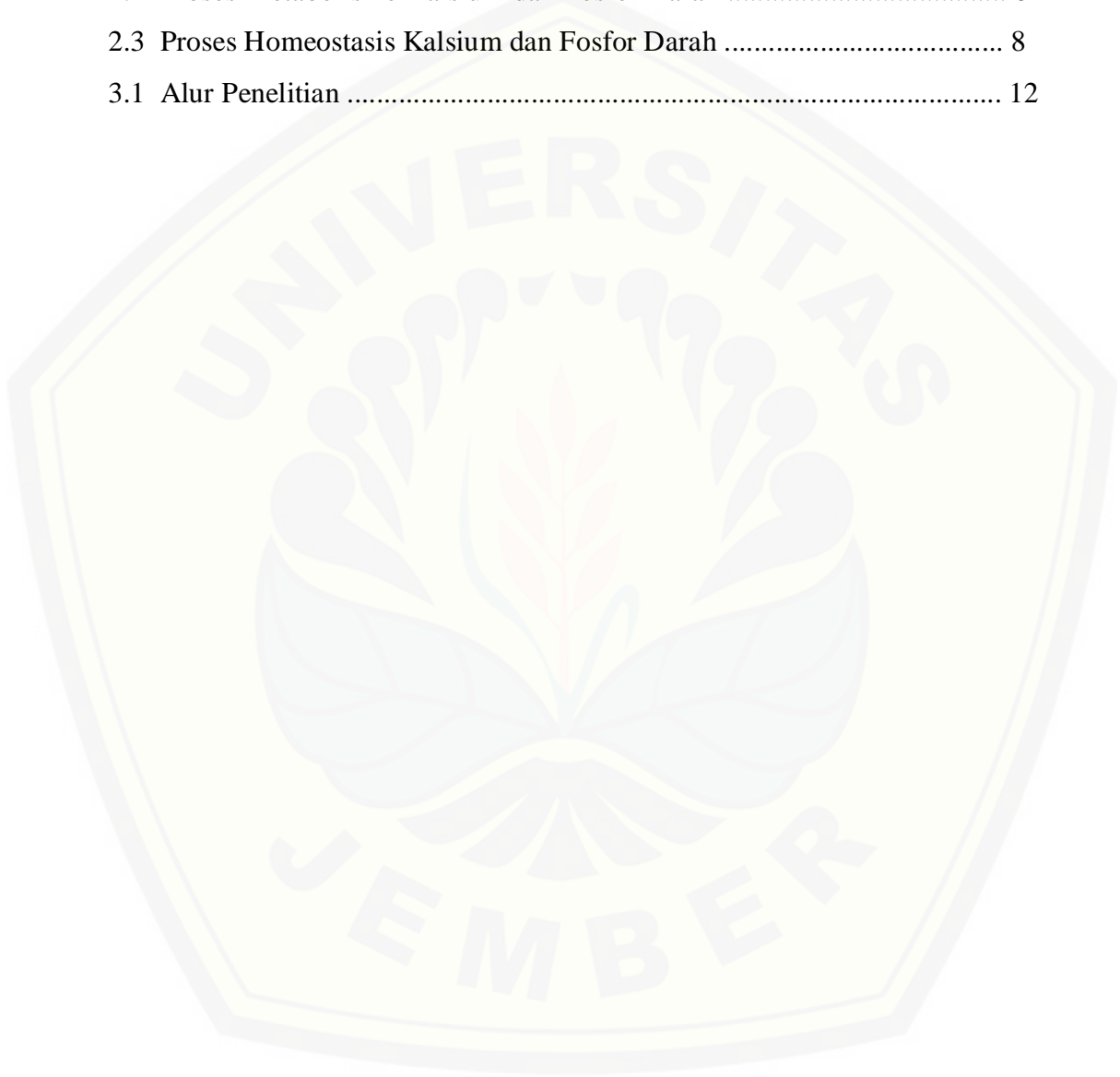
**DAFTAR TABEL**

	Halaman
4.1 Kadar Kalsium dan Fosfor Darah Mencit ( <i>M. musculus</i> ) Pasca Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam ( <i>G. soja</i> ).....	18



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Struktur Kimia Isoflavon .....	4
2.2 Proses Metabolisme Kalsium dan Fosfor Darah .....	6
2.3 Proses Homeostasis Kalsium dan Fosfor Darah .....	8
3.1 Alur Penelitian .....	12



**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
A. Penentuan Dosis Ekstrak Kedelai Hitam .....	30
B. Hasil Analisis <i>One Way</i> ANOVA Efek Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam terhadap Kadar Kalsium dan Fosfor Darah Mencit Pasca Ovariektomi Unilateral.....	31
C. Hasil Analisis Regresi Efek Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam terhadap Kadar Kalsium dan Fosfor Darah Mencit Pasca Ovariektomi Unilateral.....	33



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Ovariektomi merupakan tindakan pengangkatan ovarium pada organ reproduksi betina (Alagwu dan Nneli, 2005). Ovariektomi dapat mengakibatkan defisiensi estrogen di dalam tubuh. Hormon estrogen di dalam tubuh memiliki peranan yang penting antara lain berperan dalam mengatur *remodelling* tulang dan menghambat resorpsi tulang (Rochira *et al.*, 2015). Menurut Hartiningsih *et al.*, (2012), estrogen juga mempunyai peran menghambat aktivitas hormon paratiroid. Hormon paratiroid berfungsi merangsang pembebasan kalsium dan fosfor dari tulang, meningkatkan penyerapan kalsium dan fosfor dalam usus, dan meningkatkan penyerapan kalsium dalam ginjal serta menurunkan reabsorpsi fosfor dalam ginjal, sehingga proses homeostatis kalsium dan fosfor dalam darah dapat dipertahankan. Kalsium dan fosfor merupakan unsur utama dalam pembentukan tulang. Kadar kalsium berbanding lurus dengan kadar fosfor di dalam darah. Kalsium dan fosfor akan membentuk kalsium fosfat atau kristal kalsium hidroksiapatit sebagai penyusun utama pembentuk tulang (Sabri, 2013).

Defisiensi estrogen akibat ovariektomi akan diikuti oleh menurunnya kalsium di dalam tubuh, karena estrogen yang berfungsi untuk absorpsi kalsium di dalam usus berkurang. Selain itu, defisiensi estrogen juga dapat meningkatkan kerja hormon paratiroid, dan mempengaruhi resorpsi tulang (Elkomy dan Fahmy, 2015). Penyerapan kalsium dari tulang oleh tubuh akan mengakibatkan penurunan densitas tulang dan mempercepat proses kerapuhan tulang yang disebut osteoporosis (Suarsana *et al.*, 2011).

Upaya untuk menanggulangi defisiensi estrogen dapat dilakukan dengan pemberian senyawa fitoestrogen (Wiyasa *et al.*, 2008). Senyawa ini berperan sebagai sumber estrogen eksogen alami yang dapat menggantikan fungsi hormon estrogen endogen (Badziad, 2003). Pada tanaman, ada beberapa kelompok fitoestrogen antara lain isoflavon, lignan, dan kumestan (Wiyasa *et al.*, 2008). Hasil penelitian Regia (2015) menunjukkan bahwa pemberian infusa buah adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) dengan dosis 73 mg/100gbb, 146 mg/100gbb, dan 292

mg/100gbb dapat meningkatkan kadar kalsium dan fosfor darah pada tikus putih usia 15 hari pasca ovariektomi. Tanaman adas (*F. vulgare*) diketahui memiliki kandungan fitoestrogen berupa lignan (Setiawan, 2010). Penelitian Mustafa *et al.*, (2011) menyatakan bahwa pemberian ekstrak tanaman sipatah-patah (*Cissus quadrangularis*) dengan dosis 750 mg/kgBB/hari dapat meningkatkan kadar kalsium darah tikus setelah pemberian ekstrak tersebut selama 120 hari.

Selain buah adas (*F. vulgare*) dan tanaman sipatah-patah (*C. quadrangularis*), tanaman golongan Leguminoceae, khususnya tanaman kedelai juga mempunyai kandungan fitoestrogen yang tinggi, sehingga dapat digunakan sebagai sumber estrogen eksogen alami (Biben, 2012). Kelompok fitoestrogen yang diketahui memiliki afinitas tinggi dalam mengikat reseptor estrogen adalah isoflavon. Tanaman kedelai yang memiliki kandungan fitoestrogen berupa isoflavon yang tinggi yaitu kedelai hitam (*Glycine soja*). Kandungan isoflavon kedelai hitam terdiri atas genistein 56,9 %, daidzein 40,5 %, dan glycitein 2,6 % (Nakamura *et al.*, 2001). Berdasarkan latar belakang tersebut, maka perlu dilakukan penelitian mengenai efek pemberian kedelai hitam (*G. soja*) terhadap kadar kalsium dan fosfor darah mencit yang telah diovariektomi.

## 1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana efek pemberian ekstrak kedelai hitam (*Glycine soja*) terhadap kadar kalsium dan fosfor darah mencit (*Mus musculus* L.) pasca ovariektomi?

## 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini meliputi:

- a. Mencit yang digunakan pada penelitian ini adalah Strain Balb/C
- b. Ovariektomi dilakukan secara *unilateral ovariectomy*
- c. Pengukuran kadar kalsium dan fosfor pada darah
- d. Masa defisiensi estrogen mencit ovariektomi selama 5 bulan

#### 1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pemberian ekstrak kedelai hitam (*G. soja*) terhadap kadar kalsium dan fosfor darah mencit (*M. musculus*) pasca ovariektomi.

#### 1.5 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai manfaat ekstrak kedelai hitam (*G. soja*) yang merupakan sumber fitoestrogen sebagai salah satu alternatif untuk mengatasi masalah defisiensi estrogen, khususnya untuk meningkatkan kadar kalsium dan fosfor.

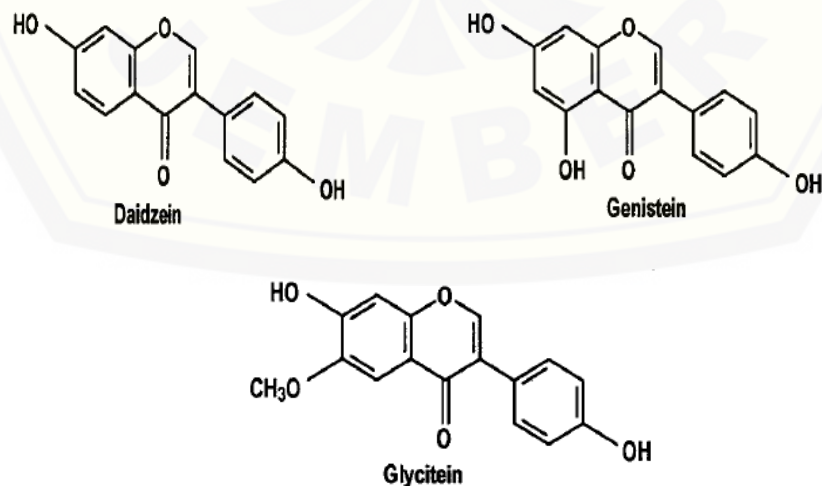


## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Potensi Kedelai Hitam Sebagai Sumber Fitoestrogen

Kedelai hitam (*G. soja*) merupakan salah satu tanaman yang termasuk dalam famili *Leguminoceae* dan diketahui paling banyak mengandung senyawa fitoestrogen yang berupa isoflavon dan derivatnya (Atun, 2009). Senyawa fitoestrogen terdiri atas 3 senyawa utama, yaitu isoflavon, kumestan, dan lignan (Glover dan Assinder, 2006). Kadar isoflavon pada kedelai hitam lebih tinggi dibandingkan dengan famili *Leguminoceae* lainnya seperti koro hitam, koro kratok, serta kedelai kuning (Sulistiani *et al.*, 2014).

Senyawa isoflavon termasuk dalam fitoestrogen kelompok flavonoid. Isoflavon yang banyak ditemukan pada tumbuhan dan biji-bijian mempunyai struktur kimianya mirip estrogen, serta mempunyai efek estrogenik dan dapat bekerja pada reseptor estrogen (Haron *et al.*, 2009). Isoflavon diketahui memiliki afinitas yang tinggi dalam mengikat reseptor estrogen dibandingkan dengan jenis fitoestrogen yang lainnya seperti lignan dan kumestan (Kuiper *et al.*, 1998). Menurut Nakamura *et al.*, (2001), disebutkan bahwa kandungan isoflavon pada kedelai hitam (*G. soja*) terdiri atas daidzein 40,5 %, genistein 56,9 %, dan glycitein 2,6 %. Struktur kimia isoflavon pada kedelai hitam seperti dapat dilihat pada gambar 2.1



Gambar 2.1 Struktur Kimia Isoflavon (Nakamura *et al.*, 2001)

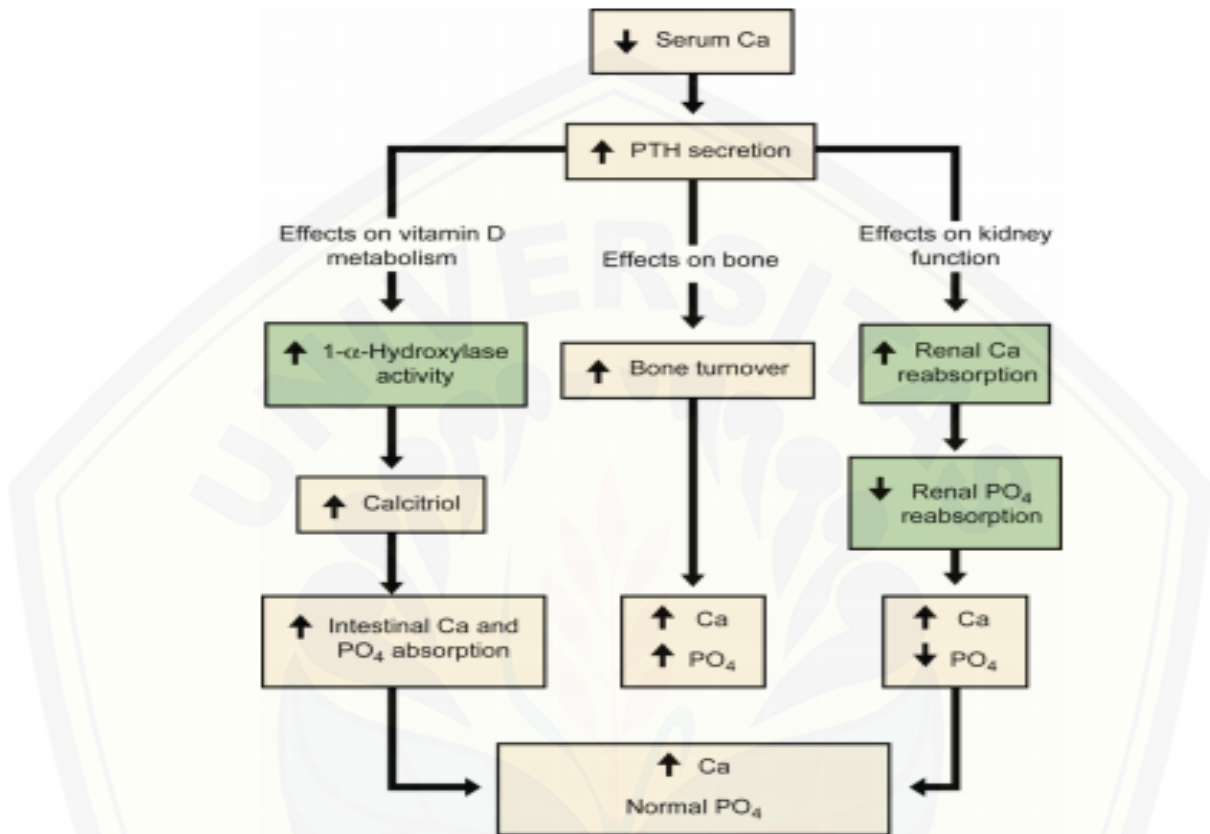
Menurut Suarsana *et al.*, (2011), kandungan isoflavon pada tepung tempe dapat meningkatkan kadar kalsium dan fosfor plasma darah, dengan demikian pemberian tepung tempe diduga dapat meningkatkan ketersediaan kalsium dan fosfor bagi tubuh. Menurut Manolagas (2000), dikatakan bahwa suplementasi estrogen eksogen alami dapat menurunkan aktivitas resorpsi tulang dan meningkatkan pembentukan tulang sehingga mencegah terjadinya osteoporosis pada wanita pasca menopause dan penurunan densitas tulang pada tikus ovariektomi.

Pemberian senyawa fitoestrogen dengan infusa buah adas (*F. vulgare*) dengan dosis 73 mg/100gbb, 146 mg/100gbb, dan 292 mg/100gbb dapat meningkatkan kadar kalsium dan fosfor pada tikus putih ovariektomi bilateral. Lebih lanjut disebutkan bahwa adanya kandungan fitoestrogen pada buah adas (*F. vulgare*) tersebut dapat meningkatkan kadar hormon estrogen di dalam tubuh. Peningkatan kadar hormon estrogen dapat menghambat pertumbuhan osteoklas dalam tulang sehingga terjadi penurunan penyerapan kalsium dan fosfor pada tulang secara fagositosis (Regia, 2015). Penelitian Mustafa *et al.*, (2011) menyatakan bahwa pemberian ekstrak tanaman sipatah-patah (*C. quadrangularis*) dengan dosis 750 mg/kgBB/hari dapat meningkatkan kadar kalsium dan fosfor darah tikus setelah pemberian ekstrak tersebut selama 30 hari, 60 hari, 90 hari, dan 120 hari.

## **2.2 Peran Kalsium dan Fosfor Darah Pada Organ Lain**

Kalsium dan fosfor merupakan mineral yang paling banyak terdapat di dalam tubuh. Kalsium dan fosfor di dalam tubuh sangat penting peranannya yaitu berperan dalam mineralisasi tulang (Elkomy and Fahmy, 2015). Menurut Bonjour (2013), konsentrasi ion kalsium ekstraseluler dapat menghambat proses osteoklastogenesis. Kalsium tidak hanya komponen utama dari tulang, tetapi juga sangat diperlukan untuk pembekuan darah dan untuk kontraksi setiap otot dalam tubuh termasuk jantung (Yusmiati dan Rahayu, 2017).

Defisiensi estrogen akan mengakibatkan penurunan kadar kalsium dan fosfor dalam darah. Proses metabolisme kalsium dan fosfor dalam darah dapat dilihat sebagaimana pada Gambar 2.2



Gambar 2.2 Proses Metabolisme Kalsium dan Fosfor Darah (Moe, 2008)

Metabolisme kalsium dan fosfor dalam darah dimulai dari adanya penurunan titer serum kalsium dalam darah. Penurunan kalsium dalam darah dapat mengakibatkan peningkatan sekresi hormon paratiroid dari kelenjar paratiroid. Hormon paratiroid akan bekerja pada tiga macam organ, yaitu tulang, usus, dan ginjal. Hormon paratiroid memiliki efek pada tulang yaitu meningkatkan proses *remodelling* tulang (*bone turnover*). Peningkatan proses *remodelling* tulang tersebut akan meningkatkan kalsium dan fosfor sehingga proses homeostatis kalsium dan fosfor dalam darah dapat dipertahankan. Hormon paratiroid juga akan bekerja pada ginjal dengan cara meningkatkan reabsorpsi kalsium dalam ginjal. Peningkatan reabsorpsi kalsium dalam ginjal tersebut akan mengakibatkan penurunan reabsorpsi fosfor dalam ginjal sehingga kadar kalsium

dan fosfor dalam darah dapat dipertahankan normal. Selain itu, peningkatan sekresi hormon paratiroid juga memiliki efek pada metabolisme vitamin D yaitu dengan meningkatkan aktivitas 1- $\alpha$ -Hydroxylase. Peningkatan aktivitas 1- $\alpha$ -Hydroxylase akan diikuti oleh peningkatan kalsitriol dan peningkatan absorpsi kalsium dan fosfor dalam usus. Peningkatan absorpsi kalsium dan fosfor dalam usus akan menyebabkan kadar kalsium dan fosfor dalam darah dapat dipertahankan.

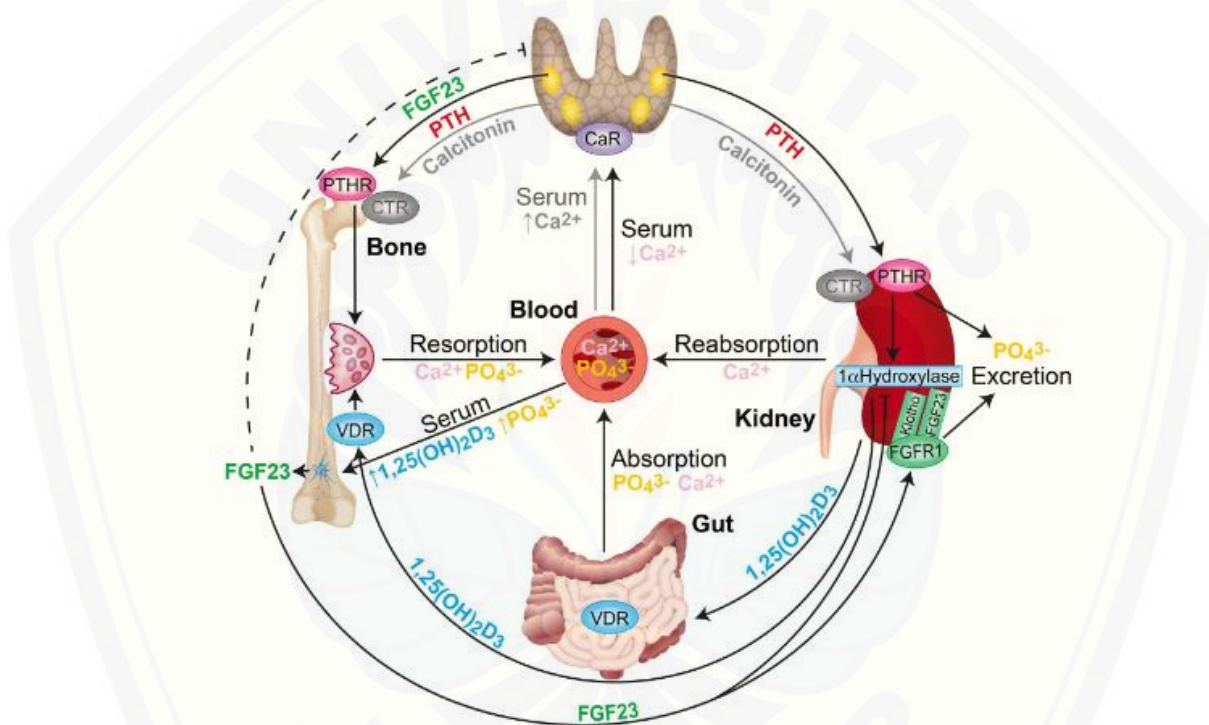
### **2.3 Pengaruh Hormon Estrogen terhadap Keseimbangan Kalsium dan Fosfor dalam Darah**

Estrogen merupakan hormon yang dihasilkan terutama oleh ovarium, dan sebagian oleh ginjal pada bagian korteks adrenal. Dalam tubuh manusia, estrogen berfungsi untuk pertumbuhan yang normal, serta untuk memelihara tubuh pada orang dewasa, baik pada pria maupun wanita. Pada wanita, hormon estrogen ini memiliki peranan yang lebih luas, yaitu tidak hanya berfungsi dalam sistem reproduksi tetapi juga berfungsi dalam regulasi kalsium dan fosfor dalam tubuh (Barnes dan Kein, 1998). Menurut Suhargo (2005), disebutkan bahwa defisiensi estrogen dalam tubuh dapat diakibatkan oleh ovariectomi atau pengambilan ovarium.

Ovariectomi merupakan istilah yang digunakan untuk tindakan menghilangkan ovarium pada sistem reproduksi betina. Dengan kata lain, ovariectomi juga dikatakan sebagai pengangkatan ovarium pada sistem reproduksi betina. Ovariectomi dibedakan menjadi dua yaitu pengangkatan satu ovarium atau *unilateral ovariectomy*, dan pengangkatan dua ovarium atau *bilateral ovariectomy* (Alagwu dan Nneli, 2005).

Menurut Van Abel *et al.*, (2003 dan 2002) defisiensi estrogen mengakibatkan penurunan absorpsi Ca usus dan peningkatan ekskresi Ca melalui ginjal. Kalsium dan fosfor dalam darah dipertahankan melalui proses homeostasis di dalam tubuh. Proses homeostasis melibatkan peran hormon lain yaitu hormon paratiroid, 1,25 dihidroksikolekalsiferol (Vitamin D3), dan kalsitonin (Scanes,

2014). Proses homeostasis kalsium diatur oleh mekanisme umpan balik antara hormon paratiroid dan kalsitonin. Kelenjar paratiroid akan mensekresikan hormon paratiroid jika kadar kalsium di dalam darah rendah (Widhyari, 1995). Penurunan kadar kalsium dalam darah akan mengaktifkan kelenjar paratiroid untuk meningkatkan sekresi hormon paratiroid yang antara lain bekerja pada tulang untuk meningkatkan resorpsi tulang. Hormon paratiroid yang meningkat juga akan menstimulasi ginjal untuk meningkatkan sekresi  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (Peacock, 2010). Proses homeostasis kalsium dapat dilihat pada gambar 2.3



Gambar 2.3 Proses Homeostasis Kalsium dan Fosfor Darah (Fischer *et al.*, 2018)

Penurunan kalsium terionisasi menstimulasi pelepasan hormon paratiroid (PTH), yang mempertahankan homeostasis kalsium dengan meningkatkan pelarutan mineral tulang, sehingga melepaskan kalsium dan fosfor, meningkatkan reabsorpsi ginjal kalsium dan ekskresi fosfor, dan meningkatkan penyerapan gastrointestinal kalsium dan fosfor secara tidak langsung melalui efeknya pada sintesis  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (calcitriol) (Moe, 2008).



#### 2.4 Hipotesis

Pemberian ekstrak kedelai hitam berpengaruh terhadap peningkatan kadar kalsium dan fosfor darah pada mencit pasca *unilateral ovariectomy*.



## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai Maret 2019 di Laboratorium Zoologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Pengukuran kadar kalsium dan fosfor dilakukan di laboratorium terpadu Politeknik Kesehatan Surabaya.

### 3.2 Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi kandang mencit berukuran 34 x 25 x 12 cm (bak plastik dan penutup dari ram kawat besi), botol minum mencit, jarum sonde, timbangan analitik 200 x 0,1 gram (*Ohaus*), jarum sonde lambung berujung tumpul (20 gauge, 5 cm), papan bedah, timbangan analitik 200 gram (*Ohaus*), *sput injection* (Terumo Syringe 1 cc/ml) 0,45 x 13 mm, *sput injection* (Terumo Syringe 3 ml) 0,65 x 32 mm, eskavator, *hecting set*, silet, jarum sutura no.2 (*One Med*), *beaker glass* (1000 ml, 600 ml, 200 ml), gelas ukur 100 ml, botol *schott* (1000 ml, 500 ml), corong plastik kecil, klem arteri, spatula, cawan porselen 75 cc, *grinder*, saringan tepung 60 mesh, *rotary evaporator*, *waterbath*, baki *stainless steel*, oven (*Incucell*), pisau, baki plastik, sendok, *microtube*, lemari pendingin, *sentrifuge*, mikropipet dan mikrotip, spektrofotometer.

#### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi hewan uji berupa mencit (*M. musculus*) betina strain Balb/C yang diperoleh dari Pusat *Veterrian* Farma Surabaya (Pusvetma), pakan pellet (BR1) produksi PT. Chaeron Pokphand Indonesia Animal Feedmill Co. Ltd Jakarta, aquades, sekam padi, serbuk gergaji kayu, *ketamine* 10 % (*Pantex-Holland B.V*), *xyla* (*Pantex-Holland B.V*), benang

*silk* nomor 3 (*One med*), benang *cat gut* nomor 3 (*One med*), betadine (*Povidone Iodine*) 10 %, Alkohol 70 % (*Mediss*), antibiotik (*Levofloxacin*), cairan infus 0,9 %, kasa steril (*One med*), kedelai hitam, akuades, paracetamol, kertas saring, kain saring, air sabun, dan garam fisiologis 0,9 %.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang akan digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) *Factorial Posttest Only Control Group Design* dengan 4 kelompok perlakuan dan 3 kali ulangan. Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis perlakuan pemberian ekstrak tepung kedelai hitam, sedangkan variabel terikat adalah kadar kalsium dan fosfor darah mencit yang diovariectomi. Penelitian ini menggunakan 12 ekor mencit (*M. musculus*) betina. Berikut ini pembagian kelompok uji dari penelitian ini :

Kelompok 1 : Kontrol negatif (mencit tanpa ovariektomi (ULO), tanpa pemberian ekstrak kedelai hitam)

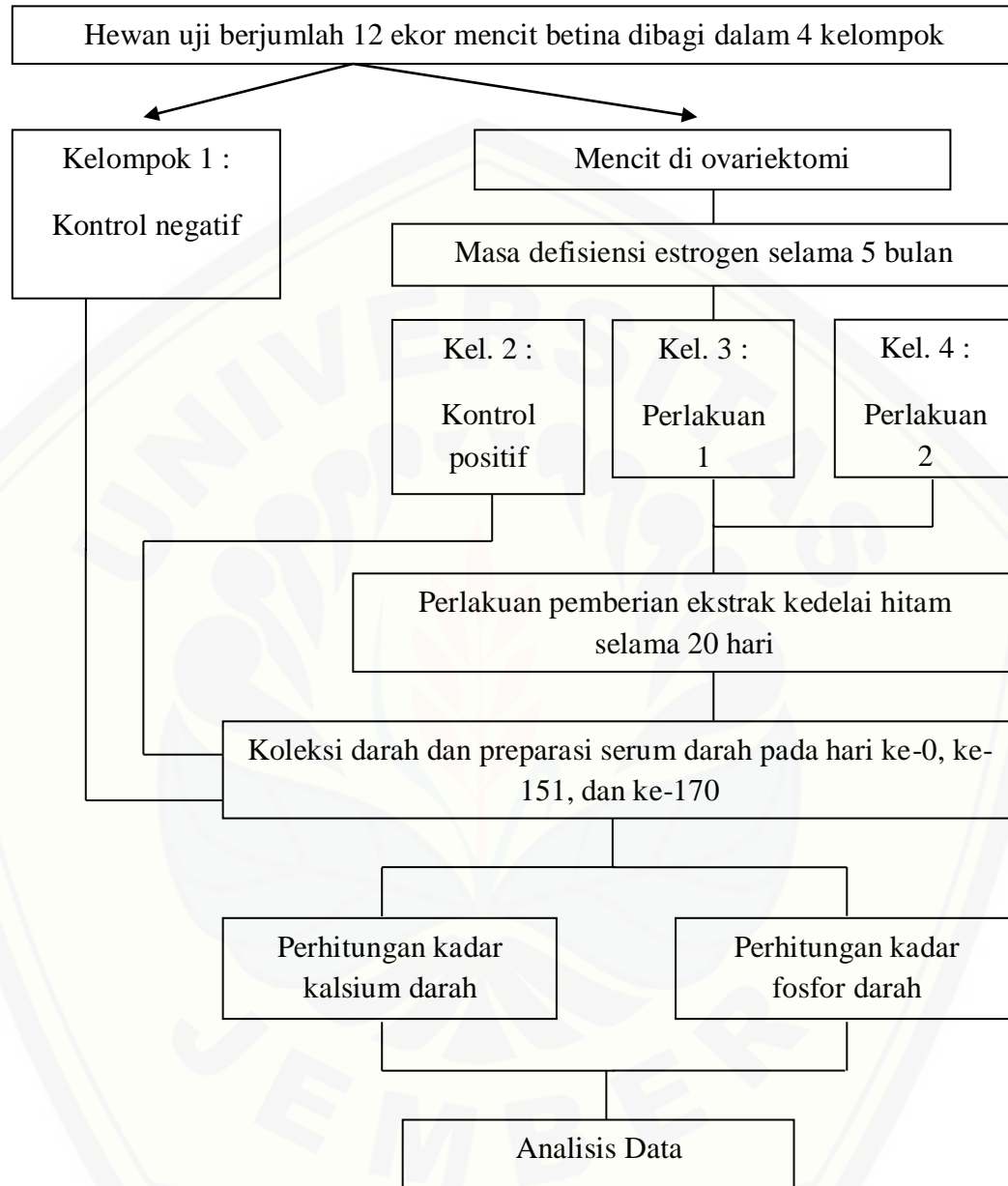
Kelompok 2 : Kontrol positif (mencit ovariektomi (ULO), tanpa pemberian ekstrak kedelai hitam)

Kelompok 3 : Perlakuan 1 (mencit ovariektomi (ULO), dengan pemberian ekstrak kedelai hitam dosis 0,31 gram/ml setiap hari, selama 20 hari ovariektomi)

Kelompok 4 : Perlakuan 2 (mencit ovariektomi (ULO), dengan pemberian ekstrak kedelai hitam dosis 0,63 gram/ml setiap hari, selama 20 hari ovariektomi)

### 3.4 Alur Penelitian

Secara garis besar alur penelitian dapat dilihat seperti gambar di bawah ini:



Gambar 3.1 Alur Penelitian

### 3.5 Prosedur Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu persiapan hewan uji, preparasi hewan uji ovariektomi unilateral, pembuatan ekstrak kedelai hitam, perlakuan hewan uji, koleksi darah dan preparasi serum darah, pengukuran kadar kalsium dan fosfor darah dengan AAS.

#### 3.5.1 Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah 12 ekor mencit betina (*M. musculus*) strain Balb/C yang dipelihara pada kandang yang terbuat dari plastik dengan penutup dari ram kawat besi berukuran 34 x 25 x 12 cm beralas sekam padi dan serbuk gergaji kayu. Mencit diberi pakan pellet (BR1) dan diberi minum aquades secara *ad libitum*.

#### 3.5.2 Preparasi Mencit *Unilateral Ovariectomy*

*Unilateral Ovariectomy* dilakukan dengan mengambil kedua ovarium mencit. Mencit dianestesi dengan *ketamine* 10 % dan *xyla* dengan perbandingan 1:1 sebanyak 0,05 ml per mencit secara intramuskular. Sebelum pembedahan, dilakukan sterilisasi pada papan bedah dan alat bedah dengan cara disemprot menggunakan alkohol 70 %. Kemudian mencit diletakkan terlentang diatas papan bedah yang selanjutnya diolesi air sabun anti bakteri dan dicukur rambut bagian medial perut. Selanjutnya dioleskan antiseptik *povidone iodine* untuk mencegah kontaminasi mikroba. 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).

Ovarium dipotong pada daerah antara *oviduct* dan ovarium dengan beberapa tahapan yaitu dijepit pada daerah ujung *oviduct* dengan klem arteri, kemudian diikat benang *silk* bagian pangkal batas klem arteri dan dipotong menggunakan gunting. 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 selama 1 minggu secara *ad libitum* (Strom *et al.*, 2012).

### 3.5.3 Pembuatan Ekstrak Kedelai Hitam

Kedelai hitam ditimbang, kemudian dioven dalam suhu 40-45 °C selama 2-3 hari. Selanjutnya digrinder dan diayak dengan ayakan 60 mesh. Setelah terbentuk tepung kedelai hitam ditimbang dan dimaserasi dalam alkohol 70 % dengan perbandingan 1:4, distirer elektrik 500 rpm selama 15 menit dan didiamkan selama 2 x 24 jam. Langkah berikutnya yaitu disaring untuk mendapatkan filtrat, dimasukkan ke dalam *rotary evaporator* selama ± 4-5 jam dengan suhu 80 °C hingga didapatkan filtrat murni. Proses terakhir adalah diletakkan dalam cawan porselen dan diletakkan pada *waterbath* suhu 70 °C selama ±8 jam untuk menghasilkan ekstrak tepung kedelai hitam dengan hasil konstan yang diharapkan ekstrak tersebut tidak mengandung air dan dalam bentuk pasta (Hastuti, 2015).

### 3.5.4 Perlakuan Hewan Uji

Perlakuan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah mencit yang telah diovariectomi diadaptasikan (aklimatisasi) selama 5 bulan dari bulan Juli sampai Desember 2018 di dalam kandang. Dua belas ekor mencit putih betina dibagi menjadi empat kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor. Mencit dari setiap kelompok dikandangkan secara terpisah di dalam kandang berbentuk kotak plastik berukuran 34 x 25 x 12 cm dengan tutup kawat yang mudah dibuka-tutup. Kandang dialasi dengan litter berupa serbuk gergaji yang

diganti setiap minggu agar kondisi kandang tetap kering dan bersih. Pakan berbentuk pelet dan air minum diberikan secara *ad libitum*. Hewan uji juga dilakukan perlakuan dengan memberikan ekstrak tepung kedelai hitam yang diberikan secara oral (metode *gavage*) menggunakan jarum sonde. Pemberian ekstrak kedelai hitam dimulai pada hari ke-1 pasca masa *recovery* ovariectomi sampai hari ke-20. Pemberian ekstrak kedelai hitam dengan cara mencampurkan takaran pasta dengan aquades 1 ml sesuai dengan dosis yang ditentukan yaitu 0,31 gr/ml, 0,63 gr/ml/hari.

#### 3.5.5 Koleksi Darah dan Preparasi Serum Darah

Pengambilan darah dilakukan melalui vena orbital pada hari ke-0, ke-151, dan ke-170. Pengambilan darah menggunakan pipa kapiler darah melalui vena orbital. Darah diambil  $\pm 200-300$   $\mu\text{l}$  dan dimasukkan ke dalam *microtube* tanpa adanya antikoagulan dan didiamkan pada suhu ruang sampai terjadi pembekuan. Selanjutnya dilakukan sentrifuse dengan kecepatan 3200 rpm selama 15 menit pada suhu 27 °C agar mendapat serum darah yang bagus. Setelah dilakukan sentrifuse, diambil supernatan dan disimpan pada suhu -20 °C (Tuck *et al.*, 2009). Pengukuran kadar kalsium dan fosfor dalam darah dilakukan dengan menggunakan *Atomic Adsorbtion Spectrophotometer* (AAS) (Tausky dan Shorr 1953).

#### 3.5.6 Pengukuran Kadar Kalsium dan Fosfor Darah dengan AAS

Pengukuran kadar kalsium dan fosfor darah dilakukan menggunakan alat AAS (*Atomic Adsorbtion Spectrophotometer*). Serum darah dipipet  $\pm 1$  ml ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 4 ml TCA 5 % untuk mengendapkan protein. Larutan dikocok dengan vortex hingga homogen, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Setelah dilakukan sentrifuse, diambil supernatan sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 ml Stronsium 5 % sebagai larutan penyangga atau penghilang gangguan

kimiawi pada unsur kalsium dan ditambahkan akuades sebanyak 8 ml, kemudian dikocok hingga homogen. Langkah selanjutnya adalah pembacaan absorbansi menggunakan alat AAS pada panjang gelombang 422 nm. Hasil pembacaan menggunakan AAS kemudian dibandingkan dengan kurva standar sehingga diperoleh kadar kalsium dan fosfor dalam satuan mg/dl atau ppm.

Pembuatan larutan standar kalsium maupun fosfor adalah dengan mengambil sebanyak 1 ml larutan stok kalsium dan fosfor 1000 ppm menggunakan pipet volume. Selanjutnya diencerkan ke dalam labu ukur 10 ml menggunakan akuades menjadi larutan kalsium dan fosfor 100 ppm. Langkah selanjutnya yaitu mengambil sebanyak 5 ml larutan kalsium dan fosfor 100 ppm dan mengencerkannya dalam labu ukur 50 ml menggunakan akuades menjadi larutan kalsium dan fosfor 10 ppm. Selanjutnya ditambahkan larutan  $\text{SrCl}_2$  sebanyak 1 ml pada masing-masing labu ukur, kemudian diencerkan dengan menggunakan akuades sampai tanda batas 10 ml. Pembuatan larutan standar kalsium dan fosfor berbagai konsentrasi dengan menggunakan perhitungan:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

### 3.6 Parameter Penelitian

Parameter penelitian yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar kalsium dan fosfor darah pada masing-masing kelompok hewan uji.

### 3.7 Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh akan ditabulasi dan dilakukan analisis statistik secara kuantitatif menggunakan SPSS versi 15.0 uji *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 99 % dengan taraf signifikansi  $\alpha = 0,01$ . Selanjutnya, untuk mengetahui beda nyata antar kelompok uji dilakukan analisis *Duncan Multiple Range Test (DMRT)* (Steel dan Torrie, 1993).



## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Pemberian ekstrak kedelai hitam selama 20 hari dengan dosis 0,31 g/ml/hari dan 0,63 g/ml/hari menurunkan kadar kalsium dan fosfor darah mencit pasca ovariectomi unilateral selama 5 bulan.

### 5.2 Saran

Penelitian ini merupakan langkah awal untuk mengetahui potensi ekstrak kedelai hitam (*Glycine soja*) sebagai alternatif hormon estrogen eksogen alami untuk mengatasi masalah defisiensi estrogen pada hewan uji ovariectomi secara unilateral dengan masa defisiensi estrogen selama 5 bulan terhadap kadar kalsium dan fosfor darah. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan penambahan lama waktu pemberian ekstrak kedelai hitam agar didapatkan hasil yang optimal terhadap peningkatan rata-rata kadar kalsium dan fosfor darah serta perlu dilakukan pengukuran kadar kalsium dan fosfor darah sebelum dan sesudah perlakuan pada masing-masing kelompok.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Alagwu, E.A., dan R.O. Nneli. 2005. Effect of ovariectomy on the levels of plasma sex hormones in albino rats. *Nigerian Journal Of Physiological Sciences*. 20(1-2): 90-94.
- Arjmandi, B.H., D.A. Khalil., dan B.W. Hollis. 2002 Soy protein: Its effects on intestinal calcium transport, serum vitamin D, and insulin-like growth factor-I in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 70: 483-487.
- Atun, Sri. 2009. Potensi senyawa isoflavon dan derivatnya dari kedelai (*Glycine max* L.) serta manfaatnya untuk kesehatan. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan, dan Penerapan MIPA Universitas Yogyakarta*.
- Badziad, A. 2003. *Menopause, Danropause, dan TSH*. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka.
- Bonjour, J.P. 2013. Calcium and phosphate: a duet of ions playing for bone health. *Journal of the American College of Nutrition*. 30(5): 438S-448S.
- Christakos, S., P. Dhawan., A. Porta., L.J. Mady., dan T. Seth. 2011. Vitamin D and intestinal calcium absorption. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 347. 25-29.
- Elkomy, M.M., Fahmy, G.E. 2015. Anti-osteoporotic effect of medical herbs and calcium supplementation on ovariectomized rats. *Journal of Basic & Applied Zoology*. 72: 81-88.
- Fischer, V., M. Haffner-Luntzer., M. Amling., dan A. Ignatius. 2018. Calcium and vitamin D in bone fracture healing and post-traumatic bone turnover. *European Cells and Materials*. Vol. 35. 365-385.
- Fleet, J.C., and Ryan, D.S. 2010. Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 47(4): 181-195.

Ganong, W.F. 2009. *Buku ajar kedokteran edisi 22*. Jakarta: EGC.

Glover, A., and S.J. Assinder. 2006. Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogens reduces fecundity and alters epididymal steroid hormone receptor expression. *Journal of Endocrinology*. 189: 565-573.

Haron, H., Amin, I., Azrina, A., Suzana, S., dan Loh Su, P. 2009. Daidzein and genestein contents in tempeh and selected soy products. *J. Food Chemistry*. 115: 1350-1356.

Hartiningsih., D. Anggraini., dan D. Aji. 2011. Suplementasi calcitriol meningkatkan retensi kalsium tikus ovariektomi. *J. Sain Vet*. 29(2): 94-101.

Hartiningsih., D. Anggraini., dan D. Aji. 2012. Respons metafisis tulang femur distalis tikus ovariektomi yang mengkonsumsi kalsitriol. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 6(2): 92-98.

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

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.

Kim, So Mi., Hyun, Sook Lee., Jae, In Jung., Ji, Hoon Lim., Wang-Hyun, Ha., Chang, Lae Jeon., Jae-Yong, Lee., and Eun, Ji Kim. 2018. Effect of isoflavone-enriched whole soy milk powder supplementation on bone metabolism in ovariectomized mice. *Nutrition Research and Practice*. 12(4): 275-282.

Kuiper, G.G.J.M., Josephine, G.L., Bo, Carlsson., J. Christopher, C., Stephen, H.S., Paul, T. Van der Saag., Bart, Van der Burg, dan Jan-Ake, G. 1998. Interaction of estrogenic chemical and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrinology*. 139: 4252-4263.

Ledesma, L.M., D.A. Ramirez, E. Vierya, A. Trujilo, R. Chavira, M. Cardenas dan R. Dominguez. 2011. Effect of acute unilateral ovariectomy to prepubertal rats on steroid hormones secretion and compensatory ovarian responses. *Journal Reproductive Biology and Endocrinology*. 9(41).

- Lestari, M.D. 2017. Efek pemberian ekstrak tepung kedelai hitam (*Glycine soja*) terhadap implantasi mencit (*Mus musculus*) strain Balb/C pasca ovariektomi unilateral. *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Manolagas, S.C. 2000. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* 21: 115-137.
- Moe, S.M. 2008. Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium. *Prim Care.* 35(2): 1-19.
- Mustafa, S., Nurhidayat., Koeswinaring, S., Bambang, P.P., dan Wasmen, M. 2011. Kualitas tulang tikus betina norman yang diberi ekstrak sipatah-patah pada masa pertumbuhan
- Nakamura, Y., A. Kaihara, K. Yoshii, Y. Tsumura, S. Ishimitsu, dan Y. Tonogai. 2000. Content and composition of isoflavonoids in mature or immature beans and bean sprouts consumed in Japan. *Journal of Health Science.* 47(4): 394-406.
- Nurhidayah. 2013. Analisis kadar kalsium dalam darah tikus betina (*Rattus novergicus*) ovariektomi yang diberi sari kedelai yang difortifikasi dengan kalsium dari cangkang telur ayam ras secara spektroskopi serapan atom. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar.
- Parinduri, F.K., M. Zen, R., dan Siti, F. 2017. Hubungan asupan kalsium, vitamin D, fosfor, kafein, aktivitas fisik dengan kepadatan tulang pada wanita dewasa muda. *Jurnal Kesehatan Masyarakat.* 5(4): 664-674.
- Peacock, M. 2010. Calcium metabolism in health and disease. *Clin J. Am Soc Nephro.* 5: S23-S30.
- Primiani, Cicielia N. 2013. Potensi tepung tempe sebagai estrogen alami terhadap uterus mencit premenopause. *Sains & Mat.* 1(2): 47-51.

- Rahma, H. 2010. Karakteristik senyawa bioaktif isovlavon dan uji aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol tempe berbahan baku kedelai hitam (*Glycine soja*), Koro Hitam (*Lablab purpureus*), dan koro kratok (*Phaseolus lunatus*). *Tesis*. Surakarta: Progam Pascasarjana Universitas Sebelas Maret.
- Regia, R. 2015. Efektivitas pemberian infusa buah adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) terhadap peningkatan kadar kalsium dan fosfor darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariektomi. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan IPB.
- Rochira, V., Elda, K., dan Cesare, C. 2015. *Review article: The endocrine role of estrogens on human male skeleton*. Hindawi Publishing Corporation.
- Sabri, M. 2013. Pengaruh tanaman anti-osteoporosis sipatah-patah (*Cissus quadrangularis* Salibs) pada gambaran histopatologis kelenjar paratiroid dan tulang tikus (*Rattus norvegicus*). *JESBIO*. 2(1): 38-44.
- Safrida. 2008. Perubahan kadar hormon estrogen pada tikus yang diberi tepung kedelai dan tepung tempe. *Tesis*. Institut Pertanian Bogor.
- Scanes C.G. 2014. *Sturkie's Avian Physiology*. Sixth edition. Department of Biological Sciences. University of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA:554-565.
- Setiawan. 2010. Aktivitas ekstrak metanol buah adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) terhadap lama siklus estrus serta bobot uterus dan ovarium tikus putih. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan IPB.
- Sihombing, I., Sunny, W., dan Sonny, J.R.K. 2012. Peran estrogen pada remodeling tulang. *Jurnal Biomedik*. 4(3): S18-28.
- Strom, O., J., A. Theodorsson, E. Ingberg, I.M. Isaksson dan E. Theodorsson. 2012. Ovariectomy and 17  $\beta$ -estradiol replacement in rats and mice: A visual demonstration. *Journal of Visualized Experiments*. 64: 1-4.
- Suarsana, I Nyoman., I.N.S. Dharmawan., dan I.W. Gorda. 2011. Tepung tempe kaya isoflavon meningkatkan kadar kalsium, posfor, dan estrogen plasma tikus betina normal. *Jurnal Ve* . 12(3): 229-234.

- Suarsana, I Nyoman., Samuel, L.S., I Nyoman, S.D., I Made, K., dan Bambang, P.P. 2014. Pemberian tepung tempe meningkatkan kualitas tulang pada tikus ovariektomi. *Jurnal Veteriner*. 15(4): 548-556.
- Suhargo, L. 2005. Efek estrogenik ekstrak daun hasandeuleum (*Graptophyllum pictum* L.) Griff pada histologi uterus mencit betina ovariektomi. *Berk. Penel. Hayati*: 10 : 107-110.
- Sulistiani, H.R., Sri, H., dan Artini, P. 2014. Karakterisasi senyawa bioaktif isoflavon dan uji aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol tempe berbahan baku kedelai hitam (*Glycine soja*), koro hitam (*Lablab purpureus*), dan koro kratok (*Phaseolus lunatus*). *Biofarmasi*. 12(2): 62-72.
- Steel, R., dan Torrio J. 1993. *Prinsip dan prosedur statistik*. Terjemahan dari Principles dan Procedure of Statistic . Jakarta: Gedia Pustaka.
- Taussky, H.H., Shorr, E. 1953. A micro colorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem*. 202: 675-685.
- Trisunuwati, P. 2017. Efficacy of water clover (*Marsilea crenata*) extract against blood estrogen progesterone balance, blood calcium levels and impact on dense of bone tissue of rat (*Rattus norvegicus*). *Research Journal of Life Science*. 4(1): 50-55.
- Tuck, M.K., D.W. Chan, D. Chia, A. K. Godwin, W.E. Grizzle, K.E. Krueger, W.Rom, M. Sanda, L. Sorbara, S. Stass, W. Wang dan D.E. Brenner. 2009. Standard operating procedures for serum and plasma collection: Early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group. *J. Proteome Res*. 8(1): 113-117.
- Usdiati, Teti. 1986. Defisiensi kalsium dan fosfor pada sapi. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan IPB.
- Van Abel, M., Hoenderop, J.G.J., Dardenne, O., St. Arnaud, R., Van Os, C.H., Van Leeuwen, H.J.P.T.M. and Bindels, R.J.M. 2002. 1,25-Dihydroxyvitamin D3-independ stimulatory effect of estrogen on the expression of ECaC1 in the kidney. *J. Am. Nephrol*. 13: 2102-2109.

- Van Abel, M., Hoenderop, J.G., van der Kemp, A.W., van Leeuwen, J.P., Bindels, R.J. 2003. Regulation of the epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285: 978-985.
- Wang, C., and Mindy, S.K. 1997. Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *J. Nutrition and Cancer.* 28(3): 236-247.
- Widhyari, S.D. 1995. Studi perbandingan tentang kandungan kalsium, fosfor, magnesium, dalam pakan dan serum serta beberapa kimia darah sapi FH bunting antara peternakan skala kecil dan skala besar. *Tesis.* Bogor: Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Wiyasa, I.W.A., E. Norahmawati., dan Soehartono. 2008. Pengaruh isoflavone genistein dan daidzein ekstrak tokbi (*Peuraria lobata*) strain Kangean terhadap jumlah osteoblas dan osteoklas (*Rattus novergicus*) Wistar hipotrogenik. *Indonesian Journal of Obstetrics and gynecology.* 32(3): 248-153.
- Yuasari, Rindang. 2015. Perilaku *human osteoblast cell line* MG63 (proliferasi osteoblas, konsentrasi alkali fosfatase dan osteokalsin) terhadap paparan *bovine periosteal membrane* produksi batan (penelitian in-vitro). *Tesis.* Jakarta: Program Studi Ilmu Bedah Mulut dan Maksilofasial. Universitas Indonesia.
- Yusmiati, S.N.H., dan Rahayu, E.W. Pemeriksaan kadar kalsium pada masyarakat dengan pola makan vegetarian. *Jurnal Sains Health.* 1(1): 43-49.
- Zhang, Yongzhong., Longjiang, Yu., Mingzhang, Ao., and Wenwen, Jin. 2006. Effect of ethanol extract of *Lepidium meyenii* Walp. on osteoporosis in ovariectomized rat. *Journal of Ethnopharmacology.* 105: 274-279.

## LAMPIRAN

### A. Penentuan Dosis Ekstrak Kedelai Hitam

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

- Konversi pasta dari berat kering tempe kedelai.

Berat kering tepung kedelai hitam	:	Berat pasta
3700 gram	:	56,4 gram
1 gram	:	0,086 gram

10 gram BK/100 gram BB tikus

10 gram BK/100 gram BB = 0,01 gram BK/ gram tikus

- Rata-rata BB tikus = 200 gram  
 $0,1 \times 200 = 20$  gram BK/200 gram BB mencit
- Konvers 200 gram tikus  $\rightarrow$  20 gram BB mencit = 0,14.  
 $20 \times 0,14 = 2,8$  gram
- Dikonversikan ke pasta  
 $2,8 \times 0,086 = 0,24$  gram pasta/ 20 gram BB mencit  
 $0,24/20 = 0,12$  gram pasta/ gram BB mencit
- Rata-rata BB mencit perlakuan = 35 gram  
 $0,12 \times 35 = 0,42$
- Penentuan dosis diambil dari acuan yaitu 0,42 gram, setengah lebih tinggi = 0,63 gram (Dosis 2) dan setengah lebih rendah dari 0,63 adalah 0,31 gram (Dosis 1) (Lestari, 2017).



## B. Hasil Analisis *One Way* ANOVA Efek Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam terhadap Kadar Kalsium dan Fosfor Darah Mencit Pasca Ovariectomi Unilateral

### a. Uji *One Way* ANOVA Kadar Kalsium

#### Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadarkalsium Kontrol Negatif	,333	3	.	,862	3	,274
Kontrol Positif	,335	3	.	,858	3	,263
Dosis 1	,294	3	.	,920	3	,454
Dosis 2	,325	3	.	,876	3	,312

a. Lilliefors Significance Correction

#### Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol Negatif	3	26,0700	,14000	,08083	25,7222	26,4178	25,91	26,17
Kontrol Positif	3	18,9533	,29143	,16826	18,2294	19,6773	18,62	19,16
Dosis 1	3	13,8667	1,97520	1,14038	8,9600	18,7733	11,65	15,44
Dosis 2	3	12,0300	,49153	,28378	10,8090	13,2510	11,47	12,39
Total	12	17,7300	5,75166	1,66036	14,0756	21,3844	11,47	26,17

#### Test of Homogeneity of Variances

##### Kadarkalsium

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7,122	3	8	,012

#### ANOVA

##### Kadarkalsium

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	355,402	3	118,467	111,563	,000
Within Groups	8,495	8	1,062		
Total	363,898	11			

**Kadarkalsium**

Kelompok	N	Subset for alpha = .01		
		1	2	3
Duncan <sup>a</sup> Dosis 2	3	12,0300		
Dosis 1	3	13,8667		
Kontrol Positif	3		18,9533	
Kontrol Negatif	3			26,0700
Sig.		,061	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Uji *One Way* ANOVA Kadar Fosfor

**Tests of Normality**

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadarkalsium Kontrol Negatif	,304	3	.	,907	3	,407
Kontrol Positif	,219	3	.	,987	3	,780
Dosis 1	,294	3	.	,921	3	,455
Dosis 2	,238	3	.	,976	3	,702

a. Lilliefors Significance Correction

**Descriptives**

Kadarkalsium

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol Negatif	3	17,4400	,14177	,08185	17,0878	17,7922	17,28	17,55
Kontrol Positif	3	14,3400	,07550	,04359	14,1525	14,5275	14,26	14,41
Dosis 1	3	10,7733	1,25061	,72204	7,6666	13,8800	9,37	11,77
Dosis 2	3	9,4800	,22271	,12858	8,9268	10,0332	9,24	9,68
Total	12	13,0083	3,30084	,95287	10,9111	15,1056	9,24	17,55

**Test of Homogeneity of Variances**

Kadarkalsium

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7,811	3	8	,009

**ANOVA**

Kadarkalsium

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	116,572	3	38,857	94,807	,000
Within Groups	3,279	8	,410		
Total	119,851	11			

**Kadarfosfor**

Kelompok	N	Subset for alpha = .01		
		1	2	3
Duncan <sup>a</sup> Dosis 2	3	9,4800		
Dosis 1	3	10,7733		
Kontrol Positif	3		14,3400	
Kontrol Negatif	3			17,4400
Sig.		,038	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

**C. Hasil Analisis Regresi Efek Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam terhadap Kadar Kalsium dan Fosfor Darah Mencit Pasca Ovariectomi Unilateral**

**Correlations**

		Kadarkalsium	Kelompok	Ulangan	Kadarfosfor
Pearson Correlation	Kadarkalsium	1,000	-,958	-,087	,992
	Kelompok	-,958	1,000	,000	-,971
	Ulangan	-,087	,000	1,000	-,092
	Kadarfosfor	,992	-,971	-,092	1,000
Sig. (1-tailed)	Kadarkalsium	.	,000	,395	,000
	Kelompok	,000	.	,500	,000
	Ulangan	,395	,500	.	,388
	Kadarfosfor	,000	,000	,388	.
N	Kadarkalsium	12	12	12	12
	Kelompok	12	12	12	12
	Ulangan	12	12	12	12
	Kadarfosfor	12	12	12	12

**Model Summary**

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,993 <sup>a</sup>	,985	,980	,81439

a. Predictors: (Constant), Kadarfosfor, Ulangan, Kelompok

b. Dependent Variable: Kadarkalsium

Coefficients<sup>a</sup>

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-8,859	6,980		-1,269	,240
	Kelompok	,555	,948	,113	,585	,574
	Ulangan	,099	,312	,015	,316	,760
	Kadarfosfor	1,922	,337	1,103	5,706	,000

a. Dependent Variable: Kadarkalsium

