



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI AKTIVITAS ANTIOSTEOPOROSIS EKSTRAK ETANOL  
70% BUAH KACANG PANJANG (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)  
BERDASARKAN PENURUNAN JUMLAH OSTEOKLAS  
PADA *GROWTH PLATE* TULANG TIKUS YANG  
DIOVARIEKTOMI**

**SKRIPSI**

**MELDA SILVIA SARI SILALAH I  
0806327875**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI FARMASI  
DEPOK  
JULI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI AKTIVITAS ANTIOSTEOPOROSIS EKSTRAK ETANOL  
70% BUAH KACANG PANJANG (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)  
BERDASARKAN PENURUNAN JUMLAH OSTEOKLAS  
PADA *GROWTH PLATE* TULANG TIKUS YANG  
DIOVARIKTOMI**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

**MELDA SILVIA SARI SILALAH  
0806327875**

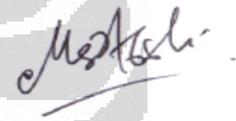
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI FARMASI  
DEPOK  
JULI 2012**

## **SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 10 Juli 2012



Melda Silvia Sari Silalahi

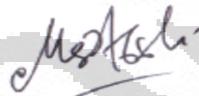
## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Melda Silvia Sari

NPM : 0806327875

Tanda Tangan :



Tanggal : 10 Juli 2012

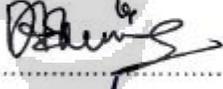
## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Melda Silvia Sari Silalahi  
NPM : 0806327875  
Program Studi : Farmasi  
Judul Skripsi : Uji Aktivitas Antiosteoporosis Ekstrak Etanol  
70% Buah Kacang Panjang (*Vigna unguiculata*  
(*L.*) *Walp.*) Berdasarkan Penurunan Jumlah  
Osteoklas pada *Growth Plate* Tulang Tikus yang  
Diovariectomi

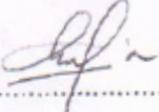
Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Anton Bahtiar, M.Biomed, Apt. (.....) 

Pembimbing II : Dr. Dadang Kusmana, MS (.....) 

Penguji I : Santi Purna Sari, S. Si., M. Si (.....) 

Penguji II : Dr. Berna Elya, M.Si., Apt. (.....) 

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 10 Juli 2012

## KATA PENGANTAR

Segala puji, syukur, hormat, dan kemuliaan penulis panjatkan ke hadirat Allah Bapa, Allah Putra, dan Allah Roh Kudus atas segala berkat, karunia, serta kasih setiaNya yang tidak pernah berkesudahan dalam kehidupan penulis sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa penyelesaian skripsi ini bukan hanya atas hasil usaha penulis sendiri, melainkan karena bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak sejak awal masa perkuliahan, penelitian, dan sampai pada penyusunan skripsi ini. Tanpa mereka, sulit rasanya penulis sampai pada tahap penyelesaian skripsi ini. Oleh karena itu, penulis ingin sekali mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr. Anton Bahtiar, M. Si, Apt. dan Dr. Dadang Kusmana, MS, selaku pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktunya dan dengan sabar memberikan arahan, bimbingan, nasehat, serta saran dalam melaksanakan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S, selaku Ketua Departemen Farmasi UI yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk melaksanakan penelitian ini.
3. Dra. Retnosari Andrajati, M.S., Ph.D, Apt. selaku Kepala Laboratorium Farmakologi Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan nasehat dan ijin untuk melaksanakan penelitian di laboratorium yang dipimpinya.
4. Prof. Dr. Effionora Anwar M.S selaku pembimbing akademik yang telah memberikan saran dan ijin untuk dapat melaksanakan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
5. Dr. Dra. Berna Elya, Apt., M.S., selaku koordinator pendidikan S1 Reguler Fakultas Farmasi UI yang telah memberikan ijin, kesempatan dan nasehat untuk menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

6. Bapak dan Ibu staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi UI.
7. P.T Novell Pharmaceutical Laboratories atas pemberian Natrium Alendronat untuk penelitian ini.
8. Ayahanda dan Ibunda tercinta, yang telah memberikan doa yang tiada hentinya, arahan, motivasi, nasihat dan dukungan penuh selama masa perkuliahan, penelitian, sampai kepada penyusunan skripsi.
9. Sahabat-sahabat serta keluarga besar, yaitu Bella, Chrisna, Eka, Emy, Lidya, May, Vero, Mawar, Qothrunnada, Dita A., Kak Indana, Mia, Kartika, Yuan, Rimson, Danik, anak-anak PO Farmasi UI, PO FMIPA UI, Kak Mario, Kak Corry, Gita, Chyntia, Bang Alfa, Kak Ingrid, Monalisa, dan banyak nama lagi yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang telah dengan setia memberikan bantuan, dukungan, kasih, semangat, motivasi, serta doa yang tiada henti untuk penulis khususnya selama proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.
10. Teman-teman Farmasi UI 2008 yang telah membantu dan menemani dari masa perkuliahan sampai penelitian, dan teman-teman selain di Farmasi, terima kasih atas dukungan dan kasih sayang yang sudah diberikan.

Akhirnya hanya doa dan harapan yang bisa penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa untuk membalas segala kebaikan pihak-pihak yang telah membantu penyelesaian skripsi ini. Meskipun penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini, namun penulis berharap semoga skripsi ini dapat berguna bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Penulis

2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Melda Silvia Sari Silalahi  
NPM : 0806327875  
Program Studi : Farmasi  
Departemen : Farmasi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Skripsi

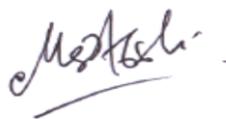
demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Uji Aktivitas Antiosteoporosis Ekstrak Etanol 70% Buah Kacang Panjang (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Berdasarkan Penurunan Jumlah Osteoklas pada *Growth Plate* Tulang Tikus yang Diovariektomi

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok  
Pada tanggal : 10 Juli 2012  
Yang menyatakan



(Melda Silvia Sari Silalahi)

viii

## ABSTRAK

Nama : Melda Silvia Sari Sialahi  
Program Studi : Farmasi  
Judul : Uji Aktivitas Antiosteoporosis Ekstrak Etanol 70% Buah Kacang Panjang (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Berdasarkan Penurunan Jumlah Osteoklas pada *Growth Plate* Tulang Tikus yang Diovariectomi

Kandungan fitoestrogen dalam buah kacang panjang (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) dapat mencegah kehilangan massa tulang akibat defisiensi estrogen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antiosteoporosis dari ekstrak etanol 70% buah kacang panjang berdasarkan jumlah sel osteoklas pada *growth plate* tulang trabekular tikus yang telah diovariectomi. Dalam penelitian ini dilakukan ovariectomi pada 30 ekor tikus putih betina dan pembedahan tanpa ovariectomi pada 6 ekor tikus betina lainnya. Tikus-tikus ini kemudian dibagi menjadi 6 kelompok. Kelompok I sebagai kontrol negatif yang mendapat CMC 0,5%, kelompok II sebagai kontrol positif yang mendapat larutan natrium alendronat dengan dosis 0,18 mg/200 g BB tikus, kelompok III, IV, dan V merupakan kelompok dosis yang diberikan ekstrak buah kacang panjang dengan dosis berturut-turut, 100; 200; dan 400 mg/200 g BB tikus yang disuspensikan dalam CMC 0,5%, dan kelompok VI sebagai kelompok *sham* diberikan CMC 0,5%. Pemberian perlakuan dimulai pada hari ke-21 pascaovariectomi dan diberikan perlakuan selama 28 hari. Pada hari ke-29 pasca pemberian ekstrak, tikus dikorbankan dan diukur berat uterusnya serta diambil tulang trabekularnya untuk dibuat menjadi suatu preparat histologi. Penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak buah kacang panjang dapat digunakan sebagai agen antiosteoporosis dengan dosis optimum adalah dosis 100 mg/200 g BB tikus.

Kata kunci : antiosteoporosis, *ovariectomi*, kacang panjang, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., natrium alendronat, osteoklas, histologi

xv + 92 halaman ; 18 gambar; 10 tabel; 8 lampiran  
Daftar Pustaka : 72 (1986-2010)

## ABSTRACT

Name : Melda Silvia Sari Silalahi  
Program Study : Pharmacy  
Title : Antiosteoporosis Activity Test of 70% Ethanollic Extract of Long Bean (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Based on Osteoclasts Reduction in Bone *Growth Plate* of Ovariectomized Rat.

The content of phytoestrogens in long bean (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) can prevent loss of bone mass caused by estrogen deficiency. This study aimed to determine the effect of antiosteoporosis of 70% ethanollic extract of long bean based on the number of osteoclasts in trabecular bone growth plate that had been ovariectomized rats. Ovariectomy in this study was conducted on 30 female white rats and surgery without ovariectomy in female rats 6 others. These rats were divided into 6 groups. Group I as a negative control group which received 0.5% CMC, group II as a positive control group who received a dose of sodium alendronate solution of 0.18 mg/200 g BW rats, group III, IV, and V is the dose given long bean extracts length with successive doses, 100; 200; and 400 mg/200 g BW rats suspended in 0.5% CMC, and the group VI as a sham group given 0.5% CMC. Provision of treatment started at day-21 post-ovariectomy and given treatment for 28 days. On day 29 after receiving the extract, the rats were sacrificed and uterus weight was measured and taken his trabecular to be made into a histological preparation. This study showed that administration of long bean extract can be used as an antiosteoporosis agent, the optimum dose is the dose of 100 mg/200 g BW rats.

Key word : antiosteoporosis, ovariectomy, long bean, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., sodium alendronate, osteoclast, histology.

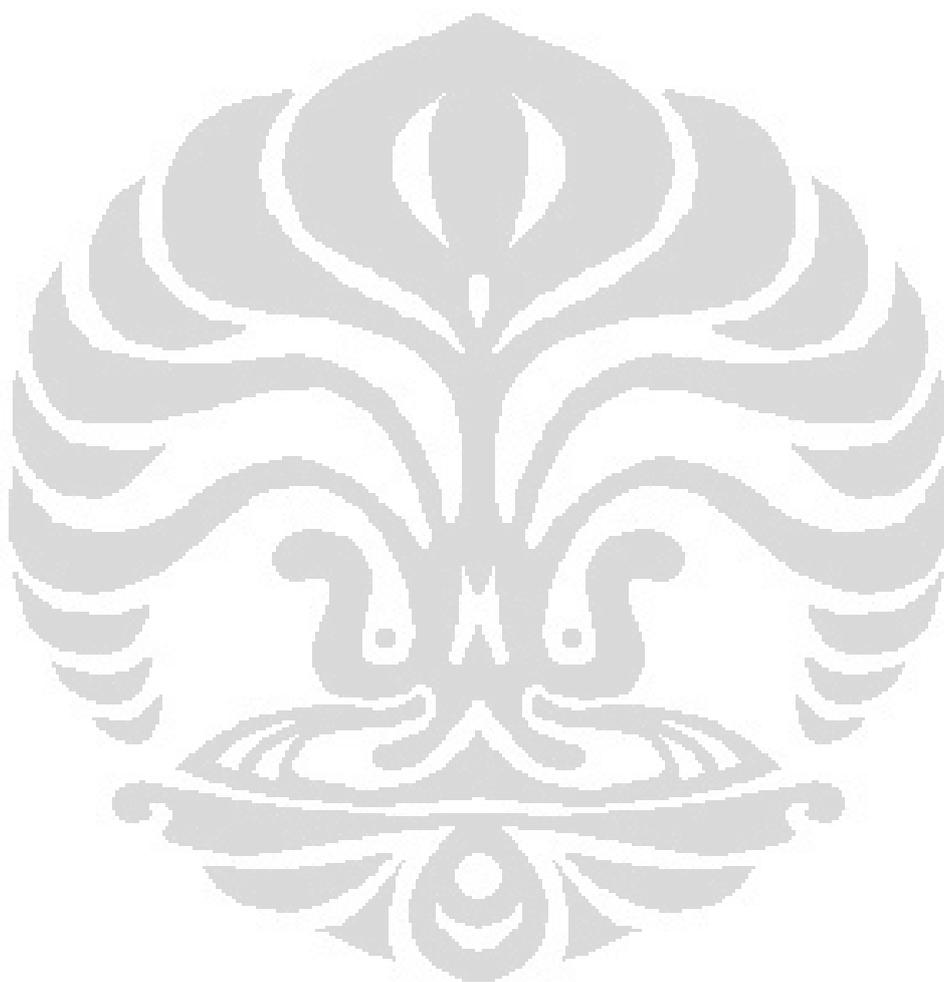
xv + 92 pages ; 18 pictures ; 10 tables; 8 appendix

Bibliography : 72 (1986 - 2010)

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	iv
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	v
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH</b> .....	viii
<b>ABSTRAK</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah dan Ruang Lingkup .....	4
1.3 Jenis Penelitian dan Metode yang digunakan .....	4
1.4 Tujuan Penelitian .....	5
1.5 Hipotesis .....	5
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>6</b>
2.1 Kacang Panjang ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) .....	6
2.2 Osteoporosis .....	8
2.3 Fitoestrogen .....	21
2.4 Metode ekstraksi .....	23
2.5 Ovariectomi .....	25
2.6 Histologi .....	25
2.7 Natrium Alendronat .....	29
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>30</b>
3.1 Tempat dan waktu penelitian .....	30
3.2 Bahan dan alat .....	30
3.3 Cara kerja .....	31
3.4 Metode .....	40
3.5 Analisis data .....	42
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>43</b>
4.1 Penyiapan serbuk simplisia .....	43
4.2 Penyiapan ekstrak etanol 70% serbuk buah kacang panjang .....	43
4.3 Perhitungan dosis berdasarkan rendemen .....	44
4.4 Hasil skrining fitokimia .....	45
4.5 Ovariectomi.....	45
4.6 Pengukuran berat uterus tikus .....	46
4.7 Pengukuran berat badan tikus .....	49
4.8 Uji efek antiosteoporosis .....	51

4.9 Perhitungan jumlah osteoklas.....	52
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>56</b>
5.1 Kesimpulan .....	56
5.2 Saran .....	56
<b>DAFTAR ACUAN .....</b>	<b>57</b>

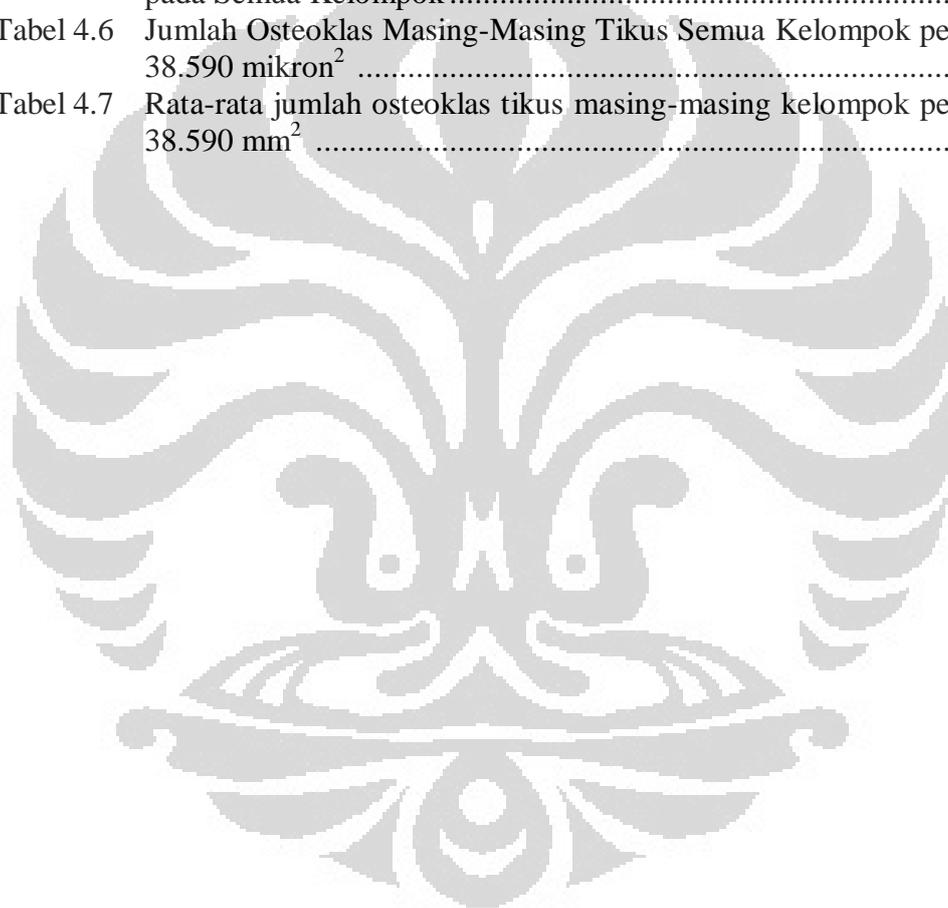


## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Proses <i>Remodelling</i> tulang .....	15
Gambar 2.2	Strategi pencegahan dan pengobatan osteoporosis .....	20
Gambar 2.3	Rumus bangun Estrogen, Isoflavon, Lignin, dan Coumestan	22
Gambar 3.1	Buah Kacang Panjang .....	64
Gambar 3.2	Prosedur Ovariectomi .....	65
Gambar 3.3	Proses Dekalsifikasi Tulang Trabekular Menggunakan Larutan Na <sub>2</sub> EDTA dengan Pengadukan Konstan .....	66
Gambar 3.4	Oven yang digunakan untuk infiltrasi .....	66
Gambar 3.5	Mikrotom yang Digunakan untuk Memotong Preparat Tulang dengan ketebalan 5-7 Mikron .....	67
Gambar 3.6	Alat Pemanas dalam Histologi .....	67
Gambar 4.1	Ekstrak kental buah kacang panjang .....	44
Gambar 4.2	Perbandingan besar uterus antara kelompok kontrol normal (kiri) dengan kontrol negatif (kanan) .....	48
Gambar 4.3	Tulang Trabekular Tikus yang Telah Dikorbakan .....	52
Gambar 4.4	Preparat Histologi Tulang Tikus Kontrol Negatif dengan Menggunakan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin, Pengamatan dengan Mikroskopi Optik, Perbesaran 100x .....	68
Gambar 4.5	Preparat Histologi Tulang Tikus Kontrol Positif dengan Menggunakan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin, Pengamatan dengan Mikroskopi Optik, Perbesaran 100x .....	68
Gambar 4.6	Preparat Histologi Tulang Tikus Dosis 1 dengan Menggunakan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin, Pengamatan dengan Mikroskopi Optik, Perbesaran 100x .....	69
Gambar 4.7	Preparat Histologi Tulang Tikus Dosis 2 dengan Menggunakan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin, Pengamatan dengan Mikroskopi Optik, Perbesaran 100x .....	69
Gambar 4.8	Preparat Histologi Tulang Tikus Dosis 3 dengan Menggunakan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin, Pengamatan dengan Mikroskopi Optik, Perbesaran 100x .....	70
Gambar 4.9	Preparat Histologi Tulang Tikus Kontrol Normal dengan Menggunakan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin, Pengamatan dengan Mikroskopi Optik, Perbesaran 100x .....	70

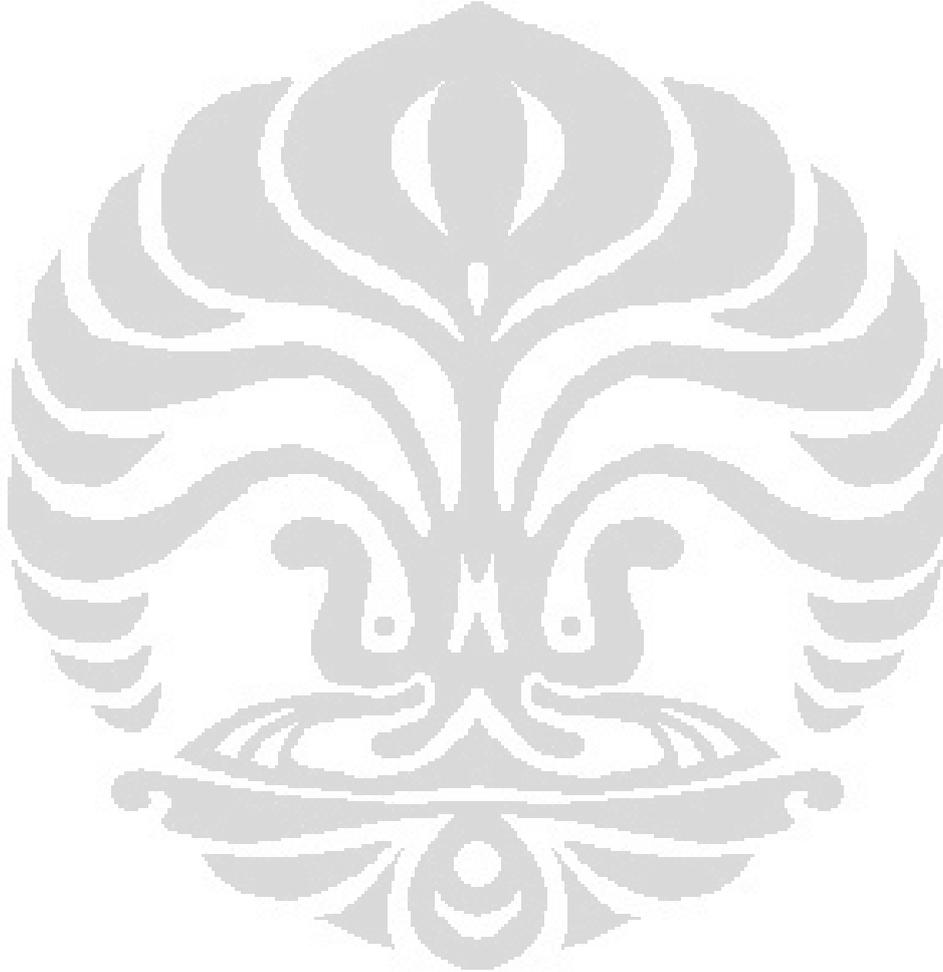
## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Faktor resiko osteoporosis .....	9
Tabel 2.2	Perbedaan antara osteoporosis tipe 1 dan tipe 2.....	11
Tabel 3.1	Kelompok Perlakuan Uji Antiosteoporosis .....	41
Tabel 4.1	Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol buah kacang panjang ...	45
Tabel 4.2	Berat uterus rata-rata pada semua kelompok setelah hari ke-28.	46
Tabel 4.3	Berat uterus semua kelompok setelah hari ke-28.....	72
Tabel 4.4	Perbandingan rata-rata berat badan awal dan akhir semua kelompok perlakuan selama 28 hari serta persentase kenaikannya .....	49
Tabel 4.5	Berat Badan Rata-Rata Masing-Masing Tikus Selama 28 Hari pada Semua Kelompok.....	72
Tabel 4.6	Jumlah Osteoklas Masing-Masing Tikus Semua Kelompok per 38.590 mikron <sup>2</sup> .....	73
Tabel 4.7	Rata-rata jumlah osteoklas tikus masing-masing kelompok per 38.590 mm <sup>2</sup> .....	53



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Penentuan dosis dan pembuatan bahan uji Penentuan dosis dan pembuatan bahan uji.....	75
Lampiran 2.	Uji statistik berat uterus semua kelompok .....	77
Lampiran 3.	Uji statistik berat badan semua kelompok.....	82
Lampiran 4.	Uji statistik perhitungan osteoklas semua kelompok .....	86
Lampiran 5.	Sertifikat Hewan Uji .....	90
Lampiran 6.	Sertifikat Natrium alendronat sebagai kontrol positif.....	91
Lampiran 7.	Surat determinasi tanaman kacang panjang .....	92
Lampiran 8.	Skema kerja pelaksanaan uji antiosteoporosis.....	93



# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Secara normal, puncak kepadatan tulang normal pada manusia dicapai pada usia tiga puluhan. Setelah itu akan terjadi penurunan kepadatan tulang yang biasanya disertai dengan atau tanpa kerusakan arsitektur tulang, sehingga kekuatan tulang akan menurun yang mengarah kepada kerapuhan tulang (*porous*) atau yang dikenal dengan osteoporosis. Secara umum keadaan ini dijumpai pada manusia usia lanjut, terutama pada wanita (Ott, 1990). Osteoporosis merupakan penyakit metabolisme tulang yang ditandai dengan pengurangan massa tulang, kemunduran mikroarsitektur tulang, dan peningkatan fragilitas tulang sehingga mengakibatkan resiko fraktur yang lebih besar. Insiden osteoporosis meningkat sejalan dengan meningkatnya populasi usia lanjut (Sennang, Mutmainnah, Pakasi, Hardjoeno, 2006).

Menurut data statistik *National Osteoporosis Foundation*, lebih dari 44 juta orang Amerika mengalami osteopenia dan osteoporosis (Nurrochmad, Leviana, Wulancarsari, Lukitaningsih, 2010). Sementara itu di Indonesia, berdasarkan penelitian Faridin pada tahun 2001, diperoleh angka prevalensi osteoporosis pada laki-laki sebesar 23,3% dan pada wanita 32%. Berdasarkan hasil Analisis Data Risiko Osteoporosis oleh Puslitbang Gizi Depkes bekerja sama dengan Fonterra Brands Indonesia tahun 2006 menyatakan, 2 dari 5 orang Indonesia memiliki risiko osteoporosis. Angka ini lebih tinggi dari prevalensi dunia, dimana 1 dari 3 orang berisiko osteoporosis. Hal ini juga didukung oleh *Indonesian White Paper* yang dikeluarkan Perhimpunan Osteoporosis Indonesia (Perosi) tahun 2007, osteoporosis pada wanita di atas 50 tahun mencapai 32,3% sementara pada pria di atas 50 tahun mencapai 28,8%. Selain itu data yang dikeluarkan International Osteoporosis Foundation (IOF), diprediksikan pada tahun 2050 sebanyak 50% kasus patah tulang panggul akan terjadi di Asia (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2012).

Osteoporosis banyak diderita oleh wanita pascamenopause karena pada wanita pascamenopause terjadi penurunan fungsi ovarium yang mengakibatkan hilangnya estrogen. Dengan hilangnya estrogen pada pascamenopause, wanita akan kehilangan mineral tulang dengan sangat cepat, yaitu 3% pertahun selama tahun pertama dan 1-2% pertahun setelahnya. Kejadian ini menyebabkan hilangnya massa tulang dan meningkatnya penyerapan tulang sehingga terjadi osteoporosis (Dawson-Hughes, 1996). Pada wanita pascamenopause, kadar estrogen yang mulai menurun mengakibatkan gangguan keseimbangan antara sel penghancur tulang (osteoklas) dengan sel pembentuk tulang (osteoblas) (Mizuno, Suzuki, Ino, Asada, Tomoda, 1995). Estrogen merupakan salah satu faktor yang sangat diperlukan dalam mengaktifkan osteoblas di jaringan endosteum di sekitar jaringan mieloid sumsum merah pada individu dewasa (Smith, 1993). Osteoblas ini berfungsi untuk sintesis unsur organik matriks tulang (osteoid), yaitu kolagen, proteoglikan, dan glikoprotein (Carola, Harley, Nobac, 1990; Telford & Bridgman, 1995; Leeson, Leeson T, Paparo, 1996).

Dalam penelitian *in vitro*, estrogen diduga dapat mempengaruhi proses penghancuran tulang dengan menghambat produksi sitokin oleh osteoblas. Sitokin yang rendah akan mengakibatkan turunnya aktivitas osteoklas. Selain itu, estrogen juga menghambat produksi interleukin-6 dan monosit, dimana keduanya diperlukan dalam proses pembentukan osteoklas (Kenemans, Barentsen, Weijer, 1995). Interleukin-6 merupakan mediator sitokin yang merangsang terjadinya differensiasi dari sel prekursor osteoklas menjadi sel osteoklas aktif (Kawiyana, 2009). Estrogen juga diketahui menunjang sekresi kalsitonin yang berfungsi sebagai inhibitor resorpsi tulang dan meningkatkan metabolit aktif vitamin D, yaitu 1,25 Dihidrokokolekalsiferol yang berfungsi meningkatkan absorpsi kalsium di usus, serta memiliki pengaruh anabolik terhadap tulang (Stevenson & Marsh, 1992).

Beberapa bukti telah menunjukkan pentingnya estrogen dalam metabolisme dan pembentukan kembali tulang. Bahkan, bukti klinis dari pemberian HRT (*Hormone Replacement Therapy*) atau yang lebih sering dikenal dengan Terapi Sulih Hormon (TSH) dengan dosis yang telah disesuaikan, secara efektif dapat mencegah hilangnya massa tulang pada wanita pascamenopause dan

**Universitas Indonesia**

mengurangi insiden osteoporosis. Namun, penggunaan Terapi Sulih Hormon (TSH) dalam jangka panjang akan menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan. Penggunaan steroid yang sangat kuat ini dapat meningkatkan resiko kanker rahim serta kanker payudara (Nurrochmad, Leviana, Wulancarsari, Lukitaningsih, 2010). Selain resiko-resiko tersebut, Terapi Sulih Hormon (TSH) juga merupakan terapi yang mahal harganya (Pertamawan & Hestiantoro, 2002).

Adanya efek samping dari Terapi Sulih Hormon (TSH) menyebabkan wanita mencari alternatif lain ke pengobatan tradisional. Banyak penelitian penyakit kanker dan penyakit jantung pada manusia, hewan, dan sel yang menyoroti efek terapeutik dari fitoestrogen. Oleh karena itu, fitoestrogen mempunyai peluang tinggi sebagai “alternatif alami” Terapi Sulih Hormon (TSH) untuk wanita pascamenopause (Anggraini, 2008).

Fitoestrogen merupakan salah satu alternatif alami yang diketahui memiliki struktur yang paling mirip dengan estrogen dan memiliki aktivitas estrogenik dan antiestrogenik. Penelitian pada hewan sebelumnya menyatakan bahwa fitoestrogen memiliki efek protektif dalam mencegah kehilangan massa tulang akibat defisiensi estrogen (Nurrochmad, Leviana, Wulancarsari, Lukitaningsih, 2010). Pada tanaman dikenal beberapa kelompok fitoestrogen, yaitu isoflavon, lignan, kumestan, triterpen, glikosida, dan senyawa lain yang berefek estrogenik, seperti flavon, khalkon, diterpenoid, triterpenoid, kumarin, dan asiklik. Ada tiga klasifikasi utama fitoestrogen, yaitu isoflavon, lignan dan kumestan. Namun yang memberikan efek skeletal hanya isoflavon dan kumestan saja (Anggraini, 2008).

Pada umumnya buah kacang-kacangan mengandung senyawa isoflavon yang bersifat estrogenik (Benassayag, Perrot-Aplanat, Ferre, 2002). Salah satunya adalah kacang panjang (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Tanaman kacang panjang mengandung fitoestrogen yang mempunyai 2 gugus hidroksil (-OH) yang berjarak 11,0-11,5 Å, sama dengan estrogen. Tanaman ini juga mengandung flavonoid diantaranya terdapat enam antosianin dan empat flavonol (Wong & Chang, 2004). Kandungan flavonoid di dalam kacang panjang yang cukup banyak jenisnya memberi potensi besar pada kacang panjang untuk berefek estrogenik. Namun

demikian, masih memerlukan bukti ilmiah melalui penelitian (Meiyanto, Handayani, Jenie, 2008).

Berdasarkan kenyataan di atas maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menguji efek fitoestrogenik dari ekstrak etanol 70% buah kacang panjang sebagai agen antiosteoporosis pada wanita pascamenopause. Penelitian dilakukan dengan menggunakan sejumlah hewan uji, yaitu tikus putih betina yang diovariectomi untuk mendapatkan kondisi pascamenopause dan pemberian ekstrak dilakukan dengan dosis yang berbeda-beda untuk mendapatkan dosis optimal. Kisaran dosis yang digunakan pada penelitian ini didasarkan pada penelitian Meiyanto, Handayani, dan Jenie pada tahun 2008 yang menggunakan ekstrak etanol 70% buah kacang panjang sebagai fitoestrogen yang dapat meningkatkan proliferasi sel payudara.

## **1.2 Perumusan Masalah dan Ruang Lingkup**

### **1.2.1 Perumusan Masalah**

Masalah yang diangkat dalam penelitian ini adalah apakah ekstrak etanol 70% buah kacang panjang (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) memiliki efek antiosteoporosis berdasarkan penurunan jumlah osteoklas pada *growth plate* tulang kaki tikus putih yang diovariectomi dan berapakah dosis optimum ekstrak etanol 70% buah kacang panjang (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) sebagai agen antiosteoporosis.

### **1.2.2 Ruang Lingkup**

Farmakologi

## **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek antiosteoporosis dari ekstrak etanol 70% buah kacang panjang (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) berdasarkan penurunan jumlah osteoklas pada *growth plate* tulang trabekular pada tikus putih betina yang telah diovariectomi dan mengetahui dosis optimum ekstrak etanol buah kacang panjang (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) yang efektif untuk menghambat osteoporosis.

**Universitas Indonesia**

## 1.4 Jenis Penelitian dan Metode yang digunakan

### 1.4.1 Jenis Penelitian

Eksperimental

### 1.4.2 Metode

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah di awal penelitian dilakukan pengkondisian osteoporosis pada tikus putih betina dengan cara ovariectomi agar produksi estrogennya menurun yang selanjutnya akan menimbulkan osteoporosis. Kemudian tikus tersebut diberikan ekstrak etanol 70% buah kacang panjang (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Efek antiosteoporosis dari ekstrak etanol 70% buah kacang panjang (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. ) dilihat dari penurunan jumlah osteoklas pada lengkung *growth plate* tulang trabekular tikus putih betina yang telah diovariectomi tersebut.

## 1.5 Hipotesis

Ekstrak etanol 70 % buah kacang panjang (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) memiliki efek antiosteoporosis berdasarkan penurunan jumlah osteoklas pada *growth plate* tulang trabekular kaki tikus putih betina yang diovariectomi.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Kacang Panjang (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

##### 2.1.1 Klasifikasi Tanaman (United States Department of Agriculture, 2000)

Dunia	:	Plantae
Divisi	:	Magnoliophyta
Kelas	:	Magnoliopsida
Bangsa	:	Fabales
Suku	:	Fabaceae
Marga	:	Vigna
Jenis	:	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.
Subjenis	:	<i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>unguiculata</i> (L.) Walp.
Sinonim	:	<i>Vigna cylindrica</i> (L.) Skeel <i>Vigna sinensis</i> (L.) Savi ex Hassk

##### 2.1.2 Nama Daerah (Hutapea, 1994)

Kacang panjang (Jawa)

##### 2.1.3 Deskripsi Tanaman (Hutapea, 1994)

Habitus	:	Semak, menjalar, semusim, tinggi $\pm$ 2,5 m.
Batang	:	Tegak, silindris, lunak, permukaan licin, hijau.
Daun	:	Majemuk, lonjong, berseling, panjang 6-8 cm, lebar 3-4,5 cm, tepi rata, pangkal membulat, ujung lancip, pertulangan menyirip, tangkai silindris, panjang $\pm$ 4 cm, hijau.
Bunga	:	Majemuk, di ketiak daun, tangkai silindris, panjang $\pm$ 12 cm, hijau keputih-putihan, mahkota bentuk kupu-kupu, putih keunguan, benang sari bertangkai, panjang $\pm$ 2 cm, putih, kepala sari kuning, putik bertangkai, kuning, panjang $\pm$ 1 cm, ungu
Buah	:	Polong, panjang 15-25 cm, hijau.

Biji	:	Lonjong, pipih, coklat muda
Akar	:	Tunggang, coklat muda

#### 2.1.4 Kandungan Kimia

Tanaman kacang panjang mengandung fitoestrogen, yaitu isoflavon yang mempunyai dua gugus hidroksil (-OH) yang berjarak 11,0-11,5 Å, sama dengan estrogen (Fitriasari et al., 2007). Oleh karena itu, fitoestrogen ini dapat berikatan dengan reseptor estrogen dan memberikan efek estrogenik. Tanaman kacang panjang juga mengandung flavonoid, diantaranya terdapat enam antosianin dan empat flavonol atau flavonol glikosida. Antosianin yang terdapat dalam kacang panjang adalah cyanidin 3-O-galaktosida, cyanidin 3-O-glukosida, delphinidin 3-O-glucoside, malvidin 3-O-glucoside, peonidin 3-O-glucoside, dan petunidin 3-O-glucoside. Sedangkan flavonol yang terkandung dalam kacang panjang adalah kaempferol 3-O-glukosida, quersetin, quersetin 3-O-glucoside, dan quersetin 3-O-6'-acetylglucoside (Wong & Chang, 2004). Kacang panjang juga mengandung protein, karbohidrat, lemak, kalsium, besi, fosfor, potasium, sodium, vitamin B1, vitamin B2, vitamin C, dan niasin (Handri & Rafira, 2003). Daun dan akar *Vigna unguiculata* (L.) Walp. mengandung saponin dan polifenol (Hutapea, 1994).

#### 2.1.5 Kegunaan Tanaman

Tanaman kacang panjang adalah salah satu tanaman yang dipercaya masyarakat dapat memperbesar payudara. Tanaman ini mempunyai efek proliferasif terhadap sel payudara karena mengandung fitoestrogen, yaitu estrogen alamiah yang terdapat dalam tanaman. Senyawa ini dapat memacu proliferasi jika berikatan dengan reseptor estrogen (Fitriasari et al., 2007).

Analisis kandungan kimia ekstrak etanolik buah kacang panjang menunjukkan adanya kandungan flavonoid dan terpenoid yang signifikan. Kandungan senyawa tersebut sangat mungkin memberikan kontribusi pada aktivitas proliferasif terhadap sel MCF-7 (Meiyanto, Handayani, Jenie, 2008). Daun kacang panjang (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) berkhasiat sebagai peluruh air seni (Hutapea, 1994).

## 2.2 Osteoporosis

### 2.2.1 Definisi Osteoporosis

Hilangnya sejumlah massa tulang akibat bertambahnya umur merupakan keadaan fisiologik yang disebut sebagai osteopenia. Sedangkan osteoporosis merupakan osteopenia yang telah melewati ambang batas untuk terjadi fraktur (*Fracture threshold*). Keadaan ini memiliki karakteristik berupa menurunnya massa tulang dengan jumlah jaringan tulang yang mengisi tulang berkurang, tetapi struktur tulang sendiri masih normal (Isbagio, 1993).

Osteoporosis merupakan penyakit metabolisme tulang yang ditandai dengan pengurangan massa tulang, kemunduran mikroarsitektur tulang, dan peningkatan fragilitas tulang, sehingga resiko fraktur menjadi lebih besar. Pengurangan massa tulang tersebut dapat terjadi sebagai akibat ketidakseimbangan antara resorpsi dan pembentukan tulang (Palmer, 1993; Shin et al., 2007). Insiden osteoporosis meningkat sejalan dengan meningkatnya populasi usia lanjut (Sennang, Mutmainnah, Pakasi, Hardjoeno, 2006). Fraktur osteoporotik dapat mempengaruhi tulang rangka mana saja kecuali kepala. Fraktur sering terjadi di bagian distal lengan bawah (*Colles' fracture*), vertebra thorakalis, vertebra lumbalis, dan bagian proksimal femur (Kleerekoper & Avioli, 1993).

### 2.2.2 Epidemiologi

Penelitian osteoporosis pada ras Kaukasia telah sering dilaporkan dan memang pada ras inilah komplikasi fraktur yang kadang-kadang berakibat fatal karena imobilisasi jangka lama paling sering terjadi. Namun ternyata pada penelitian selanjutnya, pada ras Asia seperti Jepang dan Cina sering pula terjadi osteoporosis (Isbagio, 1993).

Menurut data statistik *National Osteoporosis Foundation*, lebih dari 44 juta orang Amerika mengalami osteopenia dan osteoporosis. Pada wanita yang berusia  $\geq 50$  tahun, terdapat 30% penderita osteoporosis, 37-54% penderita osteopenia, dan 54% penderita yang beresiko terhadap fraktur osteoporotik (Hammett-Stabler, 2004; Sennang, Mutmainnah, Pakasi, Hardjoeno, 2006).

Berdasarkan hasil Analisis Data Risiko Osteoporosis oleh Puslitbang Gizi Depkes bekerja sama dengan Fonterra Brands Indonesia tahun 2006 menyatakan,

**Universitas Indonesia**

2 dari 5 orang Indonesia memiliki risiko osteoporosis. Angka ini lebih tinggi dari prevalensi dunia, dimana 1 dari 3 orang berisiko osteoporosis. Hal ini juga didukung oleh *Indonesian White Paper* yang dikeluarkan Perhimpunan Osteoporosis Indonesia (Perosi) tahun 2007, osteoporosis pada wanita di atas 50 tahun mencapai 32,3% sementara pada pria di atas 50 tahun mencapai 28,8%. Selain itu data yang dikeluarkan International Osteoporosis Foundation (IOF), diprediksikan pada tahun 2050 sebanyak 50% kasus patah tulang panggul akan terjadi di Asia (Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2012).

Berdasarkan penelitian Sennang, Mutmainnah, Pakasi, dan Hardjoeno pada tahun 2006 di Unit Pelayanan Laboratorium Rumah Sakit Dr. Wahidin Sudirohusodo Makasar, dari 61 orang subyek penelitian, yaitu 21 orang laki-laki dan 40 orang perempuan, ditemukan kelompok normal sebanyak 11 orang (18,0%) yang terdiri dari 7 orang laki-laki dan 4 orang perempuan, kelompok osteopenia sebanyak 32 orang (52,5%) yang terdiri dari 9 orang laki-laki dan 23 orang perempuan, dan kelompok osteoporosis sebanyak 18 orang (29,5%) yang terdiri dari 5 laki-laki dan 13 perempuan. Dari penelitian ini ditemukan bahwa prevalensi osteopenia pada laki-laki adalah sebesar 42,9% (9 dari 21 laki-laki) sedangkan pada perempuan adalah sebesar 57,5% (23 dari 40 perempuan). Untuk osteoporosis, prevalensi pada laki-laki adalah sebesar 23,8% (5 dari 21 laki-laki), sedangkan untuk perempuan adalah 32,5% (13 dari 40 perempuan).

### 2.2.3 Faktor Resiko

**Tabel 2.1** Faktor resiko osteoporosis ( Ilmu Penyakit Dalam FKUI Jilid II, 2006)

Umur	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiap peningkatan 1 dekade, resiko meningkat 1,4 -1,8.</li> </ul>
Genetik	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Etnis ( kaukasia dan oriental &gt; kulit hitam dan polinesia)</li> <li>• Seks ( perempuan &gt; laki-laki)</li> </ul>
Lingkungan	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Defisiensi kalsium</li> <li>• Aktifitas fisik kurang</li> <li>• Obat- obatan ( kortikosteroid, anti konvulsan, heparin, siklosporin)</li> <li>• Merokok ,alkohol</li> <li>• Resiko terjatuh yang meningkat ( gangguan keseimbangan, licin, gangguan penglihatan)</li> </ul>
Hormonal dan penyakit kronik	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Defisiensi estrogen dan androgen</li> <li>• Tirotoksikosi, hiperperatiroidisme primer, hiperkortisolisme</li> <li>• Penyakit kronis (sirosis hepatis, gagal ginjal, gastrektomi)</li> </ul>
Sifat fisik tulang	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Densitas atau massa</li> <li>• Ukuran dan geometri</li> <li>• Mikroarsitektur</li> <li>• Komposisi</li> </ul>

### 2.2.4 Klasifikasi

Osteoporosis dapat dibagi dalam dua golongan besar menurut penyebabnya, yaitu osteoporosis primer dan osteoporosis sekunder (Isbagio, 1993).

#### 2.2.4.1 Osteoporosis Primer

Osteoporosis primer adalah osteoporosis yang penyebabnya tidak diketahui. Osteoporosis primer dibagi lagi menjadi dua, yaitu :

##### a. Tipe 1 (*Postmenopausal Osteoporosis*)

Penurunan hormon estrogen secara alamiah terjadi pada usia masa klimakterium (40 tahun) dan menimbulkan gangguan haid yang semula teratur menjadi tidak teratur. Memasuki masa pascamenopause, gejala yang paling menonjol adalah berdebar, pelupa, nyeri tulang belakang, rasa lemah, lesu, dan osteoporosis. Khususnya pada wanita, kejadian osteoporosis diperberat dengan menurunnya dan atau hilangnya hormon estrogen pada usia lanjut (Anggraini, 2008).

Pada tipe ini, akan terjadi osteoporosis spinal (trabekuler) yang berakibat terjadinya fraktur vertebra. Sedangkan dengan meningkatnya umur, selain ditemukan fraktur spinal maka akan sering pula ditemukan osteoporosis pada tulang panjang (kortikal) yang akan berakibat pada terjadinya fraktur femur (*Hip fracture*).

##### b. Tipe 2 (*Senile Osteoporosis*)

Tipe ini sering ditemukan pada usia lebih dari 70 pada pria. Osteoporosis tipe ini terjadi karena proses penuaan.

Perbedaan antara osteoporosis tipe 1 dan tipe 2 dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

**Tabel 2.2** Perbedaan antara osteoporosis tipe 1 dan tipe 2 (Isbagio, 1993).

PARAMETER	TIPE OSTEOPOROSIS	
	TIPE 1	TIPE 2
Umur (tahun)	55–75	70–85
<i>Sex ratio</i> (W/P)	6/1	2/1
Tipe kehilangan tulang	Trabekular > Kortikal	Trabekular = Kortikal
Jenis patah tulang	Spinal	Paha & tulang panjang
Penyebab utama	Kekurangan estrogen	Proses menua
Peranan diet kalsium	Rendah	Tinggi
Absorpsi kalsium	Menurun	Menurun
Fungsi paratiroid	Menurun	Meningkat

#### 2.2.4.2 Osteoporosis Sekunder

Osteoporosis sekunder terjadi bila osteoporosis tersebut diakibatkan oleh berbagai kondisi klinik.

#### 2.2.5 Patofisiologi Osteoporosis

Tulang adalah suatu jaringan dinamis yang tersusun dari tiga jenis sel, yaitu osteoblas, osteosit, dan osteoklas. Osteoblas membangun tulang dengan membentuk kolagen tipe 1 dan proteoglikan sebagai matriks tulang atau jaringan osteoid melalui suatu proses yang disebut osifikasi. Pembentukan osteoblas dimulai dari prekursor sel stroma menjadi preosteoblas yang kemudian berkembang menjadi osteoblas yang dapat diaktifkan sehingga akhirnya dapat

**Universitas Indonesia**

membentuk osteosit (Erickson, Kasem, Aarhus, 1992). Dalam keadaan aktif sel ini berbentuk kuboid, sedangkan dalam keadaan tidak aktif, osteoblas berbentuk pipih (Einhorn, 1996). Ketika sedang aktif menghasilkan jaringan osteoid, osteoblas akan mensekresikan sejumlah besar fosfatase alkali, yang memegang peranan penting dalam mengendapkan kalsium dan fosfat ke dalam matriks tulang. Sebagian dari fosfatase alkali akan memasuki aliran darah, dengan demikian kadar fosfatase alkali di dalam darah dapat menjadi indikator yang baik dalam tingkat pembentukan tulang. Sel tulang yang lain adalah osteosit. Osteosit adalah sel-sel tulang dewasa yang bertidak sebagai suatu lintasan untuk pertukaran kimiawi melalui tulang yang padat. Osteosit merupakan sel peralihan dari sel-sel osteoblas yang berhenti membentuk matriks tulang dan terperangkap di dalam tulang. Sel ini memiliki peran dalam memelihara matriks tulang, sehingga tersimpan di dalam tulang (Erickson, Kasem, Aarhus, 1992; Puzas, 1993). Sel tulang yang ketiga adalah osteoklas. Osteoklas adalah sel-sel besar berinti banyak yang memungkinkan mineral dan matriks tulang dapat diabsorpsi. Tidak seperti osteoblas dan osteosit, osteoklas mengikis tulang. Sel-sel ini menghasilkan enzim-enzim proteolitik yang memecahkan matriks dan beberapa asam yang melarutkan mineral tulang, sehingga kalsium dan fosfat terlepas ke dalam aliran darah (Sylvia & Lorraine, 1995). Osteoklas ini bersifat mirip dengan sel fagositik lainnya dan berperan aktif dalam proses resorpsi tulang. Osteoklas merupakan sel fusi dari beberapa monosit sehingga bersifat multinukleus (10-20 nuklei) dengan ukuran besar dan berada di tulang kortikal atau tulang trabekular (Marcus, Feldman, Kelsey, 1996). Osteoklas mempunyai *Ruffled Border*, yaitu daerah spesifik dari membran sel yang berbentuk jari-jari atau gelambir-gelambir, yang biasanya berhadapan dengan permukaan tulang. Sekresi enzim-enzim, asam laktat, dan asam sitrat dilepaskan keluar sel melalui *Ruffled Border*. Di area *Ruffled Border* ini terjadi proses resorpsi tulang sehingga mengakibatkan terbentuknya cekungan sebagai akibat hilangnya matriks di daerah itu, dan cekungan yang terbentuk ini dinamakan lakuna *Howship* (Telford, Bridgman, 1995; Leeson R. C., Leeson T. S., Paparo, 1996).

Pada keadaan normal, tulang mengalami pembentukan dan absorpsi pada suatu tingkat yang konstan, kecuali pada masa pertumbuhan kanak-kanak dimana

lebih banyak terjadi pembentukkan daripada absorpsi tulang. Proses-proses ini penting untuk fungsi normal tulang. Keadaan ini membuat tulang dapat berespons terhadap tekanan yang meningkat dan untuk mencegah terjadinya patah tulang. Bentuk tulang dapat disesuaikan dalam menanggung kekuatan mekanis yang semakin meningkat. Perubahan tersebut juga membantu mempertahankan kekuatan tulang pada proses penuaan. Matriks organik yang sudah tua berdegenerasi, sehingga membuat tulang relatif menjadi lebih lemah dan rapuh. Pembentukkan tulang yang baru memerlukan matriks organik yang baru, sehingga memberi tambahan kekuatan pada tulang (Sylvia & Lorraine, 1995).

Aktivitas osteoblas akan dipicu oleh *Bone Mineral Protein* (BMP), *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- $\beta$ ), *Insulin Growth Factor* (IGF), estrogen, triiodotironin (T<sub>3</sub>), tetraiodotironin (T<sub>4</sub>), kalsitriol pada kadar tertentu, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), dan PTH. Sebaliknya, aktivitas osteoblas dihambat oleh kortikosteroid. Aktivitas osteoklas dipicu oleh limfotoksin (LT), *Transforming Growth Factor Alfa* (TGF- $\alpha$ ), *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL-6, IL-1, IL-11), PTH, *PTH related protein* (PTHrp) tetapi dihambat oleh kalsitonin, estrogen, interferon gamma (IFN $\gamma$ ), dan PGE<sub>2</sub> (Rachman, 2004).

Vitamin D mempengaruhi deposisi dan absorpsi tulang. Vitamin D dalam jumlah besar dapat menyebabkan absorpsi tulang seperti yang terlihat pada kadar hormon paratiroid yang tinggi. Bila tidak ada vitamin D, hormon paratiroid tidak akan menyebabkan absorpsi tulang (Sylvia & Lorraine, 1995). Fungsi utama dari vitamin D adalah mempertahankan konsentrasi kalsium dan fosfor serum dalam kisaran normal dengan meningkatkan efisiensi usus halus untuk menyerap mineral dari makanan (Muhilal & Sulaeman, 2004).

Hormon paratiroid (PTH) adalah hormon utama yang bertanggung jawab memelihara konsentrasi kalsium setiap saat. Pengaruh biologis yang sangat penting dari PTH adalah meningkatkan kalsium plasma yang bersamaan dengan penurunan fosfat plasma, meningkatkan ekskresi fosfat urin (fosfaturia), meningkatkan resorpsi kalsium urin, meningkatkan kecepatan *remodeling* tulang, meningkatkan osteolisis osteosit, membantu pembentukan 1,25-dihidroksi vitamin D<sub>3</sub> dengan memengaruhi sistem 1-hidrolase, dan meningkatkan absorpsi kalsium

dan fosfat dari usus halus oleh pengaruh langsung pada pembentukan 1,25-dihidroksikolekalsiferol (Banks, 1993).

Estrogen menstimulasi osteoblas. Penurunan estrogen setelah menopause mengurangi aktivitas osteoblastik sehingga menyebabkan penurunan matriks organik tulang. Umumnya, kalsifikasi tulang tidak terpengaruh pada osteoporosis yang terjadi pada wanita sebelum usia 65 tahun, namun berkurangnya matriks organiklah yang merupakan penyebab dari osteoporosis (Sylvia & Lorraine, 1995).

Pada percobaan dengan menggunakan hewan, defisiensi estrogen menyebabkan terjadinya osteoklastogenesis dan terjadi kehilangan massa tulang. Akan tetapi dengan pemberian estrogen terjadi pembentukan tulang kembali dan didapatkan penurunan produksi dari IL-1, IL-6 dan TNF- $\alpha$ , begitu juga selanjutnya akan terjadi penurunan produksi M-CSF dan RANK-Ligan (RANK-L). Di sisi lain estrogen akan merangsang ekspresi dari osteoprotegerin (OPG) dan TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) pada sel osteoblas dan sel stroma, yang lebih lanjut akan menghambat penyerapan tulang dan meningkatkan apoptosis dari sel osteoklas (Bell & Norman, 2003).

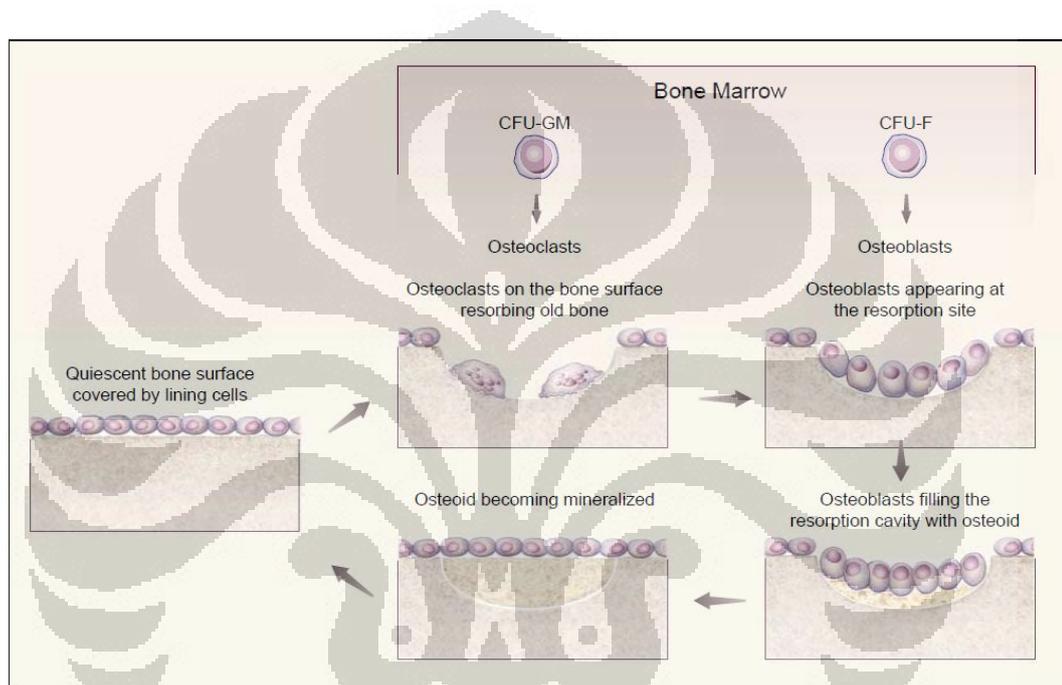
Dalam diferensiasi dan aktivasi, estrogen menekan ekspresi RANK-L, M-CSF dari sel stroma osteoblas, dan mencegah terjadinya ikatan kompleks antara RANK-L dan RANK dengan memproduksi reseptor OPG, yang berkompetisi dengan RANK (Bell & Norman, 2003). Begitu juga secara tidak langsung estrogen menghambat produksi sitokin-sitokin yang merangsang diferensiasi osteoklas seperti : IL-1, IL-6, IL-11, TNF- $\alpha$  dan IL-7. Terhadap apoptosis sel osteoklas, secara tidak langsung estrogen merangsang osteoblas untuk memproduksi TGF- $\beta$ , yang selanjutnya TGF- $\beta$  ini menginduksi sel osteoklas untuk lebih cepat mengalami apoptosis (Oursler, 2003).

Sedangkan efek langsung dari estrogen terhadap osteoklas adalah melalui reseptor estrogen pada sel osteoklas, yaitu menekan aktivasi c-Jun, sehingga mencegah terjadinya diferensiasi sel prekursor osteoklas dan menekan aktivasi sel osteoklas dewasa (Oursler, 2003).

Proses ulang model semula (*remodeling*) merupakan proses mengganti tulang yang sudah tua atau rusak, diawali dengan resorpsi atau penyerapan tulang

**Universitas Indonesia**

oleh osteoklas dan diikuti oleh formasi atau pembentukkan tulang atau osteoblas. Keseimbangan proses ini mulai terganggu setelah mencapai umur 40 tahun, yaitu kegiatan proses penyerapan lebih tinggi daripada pembentukkan, sehingga massa tulang akan mulai menurun. Proses ini akan berlangsung terus-menerus, sehingga lama-kelamaan tulang mengalami gangguan metabolisme mineral dan arsitektur tulang yang pada akhirnya akan timbul osteopenia dan kemudian osteoporosis (Sambo, 2002).



[Sumber : Manogalas & Jilka, 1995]

**Gambar 2.1** Proses *Remodelling* tulang

### 2.2.6 Diagnosis

Diagnosis osteoporosis dapat dilakukan dengan cara anamnesis, pemeriksaan fisik, dan pemeriksaan penunjang (Ferri, 2004). Pada saat ini bakuan emas untuk diagnosis osteoporosis diperoleh dengan menggunakan teknik *Dual Energy X-ray Absorpsiometry* (DXA) yang dapat mengukur kepadatan tulang sentral. Kelangkaan dan mahalnya DXA untuk sementara ini dapat digantikan dengan alat *Ultrasound Densitometry* atau *Quantitative Ultrasound* (QUS) yang harganya lebih murah, mudah dipindahkan, dan tidak terdapat efek radiasi. Selain

**Universitas Indonesia**

itu, cara kerjanya cepat dan mudah namun tidak dapat mengukur secara langsung BMD (Adam, 2002; Itani & Tsang, 2003).

Tes laboratorik dapat berperan sebagai tes saring, pemantauan pengobatan, dan penentuan penyebab osteoporosis. Salah satu penanda proses pembentukan tulang adalah adanya osteokalsin atau *Bone-GLA-Protein* (BGP), yang merupakan protein non kolagen dalam matriks tulang, yang disintesis oleh osteoblas, dan disekresi ke dalam cairan jaringan penyokong utama tulang. Fragmen osteokalsin juga akan dilepas ke dalam peredaran darah dan dapat diukur kadarnya. Dalam aliran darah akan terdapat bentuk osteokalsin utuh dan *N-MID-Fragment* (Ott 1999; Ferri, 2004; Hammett-Stabler, 2004).

#### 2.2.7 Pencegahan (Isbagio, 1993)

Ada beberapa cara untuk mencegah terjadinya osteoporosis, yaitu:

##### 2.2.7.1 Aktivitas Fisik

Aktivitas fisik yang teratur sejak usia muda merupakan langkah terbaik untuk menjaga massa tulang. Akan tetapi, aktivitas fisik yang dimulai pada saat menopause sekalipun, akan tetap memiliki efek yang baik terhadap massa tulang. Aktivitas fisik ringan pada pasien geriatrik secara teratur selama 3 tahun dapat pula meningkatkan massa tulang. Sedangkan latihan yang lebih berat selama 1 tahun tidak memberikan hasil yang bermakna. Mekanisme efek aktivitas fisik terhadap penambahan massa tulang belum diketahui. Orang yang mempunyai gaya hidup *sedentary* dianjurkan untuk melakukan latihan fisik teratur seperti berjalan kaki atau bersepeda. Latihan fisik yang lebih berat seperti lari cepat atau senam tidak dianjurkan untuk mencegah terjadinya cedera tendon dan otot.

##### 2.2.7.2 Diet

Banyak alasan yang dikemukakan mengapa wanita menopause sering disertai dengan keseimbangan kalsium yang negatif. Di antaranya ialah karena menurunnya absorpsi kalsium atau kegagalan hidroksilasi 1,25 dihidrokalsiferol (metabolit vitamin D), atau keduanya. Hal lain ialah asupan kalsium yang tidak adekuat sering terjadi akibat wanita tersebut takut gemuk atau diet yang bertujuan

untuk menurunkan kadar kolesterol untuk mencegah penyakit kardiovaskular sehingga tidak mau minum susu atau produk susu. Bila ada kesukaran untuk memberikan produk susu maka dianjurkan dalam bentuk tablet kalsium.

Pada penelitian yang dilakukan pada tikus, osteoporosis dapat bertambah parah tidak hanya disebabkan oleh rendahnya konsumsi dan absorpsi kalsium tetapi juga disebabkan oleh terlalu tingginya rasio fosfat dan kalsium dalam diet (Sabri, 2000). Tingginya konsumsi fosfat mengakibatkan terjadinya hiperparatiroidisme sekunder sehingga mengganggu homeostasis kalsium terutama pada manula (Anderson, 1996). Calvo dan Park pada tahun 1996 juga menyebutkan bahwa osteoporosis pada hewan yang disebabkan oleh faktor defisiensi kalsium menjadi faktor penyebab utama, sedangkan faktor lainnya adalah malnutrisi dan defisiensi fosfor.

Masalah diet lain ialah pada mereka yang makan protein berlebihan karena ternyata dapat pula mengakibatkan terjadinya osteoporosis. Salah satu hipotesis menduga bahwa ginjal dari pasien usia lanjut tidak mampu mengatasi beban kenaikan asam yang terjadi pada diet tinggi protein. Sebaliknya, osteoporosis terjadi pula pada mereka yang kurang asupan protein, sehingga yang dianjurkan ialah makan protein dalam jumlah yang seimbang. Pada orang yang berat badannya agak berlebih dan mempunyai resiko osteoporosis maka diet ketat tidak dianjurkan karena jaringan lemak mengandung androgen yang dapat disintesis oleh kelenjar adrenal menjadi estrogen.

#### 2.2.7.3 Gaya Hidup dan Kebiasaan

Perokok dan orang yang banyak minum alkohol mempunyai resiko menderita osteoporosis, namun mekanisme terjadinya hal ini belum jelas.

#### 2.2.7.4 Obat-obatan

##### a. Terapi pengganti estrogen (*Estrogen replacement therapy*)

Karena defisiensi estrogen mempercepat hilangnya massa tulang pada wanita menopause, maka terapi pengganti estrogen dapat mencegah terjadinya osteoporosis dan komplikasinya, terutama fraktur spinal. Dalam berbagai penelitian ternyata didapatkan bahwa kadar kalsitonin plasma meningkat pada

**Universitas Indonesia**

wanita yang mendapat terapi estrogen. Jadi mungkin mekanisme kerjanya ialah estrogen menghambat resorpsi tulang melalui stimulasi kalsitonin.

#### b. Kalsium dan Vitamin D

Secara umum, kalsium dapat diberikan pada semua orang yang mempunyai resiko terkena osteoporosis dan pada keadaan defisiensi kalsium. Pada orang yang dietnya kurang mengandung kalsium, perlu disuplementasi dengan tablet kalsium. Dosis disesuaikan dengan asupan makanan sehingga tercapai kebutuhan. Dosis yang dianjurkan sebesar 1500 mg/hari. Pada wanita menopause yang tidak dapat diberi terapi pengganti estrogen atau menolak diberi estrogen, maka dapat diberikan suplemen kalsium.

#### 2.2.7.5 Pengobatan Osteoporosis (Isbagio, 1993)

Pengobatan osteoporosis bertujuan untuk meningkatkan massa tulang di atas ambang patah tulang (*fracture threshod*). Hal ini dapat dicapai dengan salah satu dari tiga cara berikut ini:

##### a. Merangsang pembentukkan tulang

Bila osteoporosis yang terjadi disebabkan terutama oleh defisiensi pembentukkan tulang, maka penanggulangan dengan cara mengurangi resorpsi tulang saja tanpa memperhatikan keadaan defisiensi merupakan hal yang kurang logis. Adalah mustahil osteoporosis dapat diatasi hanya dengan melakukan pengurangan resorpsi tulang sedangkan pembentukkan tulang sendiri tetap rendah.

Beberapa substansi dapat merangsang langsung osteoblas, antara lain ialah *growth hormone* dan hormon paratiroid, tetapi semuanya masih dalam tahap penelitian. Natrium fluorid telah dikenal sebagai perangsang pembentukkan tulang melalui fluorosis. Fluor mempunyai afinitas yang kuat dengan tulang terutama tulang aksial dan merupakan stimulator osteoblas yang kuat. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa insidens fraktur spinal turun dari 33% menjadi 19 % setelah pemakaian natrium fluoride selama 1 tahun dan menetap selama 3 tahun. Sayangnya, pemakaian jangka lama akan menyebabkan hambatan

**Universitas Indonesia**

mineralisasi tulang sehingga menyebabkan tulang menjadi lemah dan mudah terjadi mikrofraktur. Namun, efek ini dapat dicegah dengan pemberian kalsium bersamaan dengan natrium fluoride. Dosis yang dianjurkan ialah 50-70 mg/hari diberikan bersama kalsium 1000-1500 mg/hari. Efek samping yang muncul adalah efek samping pada gastrointestinal dan nyeri periartikuler yang menyebabkan penderita sering menghentikan terapinya.

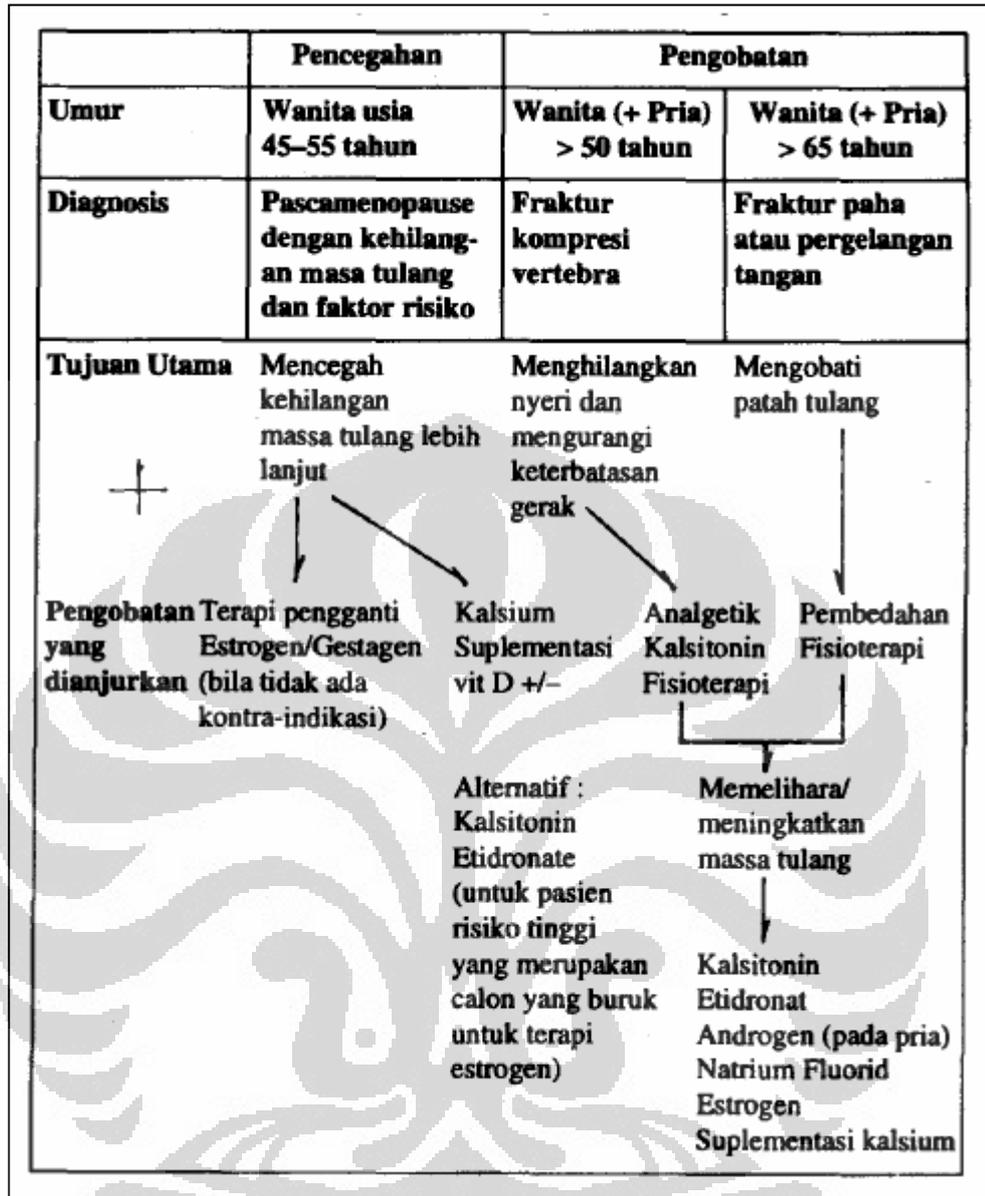
b. Menghambat resorpsi tulang

Kalsitonin merupakan penghambat resorpsi tulang yang efektif, bekerja pada osteoklas dengan cara menghambat aktivitas osteoklas, mengurangi *lifespan* osteoklas, dan mencegah pembentukan osteoklas baru. Masalah utama dengan kalsitonin ialah biayanya yang cukup besar dengan dosis 100 unit setiap hari selama 2 minggu dan dilanjutkan dengan dosis 100 unit untuk 2-3 kali/minggu.

Obat lain yang dapat menghambat laju resorpsi tulang ialah etidronat, dengan dosis yang dianjurkan sama dengan untuk pencegahan. Pada pria, pilihan lain ialah pemberian hormon androgen, yaitu dengan pemberian testosteron siprionat atau enantat 200-300 mg secara intramuskuler setiap 2-3 minggu atau nandrolon 50 mg secara intramuskuler setiap 3-4 minggu. Walaupun tidak seefektif untuk pencegahan, kombinasi estrogen-progesteron dapat dipertimbangkan pada penderita wanita.

c. Pengobatan patah tulang

Fraktur spinal membutuhkan immobilisasi singkat dan tirah baring yang disertai dengan pemberian analgetik untuk mengurangi rasa nyeri. Pasien harus diimmobilisasi secepatnya. Kalsitonin dapat diberikan sebagai tambahan untuk mempersingkat rasa nyeri, dengan dosis 100 unit/hari selama 10-15 hari. Fraktur leher femur sebaiknya diobati dengan *prosthetic hip replacement*, karena immobilisasi lama akan meningkatkan angka kematian



[Sumber : Isbagio, 1993]

**Gambar 2.2.** Strategi pencegahan dan pengobatan fraktur osteoporosis

## 2.3 Fitoestrogen

### 2.3.1 Definisi Fitoestrogen

Fitoestrogen adalah zat yang terdapat pada tumbuhan dan memiliki struktur kimia serta fungsi yang menyerupai estrogen (Bustamam, 2008).

### 2.3.2 Klasifikasi Fitoestrogen (Bustamam, 2008)

Secara umum estrogen dibagi menjadi beberapa kelompok, yaitu :

#### 2.3.2.1 Isoflavon

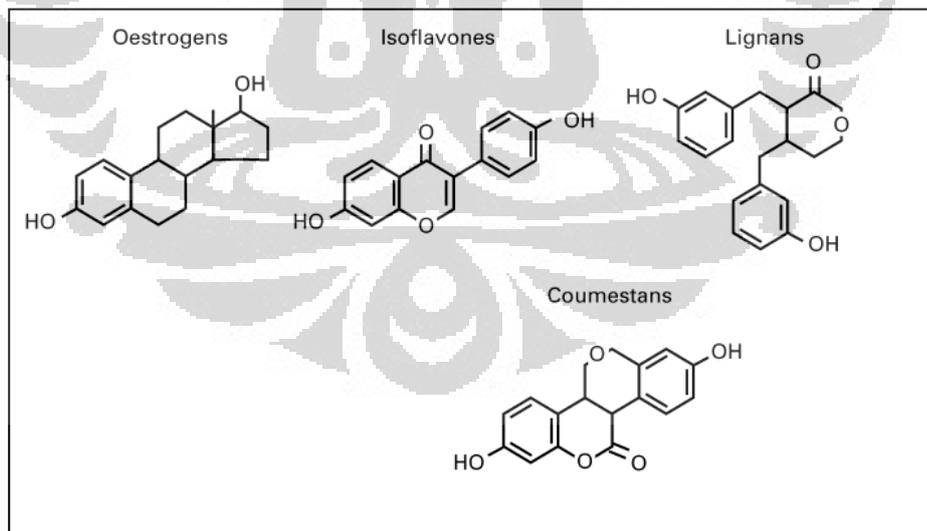
Isoflavon terdiri dari Genestein dan daidzein. Genestein dibentuk dari *biochanin A* dan dimetabolisme menjadi *p-etilfenil estrogen* inaktif, sedangkan daidzein dibentuk dari formoninetin oleh enzim hidrolitik bakteri di lumen usus dan dimetabolisme menjadi *equol* dan *o-desmetilangolesin* (O-DMA). Isoflavon terutama ditemukan pada kacang kedelai, buncis, dan kacang panjang.

#### 2.3.2.2 Lignin

Lignin dimetabolisme oleh mikroflora usus menjadi enterodiol dan enterolakton. Lignin banyak terdapat pada padi, sereal, bawang putih, brokoli, wortel, jeruk, dan apel.

#### 2.3.2.3 Kumestan

Kumestan banyak ditemukan pada kecambah, kacang-kacangan, dan biji bunga matahari.



[Sumber : Branca, 2003]

**Gambar 2.3.** Rumus bangun Estrogen, Isoflavon, Lignin, dan Kumestan

### 2.3.3 Mekanisme Kerja

Secara umum, fitoestrogen bekerja sebagai *selective estrogen receptor modulators* (SERMs), yaitu mampu memberikan efek estrogenik dan atau efek antiestrogenik. Pada jaringan reproduksi seperti kelenjar mammae, ovarium, endometrium, dan prostat, fitoestrogen bekerja sebagai anti estrogen dan aktivitas estrogeniknya bekerja nyata pada tulang (Pawitan, 2002).

Oleh karena mempunyai struktur yang menyerupai estrogen, mekanisme kerja fitoestrogen sama dengan estrogen. Fitoestrogen memiliki aktivitas estrogen lemah dan sebaliknya dalam jumlah besar dapat bersifat sebagai antiestrogen (Mei et al., 2001). Fitoestrogen berikatan dengan kedua reseptor estrogen, baik itu reseptor alfa maupun reseptor beta, namun fitoestrogen diketahui lebih banyak berikatan pada reseptor beta dibandingkan dengan alfa (Poulsen & Kruger).

Efek positif dari isoflavon terhadap metabolisme tulang disebabkan oleh dua mekanisme, yang pertama dengan mempengaruhi osteoklas melalui aktivasi apoptosis. Yang kedua dengan menghambat aktivitas tirosin kinase dengan memodulasi membran reseptor estrogen sehingga mengubah aktivitas fosfatase alkali (Pilsakova et al., 2010).

## 2.4 Metode Ekstraksi

Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tumbuhan memerlukan cara yang khusus dan spesifik untuk menariknya agar diperoleh senyawa yang lebih murni. Cara penarikan senyawa khusus dan spesifik tersebut dinamakan ekstraksi.

Ekstraksi adalah kegiatan menarik kandungan kimia yang dapat larut dalam pelarut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut. Hasil dari ekstraksi adalah terbentuknya sediaan ekstrak yang dapat berupa serbuk kering, kental, dan cair. Pembuatan sediaan ekstrak dimaksudkan agar zat berkhasiat yang terdapat dalam simplisia bisa diperoleh dengan kadar yang tinggi sehingga mempermudah dalam hal penentuan dosis khasiatnya. Beberapa metode ekstraksi yang sering digunakan untuk menarik senyawa aktif tersebut antara lain (Depkes RI, 2000) :

## 2.4.1 Cara Dingin

### 2.4.1.1 Maserasi

Maserasi adalah proses mengekstraksi simplisia dengan cara merendamnya menggunakan pelarut yang sesuai dan wadah yang tertutup pada suhu kamar dengan dilakukan pengadukan sesekali secara konstan untuk meningkatkan kecepatan ekstraksi. Pada prosedur maserasi, terdapat istilah remaserasi, yakni setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, ditambahkan pelarut lalu dilanjutkan maserasi berikutnya, dan seterusnya. Hal ini memakan waktu yang cukup lama bisa beberapa hari bahkan beberapa minggu. Kelemahan lain adalah ekstraksi yang tidak optimal bila ada senyawa yang kurang larut dalam suhu kamar. Namun, itu menjadi salah satu kelebihan maserasi, yakni tidak menyebabkan degradasi dari metabolit yang tidak tahan panas karena dilakukan pada suhu kamar.

### 2.4.1.2 Perkolasi

Perkolasi adalah proses ekstraksi dengan merendam tanaman dalam pelarut yang sesuai lalu dimasukkan ke dalam alat yang dinamakan perkolator. Proses ekstraksi dilakukan dengan menambah pelarut yang baru sampai ekstraksi sempurna yang dilakukan pada suhu ruang. Tahapan ekstraksi meliputi pendahuluan, maserasi antara, dan perkolasi sebenarnya yang dilakukan terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat). Untuk meyakinkan perkolasi telah sempurna, perkolat dapat diuji apakah terdapat metabolit dengan reagen spesifik.

## 2.4.2 Cara Panas

### 2.4.2.1 Refluks

Refluks adalah proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang umumnya konstan dengan adanya pendingin balik. Pengulangan ekstraksi pada residu pertama dilakukan 3-5 kali sehingga diperoleh hasil ekstrak yang sempurna. Refluks memungkinkan senyawa yang tidak tahan panas akan mengalami degradasi.

#### 2.4.2.2 Soxhlet

Soxhlet adalah proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang selalu baru menggunakan alat khusus agar berlangsung secara kontinyu dengan jumlah pelarut konstan dan adanya pendingin balik.

#### 2.4.2.3 Digesti

Digesti adalah proses maserasi dengan pengadukan kontinyu pada suhu yang lebih tinggi dari suhu ruangan yang pada umumnya dilakukan pada suhu 40-50°C.

#### 2.4.2.4 Infus

Infus adalah proses ekstraksi dengan pelarut air pada suhu air mendidih (96-98°C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

#### 2.4.2.5 Dekok

Dekok adalah proses infus dengan kondisi waktu yang lebih lama (lebih dari 30 menit) pada suhu air mendidih.

### 2.5 Ovariectomi

Model hewan coba memegang peranan penting dalam meningkatkan pengetahuan mengenai etiologi, patifisiologi, dan diagnosis yang berguna untuk pencegahan dan terapi (Parhizkar, 2008). Ovariectomi adalah suatu tindakan pembedahan atau teknik laparatomi untuk pengambilan ovarium bilateral. Secara luas pada bidang biomedis, tikus ovariectomi merupakan model *juvenile osteopenia* (Yamazaki & Yamaguchi, 1989; Cesnjaj, Stavljenic, Vukicevic, 1991), dan dapat menjadi model wanita pascamenopause (Shirwaikar, Khan, Malini, 2003; Devareddy, Hooshmand, Collins, Lucas, Chai, Arjmandi, 2008).

Ovariectomi menyebabkan kehilangan massa tulang di daerah trabekular tetapi tidak terjadi pada tulang kortikal. Selain itu, tindakan ovariectomi dapat segera menimbulkan gejala menopause tanpa menimbulkan gejala lain. Pada tikus yang dilakukan ovariectomi, ditemukan peningkatan aktivitas resorpsi tulang, hal ini sesuai dengan peranan estrogen terhadap tulang. Hilangnya fungsi ovarium

**Universitas Indonesia**

dalam memproduksi hormon seks steroid, seperti estradiol akan menimbulkan kondisi hipoestrogenis yang merupakan faktor utama kehilangan massa tulang (Miller, Weaver, McAllister, Koritnik, 1986).

## 2.6 Histologi

Histologi merupakan salah satu cara untuk mengidentifikasi anatomi sel secara mikroskopik. Menurut Dalley, prosedur pemeriksaan histologi tulang kaki tikus adalah sebagai berikut:

### 2.6.1 Fiksasi

Ketika sebuah jaringan diambil dari kondisi hidup, maka beberapa perubahan akan muncul dalam selnya. Bakteri akan mulai bermultiplikasi dan menghancurkan jaringan tersebut. Selain itu dapat juga terjadi proses *autolysis* yaitu hancurnya sel oleh enzim yang terdapat dalam sel tersebut. Fiksasi dimaksudkan untuk mencegah dekomposisi dari jaringan dan membunuh bakteri yang dapat menyebabkan jaringan tulang membusuk. Fiksasi ini dilakukan dengan menggunakan buffer formalin, yaitu formaldehid 4 % dalam buffer normal pada temperatur ruang (Yuehuei & Martin, 2008). Fiksasi juga bisa dilakukan dengan menggunakan etanol 70%, glutaraldehid, merkuri klorida, asam pikrat, larutan Bouin's atau larutan Carny's. Dalam melakukan proses fiksasi, rasio volume antara larutan fiksasi dengan spesimen harus cukup besar, yaitu lebih dari 10:1. Untuk spesimen tulang yang kecil (tebalnya kurang dari 5 mm), proses fiksasi dilakukan selama 24-48 jam, dan untuk spesimen tulang yang cukup besar, proses fiksasi dilakukan selama 48-72 jam.

### 2.6.2 Dekalsifikasi

Dekalsifikasi bertujuan untuk menghilangkan kalsium dan mineral dari jaringan tulang. Tanpa proses dekalsifikasi, akan sangat sulit melakukan *sectioning* dengan mikrotom. Dekalsifikasi dilakukan dengan menggunakan asam yang akan bereaksi dengan kalsium tulang membentuk garam kalsium yang larut, atau agen pengkelat yang mengkompleks ion kalsium. Salah satu agen pengkelat yang sering digunakan untuk dekalsifikasi adalah EDTA (*Ethylenediamine*

*tetraacetic acid*) dengan konsentrasi hingga 14%. Spesimen dimasukkan dalam larutan EDTA lalu distirer dengan kecepatan tertentu atau pengocokkan manual secara periodik dapat meningkatkan kecepatan dekalsifikasi (Yuehuei & Martin, 2008).

Untuk mengetahui waktu selesainya proses dekalsifikasi, ada beberapa cara yang dapat dilakukan, yaitu (Skinner, 2008) :

#### 2.6.2.1 Radiografi

Spesimen yang telah mengalami proses penghilangan kalsium dapat dideteksi dengan radiografi. Metode ini merupakan metode cukup akurat yang dapat dilakukan untuk mendeterminasi sempurnanya proses dekalsifikasi yang telah dilakukan. Namun, untuk lebih memastikan lagi, perlu juga dilakukan radiografi sebelum melakukan proses dekalsifikasi sebagai pembanding untuk mendapatkan tingkat akurasi yang maksimum.

#### 2.6.2.2 Manipulasi (*Probing* dan *Bending*)

*Probing* dan *Bending* merupakan metode yang paling sering digunakan untuk mendeterminasi waktu akhir dari proses dekalsifikasi, namun metode ini kurang akurat. Melalui proses ini, dapat diketahui jika spesimen tersebut telah cukup lunak untuk dapat dipotong. *Probing* dilakukan dengan menggunakan benda yang tajam seperti jarum atau pisau bedah.

#### 2.6.2.3 Waktu Perendaman

Lamanya waktu perendaman untuk proses dekalsifikasi yang berhasil tergantung pada jenis spesimen tulang yang didekalsifikasi. Sebagai contoh, untuk proses dekalsifikasi tulang femur yang berukuran 5 mm diperlukan waktu dekalsifikasi selama 24 jam dalam 250 ml larutan asam hidroklorat 1,35 N maupun larutan pengkelat.

#### 2.6.2.4 Uji Kimia

Pengujian secara kimia terhadap kadar kalsium dalam larutan merupakan metode yang paling akurat. Pengujian secara berkala setiap hari sangat dianjurkan

**Universitas Indonesia**

untuk penggunaan asam lemah, sedangkan untuk larutan pengkelat dianjurkan untuk melakukan uji setiap minggu.

### 2.6.3 Dehidrasi dan *Clearing*

Jaringan yang telah mengalami proses fiksasi akan memiliki kandungan air yang tinggi. Hal ini akan mempersulit proses pemotongan karena akan menyebabkan jaringan menjadi terlalu lunak atau menimbulkan *hollow spaces* yang dapat menyebabkan deformasi saat dipotong. Dehidrasi merupakan proses menghilangkan air dari tulang dan menggantinya dengan etanol. Etanol yang digunakan adalah etanol bertingkat, mulai dari 70, 96 sampai dengan absolut dengan dua kali pergantian dilakukan pada masing-masing konsentrasi. Semakin lama spesimen tulang direndam dengan alkohol 96% dan absolut, maka spesimen tulang tersebut akan semakin sulit dipotong. Pelarut lain yang dapat digunakan dalam proses dehidrasi adalah aseton, butil alkohol, dan isopropil alkohol (Yuehuei dan Martin, 2008).

Pada proses *clearing*, etanol absolut yang digunakan pada proses dehidrasi harus dihilangkan karena alkohol tidak larut dan tidak bercampur dengan parafin. Jadi diperlukan larutan yang dapat larut ataupun bercampur baik di alkohol maupun di paraffin. Pelarut yang sering digunakan untuk tujuan ini adalah benzen, toluen, dan xilen. Pelarut ini juga akan melarutkan jaringan sehingga jaringan menjadi transparan. Hal inilah yang menyebabkan langkah ini disebut sebagai *clearing* (Yuehuei & Martin, 2008).

### 2.6.4 Infiltrasi dan Embedding

Pada proses infiltrasi, pelarut yang digunakan pada waktu *clearing* digantikan dengan paraffin. Paraffin terdiri dari dua jenis, yaitu *soft* paraffin dan *hard* paraffin. Titik leleh *soft* paraffin adalah 50-52°C atau 53-55°C, sedangkan titik leleh *hard* paraffin adalah 56-58°C atau 60-68°C. Pemilihan titik leleh dan jenis paraffin yang akan digunakan dilakukan berdasarkan tebal dan jenis jaringan yang akan diinfiltrasi. *Soft* paraffin untuk jaringan yang lunak dan *hard* paraffin untuk jaringan yang keras. Jika jaringan nantinya akan dipotong cukup tebal, sebaiknya dipilih *soft* paraffin. Untuk jaringan yang akan dipotong dengan

**Universitas Indonesia**

ketebalan 5-7  $\mu\text{m}$ , gunakan *hard* paraffin dengan titik leleh 56-58°C. Sedangkan untuk jaringan yang akan dipotong dengan ketebalan kurang dari 5 $\mu\text{m}$ , gunakan *hard* paraffin dengan titik leleh 60-68°C. Selain itu, kondisi temperatur ruangan juga mempengaruhi pemilihan paraffin. Pada ruangan yang panas lebih dianjurkan untuk menggunakan *hard* paraffin.

Setelah spesimen tulang diinfiltrasi dengan paraffin, spesimen ini selanjutnya akan mengalami proses *embedding*. Spesimen tulang ditempatkan dalam sebuah kotak kecil atau kotak kertas yang telah diisi dengan paraffin cair.

#### 2.6.5 *Sectioning*

Mikrotom merupakan perangkat mekanik yang dapat memotong jaringan dengan tebal yang sama, yaitu 1-10  $\mu\text{m}$ . Alat ini bekerja dengan menggerakkan blok jaringan ke atas dan ke bawah sehingga blok melewati pisau yang memotong paraffin dan jaringan menjadi lembaran yang tipis-tipis.

#### 2.6.6 *Mounting dan Staining*

Lembaran diletakkan di pemanas lalu tambahkan air suling untuk mengapungkan paraffin. Kelebihan air selanjutnya dibuang dan lembaran dibiarkan kering selama semalaman.

Jaringan yang dipelajari dengan mikroskop cahaya harus diwarnai terlebih dahulu karena sebagian besar jaringan tidak berwarna. Kebanyakan warna akan membedakan antara asam dan komponen dasar dari sel. Kombinasi hematoxilin dengan eosin merupakan pewarna yang paling sering digunakan dalam histologi. Setelah diwarnai, lembaran dapat diamati dengan menggunakan mikroskop optik.

### 2.7 **Natrium Alendronat**

Natrium alendronat merupakan biphosphonat oral yang efektif digunakan untuk mencegah ataupun menyembuhkan osteoporosis (Epstein et al., 2005). Obat ini bekerja dengan cara menghambat osteoklas yang memediasi resorpsi tulang. Dosis yang umum digunakan adalah 10 mg/hari atau 70 mg/minggu (Marshall, Rainsford, James, Hunt, 2000). Efek samping yang paling umum muncul adalah mual-mual, nyeri abdomen dan dispepsia.

**Universitas Indonesia**

## **BAB 3 METODE PENELITIAN**

### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Proses ekstraksi tanaman kacang panjang (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) dilakukan di laboratorium Fitokimia Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia untuk pembuatan ekstrak. Penelitian *in vivo* dilakukan di Laboratorium Farmakologi Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Pembuatan dan pembacaan preparat histologi tulang trabekular kaki tikus dilakukan di Laboratorium Biologi Perkembangan Hewan dan Tumbuhan Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari-Mei 2012.

### **3.2 Bahan dan Alat**

#### **3.2.1 Tumbuhan**

Tumbuhan yang akan digunakan adalah serbuk kering buah kacang panjang (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (BALITRO) dan di determinasi di Herbarium LIPI, Cibinong (Lampiran 7).

#### **3.2.2 Bahan Kimia**

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah Natrium Alendronat (PT. Novell Pharmaceutical Laboratories) (Lampiran 6), Formaldehid (Merck), Dinatrium Hidrofosfat (Merck), Natrium Dihidrofosfat (Merck), Etanol 70%, etanol 96%, etanol absolut, Paraffin, Xilen, Na<sub>2</sub>EDTA, NaOH (Merck), Gliserol, CMC Na, Akuades, Hematoxyllin, Eosin, dan Eter.

#### **3.2.3 Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Maserator, Evaporator, Kandang tikus, Sonde oral, Timbangan analitik, Timbangan hewan, Jarum suntik,

Alat-alat gelas, Spuit 5 ml (Terumo), Oven, Mikrotom, Alat bedah, *USB Camera* (OPTILAB), *software Image Viewer*, dan *software Image Raster*.

### 3.2.4 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih betina galur *Sprague Dawley* (SD) berumur 50 hari dari Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor (Lampiran 5).

## 3.3 Cara kerja (Lampiran 8)

### 3.3.1 Persiapan Hewan Uji

Sebelum digunakan, tikus diadaptasikan (diaklimatisasi) terlebih dahulu selama tiga minggu dalam kandang Laboratorium Farmakologi Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia agar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan baru. Tikus diberi makan dan minum yang seragam dan dilakukan pengamatan rutin terhadap keadaan umum dan penimbangan berat badan tikus. Tikus yang dinyatakan sehat dikelompokkan secara acak menjadi 6 kelompok.

Tikus dibagi dalam 6 kelompok dengan jumlah tikus dalam tiap kelompok dihitung berdasarkan rumus Federer berikut (Federer, 1991):

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

Dimana: t adalah jumlah perlakuan

n adalah jumlah pengulangan untuk tiap perlakuan

Pada penelitian ini,  $t = 6$ , maka  $n \geq 4$

Jadi, tikus dibagi dalam 6 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari paling sedikit 4 ekor. Dalam penelitian ini, digunakan 6 ekor tikus pada masing-masing kelompok.

### 3.3.2 Ovariektomi (Parhizkar, 2008)

Prosedur ovariektomi yang dilakukan adalah tikus yang akan diovariektomi ditimbang dan dicatat beratnya. Lalu tikus-tikus tersebut dianastesi dengan menggunakan eter secara inhalasi. Proses anastesi dilakukan dengan memasukkan tikus ke dalam wadah tertutup yang dasarnya dilapisi dengan kapas

**Universitas Indonesia**

yang telah dibasahi dengan eter sebanyak 15 ml. Selain itu, disediakan juga sungkup yang terbuat dari botol film yang dasarnya dilapisi kapas yang telah dibasahi dengan eter. Sungkup ini digunakan jika tikus tiba-tiba sadar saat proses pembedahan.

Setelah dianestesi, tikus diletakkan pada posisi kiri lateral, sisi kiri tikus di cukur hingga semua bulunya hilang. Daerah tersebut kemudian dibersihkan dengan menggunakan etanol 70%. Sayatan sepanjang 1-2 cm dibuat pada bagian dorsolateral, dari lumbal vertebra kedua sampai kelima atau sampai bagian tengah dari abdomen dengan menggunakan pisau bedah. Sayatan tersebut merupakan panjang minimal yang diperbolehkan untuk ekstrusi ovarium. Kulit tikus sangat longgar, sehingga sayatan tersebut dapat ditarik dari satu sisi ke sisi lain.

Kemudian sayatan sepanjang 1,5 sampai 2 cm dibuat di bagian peritoneal dengan menggunakan gunting ataupun pisau bedah. Ovarium kiri dan lemak yang ada disana dapat diambil dengan mudah dengan cara ditarik perlahan. Prosedur ini bisa diulang untuk mengangkat ovarium kanan. Setelah kedua ovarium diangkat, peritoneal dan kulit dapat ditutup dengan jahitan. Prosedur aseptis harus dipertahankan selama proses pembedahan. Luka akibat pembedahan dibiarkan mengering selama kurang lebih 20 hari. Prosedur ini secara lengkap dapat dilihat pada Gambar 3.2.

### 3.3.3 Pengumpulan, Penyiapan, dan Pembuatan Serbuk Simplisia

Buah kacang panjang segar diperoleh dari perkebunan di daerah Cisarua. Buah kacang panjang yang telah dikumpulkan, dipilih yang kondisinya baik, dengan usia kira-kira menjelang panen, lebih kurang 3 bulan dengan panjang 45-50 cm. Buah kacang panjang lalu dibersihkan menggunakan air mengalir sampai bersih lalu ditiriskan. Buah kacang panjang yang diperoleh sebanyak 35 kg, lalu dipotong kurang lebih 5 cm kemudian dikeringkan dengan sinar matahari langsung hingga kering. Buah kacang panjang yang telah kering diserbukkan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan mesh 50, kemudian ditimbang.

### 3.3.4 Pembuatan Ekstrak Etanol Kacang Panjang

Serbuk buah kacang panjang diekstraksi dengan menggunakan etanol 70% dengan cara maserasi (Meiyanto, Handayani, Jenie, 2008). Serbuk buah kacang panjang ditimbang sebanyak 0,75 kg kemudian dimasukkan ke dalam botol coklat lalu ditambahkan dengan 2 liter etanol 70%. Botol coklat yang telah berisi serbuk buah kacang panjang dan etanol 70% ini kemudian dikocok dengan kecepatan yang konstan selama 6 jam lalu didiamkan selama 24 jam. Setelah itu, maserat hasil maserasi disaring dan ampasnya kembali ditambahkan dengan 1 liter etanol 70% dan dimaserasi kembali. Proses ini diulang hingga terjadi perubahan wana pada maserat. Semua maserat yang diperoleh dikumpulkan kemudian diuapkan dengan evaporator pada suhu 50°C dengan kecepatan 50 rpm sehingga dihasilkan ekstrak yang lebih kental.

Ekstrak lebih kental yang diperoleh dari hasil penguapan dengan evaporator ini kemudian dikentalkan lagi dengan menggunakan *waterbath* pada suhu 40°C sampai didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental dapat diangkat dari *waterbath* dan dapat digunakan jika pada tiga kali penimbangan diperoleh berat ekstrak yang konstan.

### 3.3.5 Penetapan Rendemen dan Skrining Kandungan Ekstrak Etanol Kacang Panjang

#### 3.3.5.1 Penetapan Rendemen

Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan dibandingkan bobotnya dengan serbuk simplisia awal yang digunakan. Perbandingan tersebut dinyatakan dalam % (persen) (Depkes RI, 2000).

#### 3.3.5.2 Skrining Kandungan Ekstrak Etanol Kacang Panjang

##### a. Uji Glikosida

Uji glikosida dilakukan dengan menggunakan pereaksi Mollisch. Ekstrak etanol buah kacang panjang sebanyak 100 mg ditambah dengan 15 ml HCl 2 N, lalu dipanaskan hingga tersisa setengah bagian kemudian disaring. Filtrat sebanyak 3 ml yang diperoleh kemudian ditambah dengan 3 ml pereaksi Mollisch. Setelah itu ditambahkan 3 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4(p)</sub>. Hasil positif ditunjukkan dengan

**Universitas Indonesia**

terbentuknya cincin pada lapisan tengah larutan. Sebagai pembanding digunakan centella herba.

b. Uji Tanin

Ekstrak etanol buah kacang panjang sebanyak 100 mg ditambahkan 15 ml air panas kemudian dipanaskan hingga mendidih setelah itu disaring. Filtrat sebanyak 5 ml yang diperoleh ditambahkan 1 ml larutan gelatin 10%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya gumpalan berwarna putih. Sebagai pembanding digunakan psidium folium.

c. Uji Flavonoid

Filtrat ekstrak etanol buah kacang panjang sebanyak 10 ml diuapkan hingga kering lalu ditambah dengan 3 ml etanol 95%, diaduk hingga larut, kemudian ditambah 100 mg serbuk Mg dan 10 tetes HCl(p). Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah jingga hingga merah ungu atau kuning jingga untuk flavon dan kalkon. Sebagai pembanding digunakan orthosiphon folium.

d. Uji Alkaloid

Filtrat ekstrak etanol buah kacang panjang sebanyak 3 ml ditambah dengan 1 ml HCl 2 N ditambah 5 tetes pereaksi dragendorff/bouchardat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna merah. Sebagai pembanding digunakan kina.

e. Uji Saponin

Ekstrak etanol kacang panjang sebanyak 100 mg ditambah dengan 5 ml air panas lalu dikocok kuat selama 10 detik sehingga terbentuk busa. Larutan ini kemudian didiamkan selama 10 menit, lalu ditambahkan dengan 3-5 tetes HCl 2 N. Hasil positif ditunjukkan dengan tidak hilangnya busa. Sebagai pembanding digunakan orthosiphon folium.

f. Uji Fenol

Filtrat ekstrak etanol buah kacang panjang sebanyak 3 ml ditambah dengan 3 tetes  $\text{FeCl}_3$ . Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna biru-hitam. Sebagai pembanding digunakan daun teh.

g. Uji Terpenoid

Ekstrak etanol buah kacang panjang sebanyak 100 mg ditambahkan dengan 5 ml eter, kemudian diuapkan hingga kering. Setelah itu ditambahkan 5 tetes asetat anhidrida dan 3 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_{4(p)}$ . Hasil reaksi positif apabila dihasilkan warna hijau. Sebagai pembanding digunakan caryophylli flos.

### 3.3.6 Penetapan Dosis Natrium Alendronat

Dosis natrium alendronat yang biasa digunakan adalah 10 mg/hari atau 70 mg/minggu (Epstein et al., 2005). Pada penelitian ini, digunakan dosis 10 mg/hari. Jika dikonversi ke dosis tikus, maka dosis harian yang akan diberikan ke tikus adalah  $10 \text{ mg} \times 0,018 = 0,18 \text{ mg}/200 \text{ g BB tikus/hari}$ .

### 3.3.7 Pembuatan Larutan Natrium Alendronat 0,18 mg/200 g BB tikus/hari

Ditimbang sebanyak 17,64 mg serbuk natrium alendronat kemudian dilarutkan dalam akuades dan dicukupkan volumenya hingga 294 ml. Larutan natrium alendronat ini diberikan secara peroral sebagai kontrol positif selama 28 hari pada tikus saat 20 hari pascaovariektomi.

### 3.3.8 Penetapan Dosis Ekstrak

Dosis ekstrak kental kacang panjang yang digunakan berdasarkan penelitian terdahulu adalah 1000 mg/kg BB tikus. Dosis ini setara dengan 200 mg/200 g BB tikus (Meiyanto, Handayani, Jenie, 2008). Dalam penelitian ini digunakan variasi dosis untuk mengetahui dosis optimumnya. Variasi dosis yang digunakan adalah 100, 200, dan 400 mg/200 g BB tikus. Ekstrak ini diberikan secara peroral pada tikus selama 28 hari setelah 20 hari ovariektomi.

### 3.3.9 Penyiapan Bahan Uji

Sebanyak 500 mg serbuk CMC ditaburkan pada lumpang berisi aquadest panas bersuhu 70°C dengan volume 10 ml. Kemudian CMC dibiarkan mengembang selama kurang lebih 10 menit. CMC yang telah mengembang tersebut digerus homogen, dan ditambahkan perlahan-lahan dengan aquadest sambil dihomogenisasi, hingga mencapai volume suspensi 100 ml sehingga dihasilkan CMC 0,5%.

Ekstrak yang akan diberikan akan disuspensikan ke dalam CMC 0,5% ini. Suspensi ekstrak etanol buah kacang panjang ini dibuat dalam tiga konsentrasi, yaitu 33,3 mg/ml, 66,67 mg/ml, dan 133,33 mg/ml sehingga volume maksimal yang diperoleh oleh setiap tikus adalah 3,0 ml.

Untuk dosis 1, sebanyak 600 mg ekstrak disuspensikan dalam 5 ml CMC 0,5% lalu digerus hingga homogen dan ditambahkan perlahan-lahan dengan CMC 0,5% sampai mencapai volume 18 ml sehingga dihasilkan suspensi ekstrak etanol buah kacang panjang dengan konsentrasi 33,33 mg/ml.

Untuk dosis 2, sebanyak 1200 mg ekstrak disuspensikan dalam 5 ml CMC 0,5% lalu digerus hingga homogen dan ditambahkan perlahan-lahan dengan CMC 0,5% sampai mencapai volume 18 ml sehingga dihasilkan suspensi ekstrak etanol buah kacang panjang dengan konsentrasi 66,67 mg/ml.

Untuk dosis 3, sebanyak 2400 mg ekstrak disuspensikan dalam 5 ml CMC 0,5% lalu digerus hingga homogen dan ditambahkan perlahan-lahan dengan CMC 0,5% sampai mencapai volume 18 ml sehingga dihasilkan suspensi ekstrak etanol buah kacang panjang dengan konsentrasi 133,33 mg/ml.

Untuk menjaga kestabilannya, suspensi baru dibuat dan diberikan pada hewan coba menjelang percobaan. Pemberian pada hewan coba dilakukan secara oral dengan teknik sonde.

### 3.3.10 Pengukuran Berat Badan Tikus

Semua tikus diukur berat badannya setiap hari pada waktu yang sama. Kemudian berat badan tikus dicatat. Berat badan tikus ini digunakan dalam penentuan dosis CMC 0,5%, dosis ekstrak, dan juga dosis natrium alendronat.

Selain itu, pengukuran berat badan juga digunakan sebagai parameter keberhasilan ovariektomi.

### 3.3.11 Isolasi Uterus Tikus

Pada hari ke 29, semua hewan coba dikorbankan. Kulit yang terdapat pada bagian perut tikus dicukur kemudian dibuat guntingan mid sagital dalam kulit sepanjang abdomen. Lalu kulit digunting secara lateral pada bagian anterior dan posterior dari torehan mid sagital sebelumnya sehingga seluruh otot diperlihatkan. Kemudian otot tersebut digunting sehingga organ-organ dalam dari tikus tersebut terlihat. Setelah itu, uterus dari tikus diangkat dan dibersihkan dari lemak. Uterus yang telah bersih kemudian secepatnya ditimbang dan dicatat beratnya.

### 3.3.12 Isolasi Tulang Kaki Tikus

Setelah uterus tikus diisolasi, dilakukan pembedahan pada kaki tikus untuk diambil tulang tibia kaki kirinya. Pembedahan dilakukan dengan cara menggunting kulit secara mid sagital pada bagian kaki. Lalu guntingan tersebut dilanjutkan hingga seluruh kulit pada bagian kaki terlepas. Kemudian dilanjutkan dengan menggunting otot sama seperti menggunting kulit hingga bagian tulang tibianya terlihat. Tulang tibia diangkat dengan cara menggunting bagian sendi, namun harus berhati-hati agar tidak merusak bagian trabekularnya. Tulang tibia yang telah diisolasi kemudian dipotong bagian trabekularnya.

### 3.3.13 Histologi

Pada penelitian ini, tulang yang digunakan adalah tulang trabekular. Prosedur pemeriksaan histologi tulang kaki tikus adalah sebagai berikut:

#### 3.3.13.1 Pembuatan *Neutral Buffered Formalin* (NBF)

Larutan formaldehid 37-40% 100,0 ml dicampurkan dengan 4,0 g Dinatrium Hidrofosfat dan 6,5 g Natrium Dihidrofosfat. Kemudian dilarutkan dengan penambahan akuades secukupnya, lalu volume dicukupkan hingga 1000,0 ml dengan akuades (Scarano, Iezzi, Piattelli, 2008).

### 3.3.13.2 Fiksasi

Fiksasi dilakukan dengan menggunakan larutan *Neutral Buffered Formalin* (NBF). Spesimen tulang direndam selama 48 jam di dalam botol film yang telah diisi dengan larutan *Neutral Buffered Formalin* (NBF) pada temperatur ruang.

### 3.3.13.3 Dekalsifikasi

Dekalsifikasi dilakukan dengan menggunakan larutan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ . Larutan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  yang digunakan dibuat dengan cara melarutkan 14,5 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 1,25 NaOH, dan 15 ml gliserol dengan 100 ml aquades. Sehingga dihasilkan larutan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  dengan pH 7,3. Larutan ini disimpan pada suhu 4°C.

Proses dekalsifikasi dilakukan dengan memasukkan spesimen tulang ke dalam larutan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  lalu dikocok dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Proses ini dilakukan pada suhu 4°C (Gambar 3.3). Larutan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  yang digunakan harus diganti setiap 5 hari. Proses dekalsifikasi biasanya berlangsung selama 10-14 hari atau sampai spesimen tulang tersebut dapat ditembus oleh jarum.

Selain menggunakan larutan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , proses dekalsifikasi juga dapat dilakukan dengan menggunakan larutan asam, baik asam kuat maupun asam lemah. Asam kuat yang biasanya digunakan dalam dekalsifikasi adalah asam hidroklorat dan asam nitrat dengan konsentrasi 5-10%. Sedangkan asam lemah yang biasa digunakan adalah asam formiat, asam pikrat, dan asam asetat. Asam asetat dengan konsentrasi 5-10% merupakan pilihan yang paling sering digunakan (Skinner, 2008).

### 3.3.13.4 Dehidrasi dan *Clearing*

Dehidrasi dilakukan dengan etanol bertingkat, mulai dari 70, 96 sampai dengan etanol absolut. Pada tahap awal, dilakukan dehidrasi dengan etanol 70% selama 1 hari untuk membersihkan tulang dari proses fiksasi. Kemudian dilanjutkan dengan etanol 96 % dan etanol absolut masing-masing selama 1 jam.

Pada proses *clearing*, etanol absolut yang digunakan pada proses dehidrasi dihilangkan dan digantikan dengan xilen. Spesimen tulang direndam dalam larutan xilen selama satu jam sebanyak dua kali.

#### 3.3.13.5 Embedding

Pada proses embedding, xilen yang ada digantikan dengan paraffin. Tulang dicelupkan ke dalam wadah yang berisi paraffin selama 3 jam, lalu dicelupkan ke wadah yang berisi paraffin berikutnya selama 3 jam dalam oven bersuhu 66°C (Gambar 3.4), selanjutnya jaringan tulang ditanam dalam blok paraffin.

#### 3.3.13.6 Sectioning

Jaringan yang tertanam dalam blok paraffin dipotong dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 $\mu$ m (Gambar 3.5).

#### 3.3.13.7 *Mounting* dan *Staining*

Lembaran yang telah dipotong diletakkan di pemanas lalu tambahkan air untuk mengapungkan paraffin (Gambar 3.6). Kelebihan air selanjutnya dibuang dan lembaran dibiarkan kering. Pada saat pewarnaan, paraffin dalam lembaran harus dihilangkan. Lembaran direndam dalam xilen selama 10 menit lalu dilanjutkan dengan xilen berikutnya selama 10 menit juga. Lembaran kemudian direhidrasi dengan menggunakan etanol bertingkat mulai dari etanol absolut, etanol 96%, dan etanol 70% masing-masing 5 menit kemudian dilanjutkan dengan air yang mengalir selama 2 menit lalu ditempatkan dalam hematoxylin selama 5 menit dan dengan air mengalir lagi selama 2 menit.

Selanjutnya lembaran diwarnai lagi dengan eosin selama 2 menit lalu kembali di dehidrasi dengan alkohol bertingkat mulai dari 70% selama 2 menit, etanol 96% sebanyak dua kali, masing-masing selama 5 menit, dan etanol absolut sebanyak dua kali, masing-masing 5 menit. Kelebihan eosin dibersihkan dengan xilen sebanyak 2 kali masing-masing 5 menit. Lembaran kemudian didiamkan hingga kering lalu ditutup dengan *cover glass*. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop optik (Boyce et al., 1992; Erben, 1997).

### 3.3.14 Perhitungan Jumlah Osteoklas

Perhitungan jumlah osteoklas dilakukan dengan menggunakan mikroskop optik dan dibantu dengan dengan sebuah alat yang bernama *USB Camera* (OPTILAB). Mikroskop optik yang digunakan dihubungkan ke komputer dengan menggunakan *USB Camera* sehingga layar komputer menampilkan gambar yang terlihat di bawah mikroskop. Gambar akan terlihat di layar komputer melalui sebuah *software*, yaitu *Optilab viewer*. Kemudian jarak fokus dari mikroskop diatur sehingga diperoleh gambar yang jelas, lalu preparat digeser hingga diperoleh bagian yang ingin diamati, yaitu bagian bawah *growth plate* yang berisi osteoklas. Setelah bagian yang ingin diamati ditemukan, gambar diklik kanan lalu besarnya gambar dipilih, sehingga diperoleh luas daerah 220 mikron x 170 mikron atau seluas 38.590 mikron<sup>2</sup>. Untuk perhitungan jumlah osteoklas, digunakan *software* yang bernama *Image Raster*. Gambar yang telah diambil dibuka pada *Image Raster* kemudian dipilih *Tools-Manual Count*. Osteoklas yang ada pada gambar kemudian ditandai dengan lingkaran berwarna kuning dengan cara diklik. Setiap osteoklas yang ditandai akan secara otomatis terhitung dibagian tepi kiri gambar. Data jumlah osteoklas dalam gambar tersebut dapat diperoleh saat semua osteoklas telah ditandai.

## 3.4 Metode

### 3.4.1 Prinsip

Hewan uji akan mengalami ovariektomi agar mendapatkan kondisi seperti wanita pascamenopause. Setelah itu, hewan uji diberikan ekstrak etanol 70% buah kacang panjang dengan dosis yang bervariasi. Hasilnya akan dinilai dengan melihat gambaran histologinya. Aktivitas antiosteoporosis dari kacang panjang akan dilihat dari penurunan jumlah osteoklas pada lengkung *growth plate* pada hari ke-29.

**Tabel 3. 1** Kelompok Perlakuan Uji Antiosteoporosis

Kelompok	Jumlah Tikus	Perlakuan
Kontrol Negatif	6	CMC 0,5% sebanyak 3 ml/200 g BB tikus selama 28 hari pada tikus yang diovariectomi
Kontrol Positif	6	Natrium alendronat 0,18 mg/200 g BB tikus dalam 3 ml akuades selama 28 hari pada tikus yang diovariectomi
Kelompok I	6	Ekstrak kacang panjang dengan dosis 100 mg/200 g BB tikus dalam 3 ml larutan CMC 0,5% selama 28 hari pada tikus yang diovariectomi.
Kelompok II	6	Ekstrak kacang panjang dengan dosis 200 mg/200 g BB tikus dalam 3 ml larutan CMC 0,5% selama 28 hari pada tikus yang diovariectomi..
Kelompok III	6	Ekstrak kacang panjang dengan dosisi 400 mg/200 g BB tikus dalam 3 ml larutan CMC 0,5% selama 28 hari pada tikus yang diovariectomi..
Kelompok <i>Sham</i>	6	CMC 0,5% sebanyak 3 ml/200 g BB tikus selama 28 hari pada tikus yang dibedah namun tidak diovariectomi.

#### 3.4.2 Prosedur Uji Antiosteoporosis (Lampiran 8)

Prosedur uji antiosteoporosis dimulai dari tikus diaklimatisasi selama tiga minggu di dalam kandang. Pada hari pengujian, tikus ditimbang bobotnya dan dikelompokkan secara acak dengan jumlah enam kelompok tikus terdiri dari enam ekor untuk masing-masing kelompok lalu diovariectomi sesuai dengan prosedur ovariektomi. Prosedur ovariektomi ini dilakukan untuk mendapatkan kondisi

**Universitas Indonesia**

seperti pascamenopause yang mengalami penurunan kadar estrogen dalam tubuhnya. Setelah mengalami ovariectomi, luka akibat pembedahan dibiarkan mengering selama 20 hari dan dipantau setiap hari.

Pada hari ke-21 tikus diberikan perlakuan sesuai dengan kelompoknya masing-masing (Tabel 3.1). Pada hari ke-29 semua tikus dikorbankan, kemudian diambil tulang trabekular kaki kirinya dan uterusnya. Uterus yang telah dibersihkan dari lemak kemudian ditimbang bobotnya. Bagian trabekular dari tulang tibia kaki kiri tikus tersebut kemudian dibuat menjadi preparat histologi sesuai dengan prosedur histologi untuk dilihat jumlah osteoklas pada *growth plate* dengan menggunakan mikroskop optik.

### 3.5 Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis dengan uji *Saphiro - Wilk* untuk melihat distribusi data dan dianalisis dengan uji *Levene* untuk melihat homogenitas data. Jika data terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji analisis varians (ANOVA) satu arah dengan taraf kepercayaan 95% dan dilanjutkan uji LSD (*Least Significant Difference*) untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan bermakna. Jika salah satu syarat untuk uji ANOVA tidak dipenuhi, maka dilakukan uji Kruskal – Wallis untuk melihat adanya perbedaan, selanjutnya dilakukan uji Mann - Whitney (Dahlan, 2009).

## **BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **4.1 Penyiapan Serbuk Simplisia**

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman kacang panjang. Buah kacang panjang dipanen saat sudah berusia 3 bulan dengan panjang buah rata-rata 45-50 cm. Buah kacang panjang yang telah dipanen kemudian dicuci hingga bersih dengan air mengalir, lalu dipotong-potong menjadi 5 cm dan dijemur di bawah sinar matahari langsung hingga kering. Buah kacang panjang yang telah kering kemudian dibuat menjadi serbuk lalu diayak dengan ayakan 50 mesh. Dari 35 kg berat basah buah kacang panjang, dihasilkan 2,7 kg serbuk kering buah kacang panjang sehingga diperoleh persentase berat serbuk kering buah kacang panjang terhadap berat basah buah kacang panjang adalah 7,714%.

### **4.2 Penyiapan Ekstrak Etanol 70% Serbuk Buah Kacang Panjang**

Serbuk buah kacang panjang diekstraksi dengan menggunakan etanol 70% dengan cara maserasi (Meiyanto, Handayani, Jenie, 2008). Dalam proses maserasi digunakan pelarut etanol 70% karena senyawa aktif utama yang berperan sebagai antiosteoporosis yang terdapat dalam buah kacang panjang adalah fitoestrogen yaitu isoflavon yang merupakan salah satu jenis flavonoid yang larut dalam etanol 70% (Arini, Nurmawan, Alfiani, Hertiana). Alasan lain penggunaan etanol 70% sebagai pelarut adalah sifatnya yang lebih tidak toksik dibandingkan pelarut polar yang lain seperti metanol. Selain itu etanol 70% juga merupakan pelarut yang mudah menguap sehingga lebih efisien dari segi jumlah maupun waktu.

Proses penguapan ekstrak dilakukan dengan menggunakan evaporator karena pada evaporator digunakan pompa vakum sehingga proses penguapan ekstrak lebih mudah dan lebih cepat. Selain itu, dengan menggunakan evaporator, pelarut yang diuapkan dapat diperoleh dan digunakan kembali sehingga lebih efisien dalam segi biaya. Ekstrak lebih kental yang diperoleh dari hasil penguapan dengan evaporator ini kemudian dikentalkan lagi dengan menggunakan *waterbath* pada suhu 40°C sampai didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental dapat diangkat dari *waterbath* dan dapat digunakan jika pada tiga kali penimbangan diperoleh berat ekstrak yang konstan.

Ekstrak etanol buah kacang panjang yang diperoleh kemudian dianalisa secara organoleptis, yaitu meliputi bentuk, warna, bau, dan rasanya. Secara organoleptis, ekstrak etanol buah kacang panjang ini berbentuk kental seperti karamel, berwarna coklat kehitaman, berbau khas dan rasanya agak pahit.



**Gambar 4.1** Ekstrak kental buah kacang panjang

Dari 300 mg serbuk kering buah kacang panjang dihasilkan 18,8 g ekstrak kental buah kacang panjang, sehingga diperoleh nilai rendemen sebesar 6,27%.

#### 4.3 Perhitungan Dosis Berdasarkan Rendemen

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini didasarkan pada penelitian sebelumnya, yaitu 1000 mg/ kg BB tikus (Meiyanto, Handayani, Jenie, 2008). Pada penelitian tersebut diperoleh data bahwa dari 300 mg serbuk kering buah kacang panjang diperoleh ekstrak kental sebanyak 18,75 g ekstrak kental buah kacang panjang, sehingga diperoleh rendemen sebesar 6,25 %.

Dari data ini, dilakukan perhitungan dosis sebagai berikut :

1. Dosis 1

$$\frac{6,27\%}{6,25\%} \times 100 \text{ mg}/200 \text{ g BB tikus} = 100,32 \text{ mg}/200 \text{ g BB tikus}$$

2. Dosis 2

$$\frac{6,27\%}{6,25\%} \times 200 \text{ mg}/200 \text{ g BB tikus} = 200,64 \text{ mg}/200 \text{ g BB tikus}$$

3. Dosis 3

$$\frac{6,27\%}{6,25\%} \times 400 \text{ mg}/200 \text{ g BB tikus} = 401,28 \text{ mg}/200 \text{ g BB tikus}$$

Karena perbedaan dosis setelah dibandingkan dengan rendemen sangat kecil, maka pada penelitian ini tetap digunakan dosis awal, yaitu 100 mg, 200 mg, dan 400 mg/200 g BB tikus.

#### 4.4 Hasil Skrining Fitokimia

Hasil dari uji kandungan kimia ekstrak etanol 70% buah kacang panjang adalah sebagai berikut :

**Tabel 4.1** Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol buah kacang panjang

KANDUNGAN KIMIA	HASIL UJI
Glikosida	Positif (+)
Tanin	Negatif (-)
Flavonoid	Positif (+)
Alkaloid	Negatif (-)
Saponin	Negatif (-)
Fenol	Positif (+)
Terpenoid	Negatif (-)

#### 4.5 Ovariectomi

Pada penelitian ini, kelompok pertama sampai dengan kelompok kelima merupakan kelompok ovariectomi, namun kelompok keenam adalah kelompok *sham*. Kelompok *sham* adalah kelompok yang juga mengalami pembedahan namun tidak mengalami pengangkatan ovarium. Hal ini dilakukan agar setiap kelompok memiliki kondisi yang sama, yaitu pembedahan walaupun tidak mengalami pengangkatan ovarium sehingga kemungkinan terjadinya bias karena pembedahan dapat dihindari. Keberhasilan dari prosedur ovariectomi dapat dilihat melalui beberapa parameter, yaitu pengukuran berat uterus basah dan peningkatan berat badan tikus

#### 4.6 Pengukuran Berat Uterus Tikus

Uterus yang telah diisolasi dari tikus kemudian dibersihkan dari lemak dan dicatat berat basahnya.

**Tabel 4.2** Berat uterus rata-rata pada semua kelompok setelah hari ke-28

KELOMPOK	BERAT UTERUS (g)
	Rata-rata $\pm$ SD
Kontrol Negatif	0,058 $\pm$ 0,017
Kontrol Positif	0,056 $\pm$ 0,025
Dosis 1	0,062 $\pm$ 0,019
Dosis 2	0,065 $\pm$ 0,025
Dosis 3	0,047 $\pm$ 0,017
Kelompok <i>Sham</i>	0,214 $\pm$ 0,109

Keterangan: Kontrol Negatif = tikus yang diovariectomi (larutan cmc 0,5% 3,0 ml/200 g bb), Kontrol Positif = tikus yang diovariectomi (larutan natrium alendronat 0,18 mg/200 g bb), Dosis 1 = tikus yang diovariectomi (suspensi ekstrak etanol 70% buah kacang panjang 100 mg/200 g bb), Dosis 2 = tikus yang diovariectomi (suspensi ekstrak etanol 70% buah kacang panjang 200 mg/200 g bb), Dosis 3 = tikus yang diovariectomi (suspensi ekstrak etanol 70% buah kacang panjang 400 mg/200 g bb), Kelompok *sham* = tikus hanya dibedah tanpa ovariektomi (larutan cmc 0,5% 3,0 ml/200 g bb).

Dari data pada Tabel 4.2, dapat dilihat bahwa berat uterus kelompok kontrol negatif adalah sebesar 0,058 g. Sedangkan untuk kontrol positif, berat uterusnya adalah 0,056 g. Untuk kelompok dosis 1, dosis 2, dan dosis 3 secara berturut-turut berat uterusnya adalah 0,062 g, 0,065 g, dan 0,047 g. Dan kelompok *sham* memiliki berat uterus sebesar 0,214 g. Dari data tersebut, dapat dilihat bahwa kelompok yang mengalami ovariektomi memiliki berat uterus yang lebih kecil daripada kelompok yang tidak mengalami ovariektomi seperti pada kelompok *sham*, yaitu 0,214 g. Dibandingkan dengan kontrol negatif (0,058 g), kelompok yang mendapatkan ekstrak etanol buah kacang panjang memiliki berat uterus yang lebih besar walaupun secara statistik perbedaan yang ada tidak bermakna secara signifikan. Berat uterus pada kelompok yang mendapatkan ekstrak etanol buah kacang panjang terlihat meningkat sejalan dengan

peningkatan dosis yaitu 0,062 g untuk dosis pertama dan 0,065 g untuk dosis kedua, namun terjadi penurunan pada dosis yang ketiga (0,047 g).

Kelompok kontrol negatif merupakan kelompok yang diovariektomi dan hanya mendapatkan CMC 0,5%. Ovarium pada kelompok kontrol negatif telah diangkat sehingga berdampak pada terjadinya penurunan kadar hormon estrogen dalam tubuh tikus tersebut. Selain itu, kelompok ini tidak mendapatkan asupan fitoestrogen seperti yang diperoleh oleh kelompok dosis. Penurunan kadar hormon estrogen ini menyebabkan dinding uterus menjadi tipis, sehingga berat basah uterus juga menjadi kecil yaitu sekitar 0,058 g. Ovariectomi juga menyebabkan kelompok ini tidak pernah mengalami fase estrus, yaitu fase dimana kadar estrogen dalam tubuh tinggi sehingga dinding uterus menebal.

Kelompok kontrol positif merupakan kelompok yang diovariektomi dan mendapatkan natrium alendronat. Mekanisme kerja natrium alendronat adalah menghambat resorpsi tulang normal dan abnormal dengan cara meningkatkan apoptosis sel osteoklas. Karena natrium alendronat bukanlah hormon yang dapat menggantikan estrogen yang hilang akibat pengangkatan ovarium, maka tidak terjadi peningkatan berat basah uterus seperti halnya yang terjadi pada kelompok dosis. Berat basah uterus pada kelompok ini hanya sebesar 0,056 g.

Kelompok dosis merupakan kelompok tikus yang diovariektomi dan mendapatkan ekstrak etanol. Ekstrak etanol yang diberikan memiliki tiga variasi dosis, yaitu 100 mg, 200 mg, dan 400 mg/200 g BB tikus. Seperti yang terlihat pada Tabel 4.2 kelompok dosis ini mengalami kenaikan berat uterus meskipun tidak sebesar kelompok *sham* (0,214 g). Hal ini menunjukkan bahwa kandungan fitoestrogen pada ekstrak etanol kacang panjang dapat menggantikan hormon estrogen yang bekerja pada pembentukan dinding uterus. Namun, pada dosis ketiga (400 mg/200 g BB tikus), terjadi penurunan berat uterus (0,047 g). Hal ini disebabkan karena kandungan flavonoid ekstrak etanolik kacang panjang dapat menghambat atau menstimulasi proliferasi sel karena mempunyai aktivitas estrogenik dan antiestrogenik secara *dose dependent* (Han, Denison, Tachibana, Yamada, 2002)..

Pada kelompok *sham* (0,214 g) terlihat perbedaan berat uterus yang secara statistik bermakna jika dibandingkan dengan lima kelompok lainnya. Kelompok

**Universitas Indonesia**

*sham* merupakan kelompok yang mengalami pembedahan namun tidak mengalami proses pengangkatan ovarium. Berat uterus yang lebih besar daripada kelompok lain dikarenakan kelompok ini tidak mengalami penurunan hormon estrogen dalam tubuhnya sehingga pembentukan dinding uterusnya tidak mengalami penghambatan.

Berdasarkan analisis statistik, data berat uterus setelah dilogkan untuk semua kelompok pada masing-masing hari pengujian menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen. Namun, pada uji ANAVA, nilai sig.  $<0,05$ . Untuk itu, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), untuk menentukan apakah terdapat perbedaan bermakna atau tidak pada masing-masing hari pengujian. Hasil dari uji statistik pengukuran berat basah uterus dapat dilihat pada Lampiran 2.



**Gambar 4.2** Perbandingan besar uterus antara kelompok *sham* (kiri) dengan kontrol negatif (kanan)

Dari data berat basah uterus di atas dapat disimpulkan bahwa proses ovariectomi yang dilakukan peneliti berhasil karena dari berat basah uterus masing-masing kelompok dapat terlihat bahwa kelompok ovariectomi memiliki berat uterus yang lebih kecil dibandingkan dengan kelompok *sham* (0,214 g). Kelompok dosis juga memiliki berat uterus yang lebih besar dibandingkan dengan kontrol negatif, kecuali kelompok dosis 3 (0,047 g). Tidak terdapatnya perbedaan yang bermakna antara kelompok dosis dengan dengan kelompok kontrol negatif disebabkan karena secara umum, fitoestrogen bekerja sebagai *selective estrogen*

*receptor modulators* (SERMs), yaitu mampu memberikan efek estrogenik dan/atau efek anti estrogenik. Pada jaringan reproduksi (kelenjar mammae, ovarium, endometrium dan prostat), fitoestrogen bekerja sebagai anti estrogen, sedangkan aktivitas estrogeniknya nyata pada tulang (Pawitan, 2002).

#### 4.7 Pengukuran Berat Badan Tikus

Selain dari berat uterus, berhasil tidaknya proses ovariektomi juga dapat dilihat dari berat badan. Ovariektomi akan menyebabkan peningkatan berat badan, *abdominal fat*, kolesterol serum total, dan trigliserida (Picherit et al., 2000). Hal ini dikarenakan kehilangan estrogen dapat menurunkan katabolisme lemak sehingga simpanan lemak meningkat (Akiles, 2008).

**Tabel 4.4** Perbandingan rata-rata berat badan awal dan akhir semua kelompok dan rata-rata berat badan perlakuan selama 28 hari serta persentase kenaikannya

Kelompok	BERAT BADAN (g) ( Rata-rata $\pm$ SD)		Kenaikan (%)	BERAT BADAN (g) (Rata-rata $\pm$ SD)
	AWAL	AKHIR		
Kontrol Negatif	143,983 $\pm$ 7,048	181,6 $\pm$ 7,718	26,126	161,388 $\pm$ 6,041
Kontrol Positif	131,783 $\pm$ 19,04	160,65 $\pm$ 16,344	21,791	147,227 $\pm$ 17,312
Dosis 1	129,814 $\pm$ 14,362	131,3 $\pm$ 23,081	25,047	149,977 $\pm$ 15,521
Dosis 2	142,8 $\pm$ 17,293	173,9 $\pm$ 20,611	21,779	164,998 $\pm$ 6,788
Dosis 3	133,683 $\pm$ 14,341	164,283 $\pm$ 15,367	22,89	147,761 $\pm$ 4,904
Kelompok <i>Sham</i>	115,567 $\pm$ 23,872	139,883 $\pm$ 27,940	21,041	128,049 $\pm$ 5,767

Keterangan: Kontrol Negatif = tikus yang diovariectomi (larutan cmc 0,5% 3,0 ml/200 g bb), Kontrol Positif = tikus yang diovariectomi (larutan natrium alendronat 0,18 mg/200 g bb), Dosis 1 = tikus yang diovariectomi (suspensi ekstrak etanol 70% buah kacang panjang 100 mg/200 g bb), Dosis 2 = tikus yang diovariectomi (suspensi ekstrak etanol 70% buah kacang panjang 200 mg/200 g bb), Dosis 3 = tikus yang diovariectomi (suspensi ekstrak etanol 70% buah kacang panjang 400 mg/200 g bb), Kelompok *sham* = tikus hanya dibedah tanpa ovariektomi (larutan cmc 0,5% 3,0 ml/200 g bb).

Dari tabel di atas, dapat kita lihat bahwa kelompok pertama atau kelompok kontrol negatif memiliki persentase kenaikan berat badan yang paling besar di antara kelompok yang lain yaitu sebesar 26,126% dengan rata-rata berat badan sebesar 161,388 g. Hal ini sesuai dengan penelitian yang menyatakan bahwa ovariektomi akan menyebabkan peningkatan berat badan, *abdominal fat*, kolesterol serum total, dan trigliserida (Picherit et. al., 2000) dikarenakan kehilangan estrogen dapat menurunkan katabolisme lemak sehingga simpanan lemak meningkat (Akiles, 2008). Kelompok yang memiliki perbedaan rata-rata berat badan yang bermakna signifikan secara statistik terhadap kelompok kontrol negatif adalah kelompok *sham*, yaitu dengan kenaikan berat badan sebesar 21,041% dan berat badan rata-rata 128,049 g.

Kelompok kontrol positif mengalami sedikit kenaikan berat badan, yaitu sebesar 21,791% dengan berat badan rata-rata sebesar 147,227g. Kelompok ini diberikan natrium alendronat yang bukan termasuk golongan hormon sehingga tidak dapat menggantikan estrogen yang hilang. Hal inilah yang menyebabkan kelompok kontrol positif ini tidak mengalami kenaikan berat badan. Secara statistik, kelompok ini tidak memiliki perbedaan rata-rata berat badan yang bermakna secara statistik dengan kelima kelompok lainnya.

Kelompok dosis mengalami kenaikan berat badan secara berturut-turut dari dosis 1 (100 mg/200 g BB tikus), dosis 2 (200 mg/200 g BB tikus), dan dosis 3 (400 mg/200 g BB tikus) sebesar 25,047, 21,779, 22,89% serta rata-rata berat badan secara berturut-turut 149,977 g, 164,998g, dan 147,761 g. Kenaikan dan rata-rata berat badan ini lebih besar jika dibandingkan dengan kelompok *sham* (21,041% dan 128,049 g) dan kelompok kontrol positif (21,791% dan 147,227g), kecuali kenaikan berat badan kontrol positif (21,791%) dengan dosis 2 (21,779%). Namun, kenaikan berat badan serta rata-rata berat badan yang ada tidak sebesar

yang terjadi pada kelompok kontrol negatif (26,126% dan 161,388 g). Hal ini disebabkan karena kelompok ini mendapatkan asupan fitoestrogen dari ekstrak etanol buah kacang panjang. Sehingga walaupun mengalami ovariektomi, berat badan kelompok ini tetap lebih kecil daripada kelompok kontrol negatif (26,126%). Secara statistik, kelompok yang memiliki perbedaan berat rata-rata yang bermakna signifikan terhadap ketiga kelompok dosis ini adalah kelompok *sham* dengan berat badan rata-rata sebesar 128,049 g dan kenaikan berat badan sebesar 21,041%.

Kelompok *sham* adalah kelompok yang paling sedikit mengalami kenaikan berat badan yaitu sebesar 21,041% dengan rata-rata berat badan sebesar 128,049 g. Hal ini disebabkan karena kelompok *sham* tidak mengalami ovariektomi. Secara statistik, kelompok ini memiliki perbedaan rata-rata berat badan yang signifikan jika dibandingkan dengan keempat kelompok lainnya, yaitu kontrol negatif (161,388 g), dosis 1 (149,977 g), dosis 2 (164,998g), dan dosis 3 (147,761 g).

Berdasarkan analisis statistik, data rata-rata berat badan untuk semua kelompok pada masing-masing hari pengujian menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen. Namun, pada uji ANAVA, nilai sig. <0,05. Untuk itu, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), untuk menentukan apakah terdapat perbedaan bermakna atau tidak pada masing-masing hari pengujian. Hasil dari analisis statistik dapat dilihat pada Lampiran 3.

#### **4.8 Uji Efek Antiosteoporosis**

Pemberian ekstrak etanol buah kacang panjang dilakukan dengan membuat suspensi ekstrak etanol buah kacang panjang dalam CMC 0,5%. Suspensi ekstrak etanol buah kacang panjang ini dibuat dalam tiga konsentrasi, yaitu 33,33 mg/ml, 66,67 mg/ml, dan 133,33 mg/ml sehingga volume maksimal yang diperoleh oleh setiap tikus adalah 3,0 ml. Volume ini merupakan volume pemberian oral yang masih diperbolehkan karena volume maksimal untuk pemberian secara oral adalah 5,0 ml.

Pada hari ke-29, tikus dikorbankan dengan menggunakan eter. Selanjutnya dilakukan pembedahan pada bagian kaki belakang untuk mengambil tulangnya.

**Universitas Indonesia**

Pembedahan dilakukan dengan cara menggunting kulit secara mid sagital pada bagian kaki. Lalu guntingan tersebut dilanjutkan hingga seluruh kulit pada bagian kaki terlepas. Kemudian dilanjutkan dengan menggunting otot sama seperti menggunting kulit hingga bagian tulang tibianya terlihat. Tulang tibia diangkat dengan cara menggunting bagian sendi, namun harus berhati-hati agar tidak merusak bagian trabekularnya. Lalu tulang tibia dipotong dan diambil bagian trabekularnya.



**Gambar 4.3** Tulang Trabekular Tikus yang Telah Diisolasi

#### **4.9 Perhitungan Jumlah Osteoklas**

Pada penelitian ini, parameter yang akan diamati adalah sel osteoklas. Proses ovariektomi mengakibatkan turunnya produksi estrogen secara drastis. Hal ini akan mempengaruhi kondisi tulang karena defisiensi estrogen menyebabkan terjadinya osteoklastogenesis dan terjadi kehilangan massa tulang (Bell & Norman, 2003). Selain itu, terhadap apoptosis sel osteoklas, secara tidak langsung estrogen merangsang osteoblas untuk memproduksi TGF- $\beta$ , yang selanjutnya TGF- $\beta$  ini menginduksi sel osteoklas untuk lebih cepat mengalami apoptosis (Oursler, 2003).

Hasil histologi yang diperoleh diamati dengan menggunakan mikroskop optik. Dari hasil histologi, diperoleh data jumlah sel osteoklas masing-masing kelompok sebagai berikut.

**Tabel 4.7** Rata-rata jumlah osteoklas tikus masing-masing kelompok per mm<sup>2</sup>.

<b>KELOMPOK</b>	<b>JUMLAH OSTEOKLAS( PER MM<sup>2</sup> ) RATA-RATA ± SD</b>
Kontrol Negatif	5217,241 ± 741,264
Kontrol Positif	3057,787 ± 656,588
Dosis 1	1364,775 ± 195,069
Dosis 2	2241,513 ± 229,886
Dosis 3	2176,37 ± 334,8421
Kelompok <i>Sham</i>	3809,277 ± 556,607

Keterangan: Kontrol Negatif = tikus yang diovariectomi (larutan cmc 0,5% 3,0 ml/200 g bb), Kontrol Positif = tikus yang diovariectomi (larutan natrium alendronat 0,18 mg/200 g bb), Dosis 1 = tikus yang diovariectomi (suspensi ekstrak etanol 70% buah kacang panjang 100 mg/200 g bb), Dosis 2 = tikus yang diovariectomi (suspensi ekstrak etanol 70% buah kacang panjang 200 mg/200 g bb), Dosis 3 = tikus yang diovariectomi (suspensi ekstrak etanol 70% buah kacang panjang 400 mg/200 g bb), Kelompok *sham* = tikus hanya dibedah tanpa ovariektomi (larutan cmc 0,5% 3,0 ml/200 g bb).

Dari tabel 4.7 di atas, dapat dilihat bahwa jumlah rata-rata osteoklas per mm<sup>2</sup> berturut-turut dari yang terkecil adalah Dosis 1 (100 mg/200 g BB tikus), yaitu sebanyak 1364,775 buah, Dosis 3 (400 mg/200 g BB tikus) yaitu sebanyak 2176,37 buah Dosis 2 (200 mg/200 g BB tikus) yaitu sebanyak 2241,513 buah, *sham* yaitu sebanyak 3809,277 buah, kontrol positif yaitu sebanyak 3057,787 buah, dan yang terbanyak adalah kontrol negatif yaitu sebanyak 5217,241 buah.

Kelompok kontrol negatif memiliki jumlah osteoklas yang lebih banyak dibandingkan dengan kelompok yang lain yaitu sebanyak 5217,241 buah per mm<sup>2</sup>. Secara statistik, kelompok ini memiliki perbedaan yang bermakna signifikan dengan kelima kelompok lainnya. Banyaknya jumlah osteoklas pada kelompok ini dikarenakan terjadinya penurunan kadar hormon estrogen dalam tubuh tikus. Hormon estrogen seharusnya dapat mempercepat apoptosis dari sel osteoklas. Selain itu, kelompok ini tidak mendapatkan asupan fitoestrogen, sehingga tidak ada yang menggantikan hormon estrogen yang hilang.

Sementara itu, pada kelompok kontrol positif terlihat jumlah osteoklas yang lebih sedikit jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yaitu dengan rata-rata 3057,787 buah per mm<sup>2</sup>. Secara statistik, nilai rata-rata dari

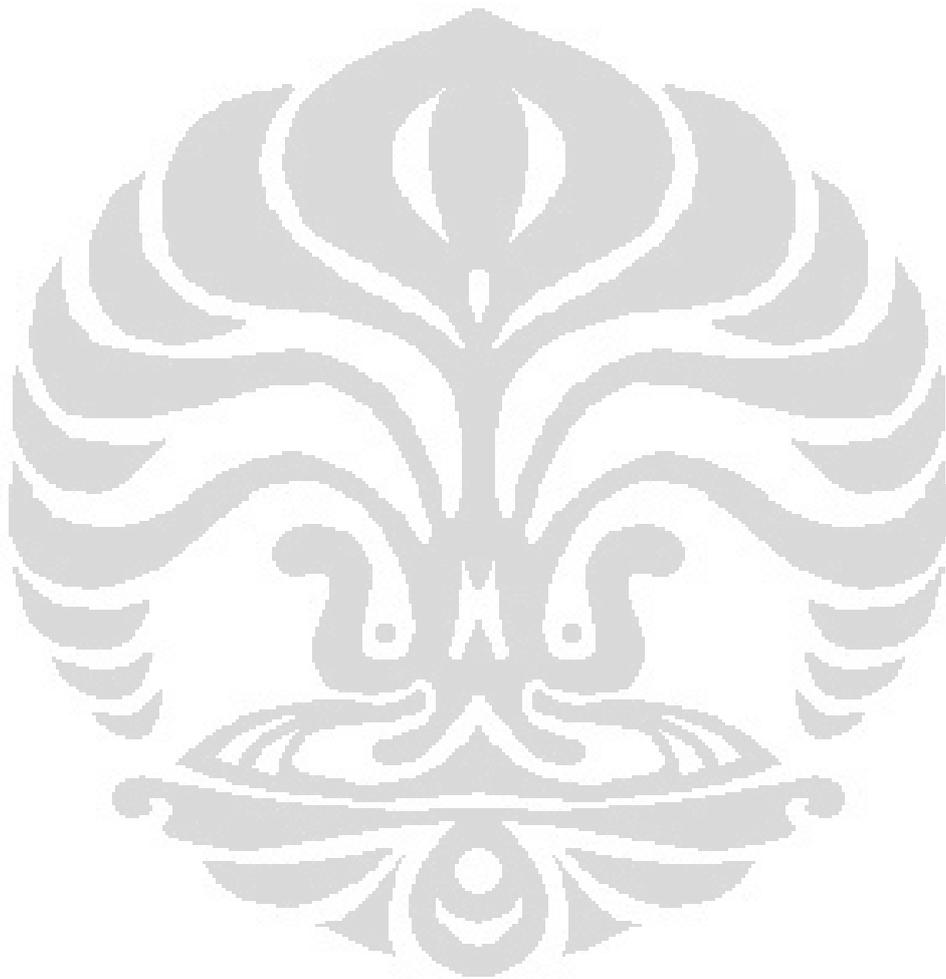
jumlah osteoklas kelompok kontrol positif ini memiliki perbedaan yang bermakna signifikan dengan kelompok kontrol negatif (5217,241 buah per mm<sup>2</sup>), kelompok Dosis 1 (1364,775 buah per mm<sup>2</sup>), kelompok Dosis 2 (2241,513 buah per mm<sup>2</sup>), dan kelompok Dosis 3 (2176,37 buah per mm<sup>2</sup>), namun tidak terdapat perbedaan yang bermakna signifikan dengan kelompok *sham* (3809,277 buah per mm<sup>2</sup>). Hal ini menunjukkan bahwa natrium alendronat yang digunakan sebagai kontrol positif memberikan efek yang cukup baik sehingga dapat memberikan hasil yang baik pula, yaitu jumlah osteoklas yang mendekati normal meskipun tikus-tikus tersebut mengalami ovariektomi.

Pada kelompok dosis terlihat jumlah osteoklas yang lebih sedikit dibandingkan dengan tiga kelompok lainnya, yaitu berturut-turut dari Dosis 1, Dosis 2, dan Dosis 3 adalah 1364,775 buah per mm<sup>2</sup>, 2241,513 buah per mm<sup>2</sup>, dan 2176,37 buah per mm<sup>2</sup>. Kelompok dosis 1 merupakan kelompok yang paling efektif karena memiliki jumlah osteoklas yang paling kecil (1364,775 buah per mm<sup>2</sup>). Secara statistik, kelompok Dosis 1 memiliki perbedaan yang bermakna signifikan dengan kelima kelompok lainnya. Kelompok dosis 2 (2241,513 buah per mm<sup>2</sup>) secara statistik memiliki perbedaan yang bermakna signifikan dengan kelompok kontrol negatif (5217,241 buah per mm<sup>2</sup>), kontrol positif (3057,787 buah per mm<sup>2</sup>), Dosis 1 (1364,775 buah per mm<sup>2</sup>), dan *sham* (3809,277 buah per mm<sup>2</sup>), namun tidak memiliki perbedaan yang bermakna signifikan dengan kelompok Dosis 3 (2176,37 buah per mm<sup>2</sup>). Hal ini dikarenakan dalam jumlah besar, fitoestrogen dapat bersifat sebagai antiestrogen (Mei et al., 2001).

Berdasarkan analisis statistik, data rata-rata jumlah osteoklas untuk semua kelompok pada masing-masing hari pengujian setelah dilogkan menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen. Namun, pada uji ANAVA, nilai sig. <0,05. Untuk itu, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), untuk menentukan apakah terdapat perbedaan bermakna atau tidak pada masing-masing hari pengujian. Hasil analisis statistik dapat dilihat pada Lampiran 4.

Dari jumlah rata-rata sel osteoklas yang terdapat dalam Tabel 4.7 dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 70% buah kacang panjang dapat bekerja sebagai agen antiosteoporosis pada wanita pascamenopause. Dosis optimum dari

ekstrak etanol 70% buah kacang panjang ini adalah pada dosis 1, yaitu 100 mg/200 g BB tikus.



## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan:

1. Ekstrak etanol 70% buah kacang panjang (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) memiliki efek antiosteoporosis dilihat dari penurunan jumlah osteoklas pada *growth plate* tulang tikus yang diovariectomi.
2. Ekstrak etanol 70% buah kacang panjang (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) menunjukkan efek antiosteoporosis optimum pada dosis 1 (100 mg/200 g BB tikus)

#### 5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk uji efek antiosteoporosis ekstrak etanol 70% kacang panjang dengan lama pemberian ekstrak kurang dari 28 hari untuk mengetahui besarnya efek antiosteoporosis sebelum hari ke 28.
2. Perlu dilakukan pewarnaan yang lebih lanjut untuk mengkonfirmasi jumlah osteoklas yang aktif, contohnya dengan pewarnaan TRAP (Tartrate-resistant Acid Phosphatase)

## DAFTAR ACUAN

- Akiles, A., J., U., (2008). *Efektivitas Pemberian Tepung Kedelai dan Tepung Kedelai terhadap Kinerja Uterus Tikus Ovariectomi*. Bogor: Tesis S-2 Sekolah Pascasarjana IPB.
- Anderson, J.J.B. (1996). Calcium, phosphorus and human bone development. *J Nutr* 126:1153S-1158S.
- Anggraini, W. (2008). *Fitoestrogen sebagai Alternative Alami Terapi Sulih Hormone untuk Pengobatan Osteoporosis Primer pada Wanita Pascamenopause*. Vol.231, 25-31.
- Arini, S., Nurmawan, D., Alfiani, F., Hertiana, T. *Daya Antioksidan dan Kadar Flavonoid Hasil Ekstraksi Etanol-Air Daging Buah Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa (Scheff))*. Buletin Penalaran Mahasiswa UGM Vol. 10 No. 01.
- Bell & Norman H., (2003). RANK Ligand and The Regulation of Skeletal Remodeling. *J Clin Invest* Vol 111, 1120-1122.
- Bahtiar, A. et al. (2009). Identification of a novel L-Serine Analog that Suppresses Osteoclastogenesis in Vitro and Bone Turn Over in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* Vol.16, 207-213.
- Banks, W.J. (1993). *Applied veterinary histology*. 3<sup>rd</sup> Ed. Mosby Year Book. Toronto 107-126.
- Benassayag, C., Perrot-Aplanat, M., Ferre, F. (2002). Phytoestrogen as Modulators of Steroid Action in Target Cells, *J. Chrom. B*, 777, 233-248.
- Branca, F. (2003). *Dietary Phyto-Oestrogens and Bone Health*. Proceedings of the Nutrition Society, 877-887
- Bustamam, N. (2008). *Fitoestrogen dan Kesehatan Tulang*. Bina Wijaya Vol 19, No 3, 146-150.
- Calvo, M.S., Park, Y.K. (1996). Changing phosphorus content of the U.S. Diet : potential for adverse effects on bone. *J Nutr* 126:1168 S-1180S.
- Carola R., Harley J. P., Nobac C. R. (1990). *Human anatomy and physiology*. McGraw-Hill Publishing Inc. hlm.148-162.
- Cesnjaj M, Stavljenic A, Vukicevic S. (1991). In vivo models in the study of osteopenias. *Eur J Clin Chem & Clin Biochem* 29(4),221-229.

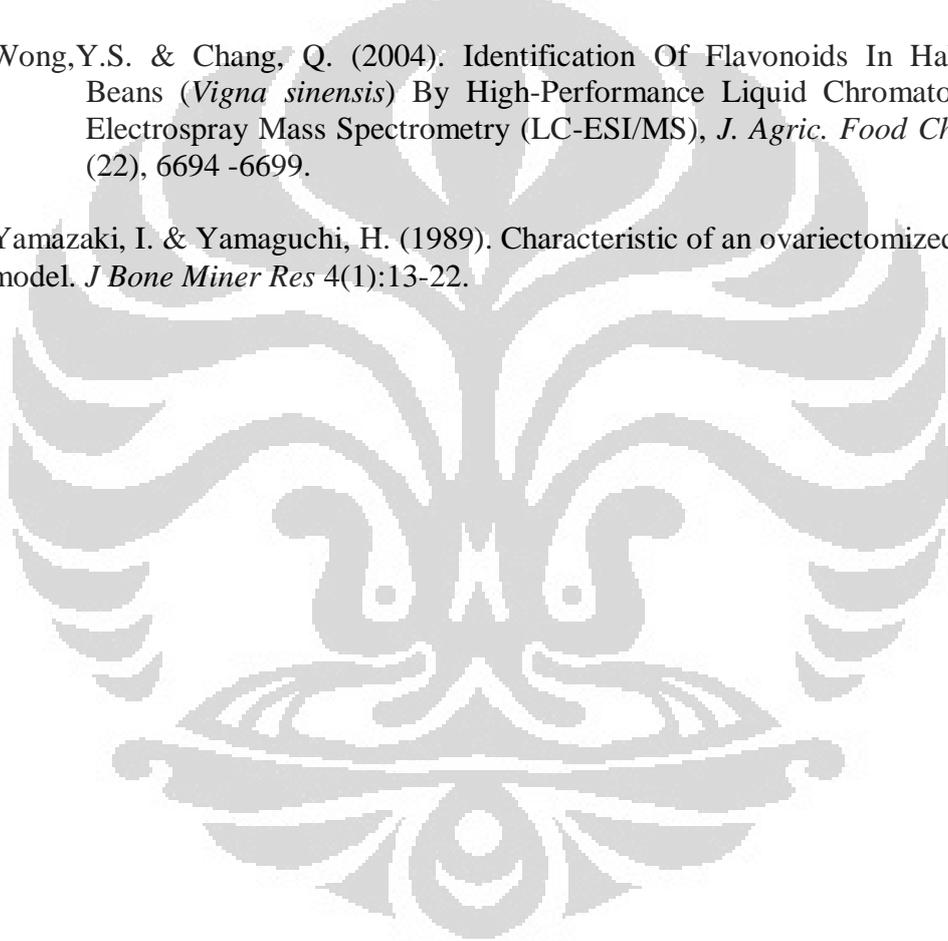
- Dahlan, M. S. (2009). *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan, ed 4*. Jakarta : Salemba Medika.
- Dalley, D.L., *Basic Histological Techniques*. 17 Januari 2012. <http://faculty.ncwc.edu/ddaley/B408%20Basic%20Histo%20Tech.htm>
- Dawson-Hughes, B., (1996). Calcium and Vitamin D Nutritional Needs of Elderly Women. *J. Nutr.* 126, 165S-1167S.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Bakti Husada, 13-18.
- Devareddy L., Hooshmand S., Collins J. K., Lucas E. A., Chai S. C., Arjmandi B. H. (2008). Blueberry prevents bone loss in ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Nutr Biochem* 10, 694-699.
- Einhorn. (1996). Cellular control of bone homeostasis. In *Mishell's Textbook of infertility, Contraception and Reproductive Endocrinology*. 4<sup>th</sup> Ed. New York: Blackwell Science, 8-16.
- Ek-Rylanders, B., Floress, M., Wendels, M., Heinegards, D., and Anderssons, G. (1994). Dephosphorylation of Osteopontin and Bone Sialoprotein by Osteoclastic Tartrate-resistant Acid Phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 269, No. 21, 14853-14856.
- Epstein, S. et al., (2005). Disintegration and Esophageal Irritation Profiles of Alendronate Formulations: Implications for Clinical Safety and Efficacy. *The Journal of Applied Research*, Vol. 5, No. 2, 253-265.
- Erickson E.F., Kasem L., Aarhus. (1992). *The cellular basis of bone remodeling*. Triangle. 45-57.
- Ettinger B. et al., (1999). Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. *JAMA* ; 282:637-645.
- Faridin. (2001). *Prevalensi dan Beberapa Faktor Resiko Osteoporosis di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar*, Makassar : 1-3.
- Federer, W.T. (1991). *Statistics and society : data collection and interpretation 2<sup>nd</sup> ed*. New York : Marcel Dekker
- Fitriasari, A. et al. (2007). *Efek Proliteratif Ekstrak Etanolik Kacang Panjang Pada Sel T47D*. PHARMACON, Vol. 8, No. 2, 44-50

- Ganong W.F. (1995). *Fisiologi kedokteran*. Andrianto P, penerjemah; Oswari J, editor. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- H., Yuehuei & Martin, K. L. (2008). *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*, Humana. New Jersey : 278-282.
- Hammett-Stabler, C.A. (2004). *Osteoporosis from Pathophysiology to Treatment*. Washington, American Assosiation for Clinical Chemistry Press, 1–86.
- Han, D.H., Denison, M.S., Tachibana, H., and Yamada, K. (2002). Relationship between Estrogen Receptor-Binding and Estrogenic Activities of Enviromental Estrogens and Suppression by Flavonoids, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66 (7), 1479–1487.
- Handri & Rafira. (2003). *Mempercantik Diri dengan Buah dan Sayur, Pikiran Rakyat Cyber Media*.
- Humason, G.L. (1967). *Animal Tissue Techniques*. San Fransisco: W. H. Freeman and Company, 4-66.
- Hutapea, J.R. (1994). *Inventaris Tanaman Obat Indonesia (III)*, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan, Jakarta.
- Isbagio, H. (1995). *Cermin Dunia Kedokteran* Nomor 101, Jakarta : 54.
- Jusman, S. W. & Halim, A. (2009). Oxidative stress in liver tissue of rat induced by chronic systemic hypoxia. *Makara kesehatan*, 13 (1), 34-38.
- Kawiyana, S. (2009). Interleukin-6 yang Tinggi sebagai Faktor Resiko terhadap Kejadian Osteoporosis pada Wanita Pascamenopause Defisiensi Estrogen. *Jurnal Penyakit Dalam* Vol 10, No 1.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. (2012). *Berdiri Tegak, Bicara Lantang, Kalahkan Osteoporosis*. 21 Juni 2012.  
<http://depkes.go.id/index.php/berita/press-release/404-berdiri-tegak-bicara-lantang-kalahkan-osteoporosis.pdf>
- Kenemans, P., R. Barentsen, P. Weijer. (1995). *Practical HRT*. Ed. 1st Medicom Europe BV.
- Kleerekoper, M. & Avioli. (1993). *Evaluation and Treatment of Postmenopausal Osteoporosis, dalam Premier on the Metabolism Bone Diseases and Disorders of mineral Metabolism*, Edisi 2. Raven Press, New York: 223-228.
- Lasota A, D.-K. D. (2004). Experimental osteoporosis- different methods. *Annales Academiae Medicae Bialostocensis* , 129-131.

- Leeson R. C., Leeson T. S., Paparo A. A. (1996). *Buku ajar histologi. Edisi VII Tambayong et al.* Jakarta. TextBook of Histology. Terjemahan. hlm.132-158.
- Manogalas, S.C., & Jilka, R.L. (1995). Bone Marrow, Cytokines, and Bone Remodelling. *The New England Journal of Medicine*. Vol 332, No 5, 305-311.
- Marcus, R., Feldman, D., Kelsey, J. (1996). *Osteoporosis*. New York: Academic Press.
- Marshall, J. K., Rainsford, K. D., James, C., Hunt, R. H. (2000). *A Randomized Controlled Trial to Assess Alendronate-Associated Injury of the Upper Gastrointestinal Tract*. *Aliment Pharmacol Ther*, 1451-1457.
- Masyitha, D., *Struktur Mikroskopik Tulang Mandibula pada Tikus Ovariectomi dan Pemberian Pakan Rasio Fosfat/Kalsium Tinggi*. *Media Kedokteran Hewan*, Vol 22, No 2.
- Meiyanto E, Handayani, Jenie R.I. (2008). *Ekstrak Etanolik Kacang Panjang (Vigna sinensis (L.)Savi Ex Hasssk) Meningkatkan Proliferasi Sel Epitel Payudara* . *Majalah Farmasi Indonesia* Vol 19 (4), 191-197.
- Miller L. C., Weaver D. S., McAllister J. A., Koritnik D. R. (1986). *Effect of ovariectomy on vertebral trabecular bone in the cynomolgus monkey (Macaca fascicularis)*. *Calcif Tissue Int* 38:62-65.
- Mizuno, K., A. Suzuki, Y. Ino, Y. Asada, F. Kikkawa, dan Y. Tomoda. (1995). *Postmenopausal Bone Loss in Japanese Women*. *Int. J. Gynecol. Obstet*. 50, 33 -39.
- Muhilal, S.A. (2004). *Angka kecukupan gizi vitamin larut lemak*. Widyakarya Nasional Pangan dan Gizi VIII, Jakarta.
- Nurrochmad, A., Leviana, F. Wulancarsari, C. G., Lukitaningsih, E. (2010). *Phytoestrogens of Pachyrhizus erosus prevent Bone Loss in an Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis*. *International Journal of Phytomedicine* 2, 363-372.
- Oursler, M.J. (2003). *Direct and Indirect Effect of Estrogen on Osteoclast*. *J Musculoskel Nueron Interact*, Vol 394, 363-366
- Ott S.M. (1990). *Attainment of peak bone mass*. *J Clin Endocrin Metab* 323(2), 73– 79.
- Pawitan, J. A. (2002). *Phytoestrogens-Protection Against a Wide Range of Diseases*. *Medical Progress*, Vol 1, 9-13.

- Pertawarman, A. & Hestiantoro, A. (2002). *Manfaat Isoflavon pada Wanita Menopause*. Majalah Obstet Ginekol Indonesia, Vol 26 1, 49-55.
- Picherit C. et al. (2000). Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr* 130:1675–1681.
- Pilsakova, I., Rieicansky, I., Jagla, F. (2010). *The Physiological Actions of Isoflavone Phytoestrogens*. *Physiological Research* 59, 651-664.
- Poulsen, R.C. & Kruger, M.C. *Soy Phytoestrogens: Impact on Postmenopausal Bone Loss and Mechanisms of Action*. *Nutrition Reviews®* Vol. 66, 359–374.
- Puzas, V.E. (1993). The osteoblast. Di dalam: *Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism*. Favas MJ, editor. 2<sup>nd</sup> Ed. Raven Press Ltd. hlm.15-20.
- Roeshadi, D., *Osteoporosis Ditinjau dari Segi Aktifitas Seluler, dalam Naskah Lengkap Simposium Osteoporosis Up-Date*. Denpasar, Bali : 7 November 1994, 1–13.
- Sabri, M. (2000). Pengaruh suplemen rebon dan vitamin D3 terhadap struktur tulang dan kelenjar paratiroid pada tikus penderita osteoporosis buatan. [Thesis]. Pascasarjana UGM, Yogyakarta.
- Scarano A., Iezzi G., Piattelli, A. (2008). Decalcification of Bone Tissue. In H., Yuehuei & Martin, K. L, *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage* (p. Totowa). New Jersey: Humana Press
- Sennang A. N., Mutmainnah, R.D.N. Pakasi, Hardjoeno. (2006). Analisis Kadar Osteokalsin Serum Osteopenia dan Osteoporosis. *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*, Vol. 12, No. 2, 49 dan 52.
- Shirwaikar, A., Khan, S., Malini, S. (2003). Antiosteoporotic effect of ethanol extract of *Cissus quadrangularis* Linn. on ovariectomized rat. *J Ethnopharmacol* 89: 245-250.
- Skinner, R. A. (2008). Decalcification of Bone Tissue. In H., Yuehuei & Martin, K. L, *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage* (p. Totowa). New Jersey: Humana Press.
- Smith, R. (1993). *Bone physiology and the osteoporotic process*. *Resp Med* 87 (Suppl A):3-7.
- Stevenson, J.S. & M.S Marsh. (1992). *An Atlas of Osteoporosis*, Parthenon Publishing Group, New Jersey, USA.

- Sudoyo, Setiyohardi, Alwi, Simadibrata, Setiati. (2006). *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Jilid II. Edisi IV. Jakarta : FKUI.
- Sylvia, A.P., & Lorraine, M.W. (1995). *Konsep Klinis Proses-proses Penyakit*. Buku II. Edisi IV. Jakarta : EGC.
- Telford I. R. & Bridgman C. F. ( 1995). *Indroduction to functional histology*. 2<sup>nd</sup> Ed. Harper Collins Colloge Publishers. hlm.103-119.
- United States Department of Agriculture. (2000). PLANTS Profile for *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Juni, 14, 2012. <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=VIUN>
- Wong, Y.S. & Chang, Q. (2004). Identification Of Flavonoids In Hakmeitau Beans (*Vigna sinensis*) By High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry (LC-ESI/MS), *J. Agric. Food Chem.*, 52 (22), 6694 -6699.
- Yamazaki, I. & Yamaguchi, H. (1989). Characteristic of an ovariectomized rat model. *J Bone Miner Res* 4(1):13-22.

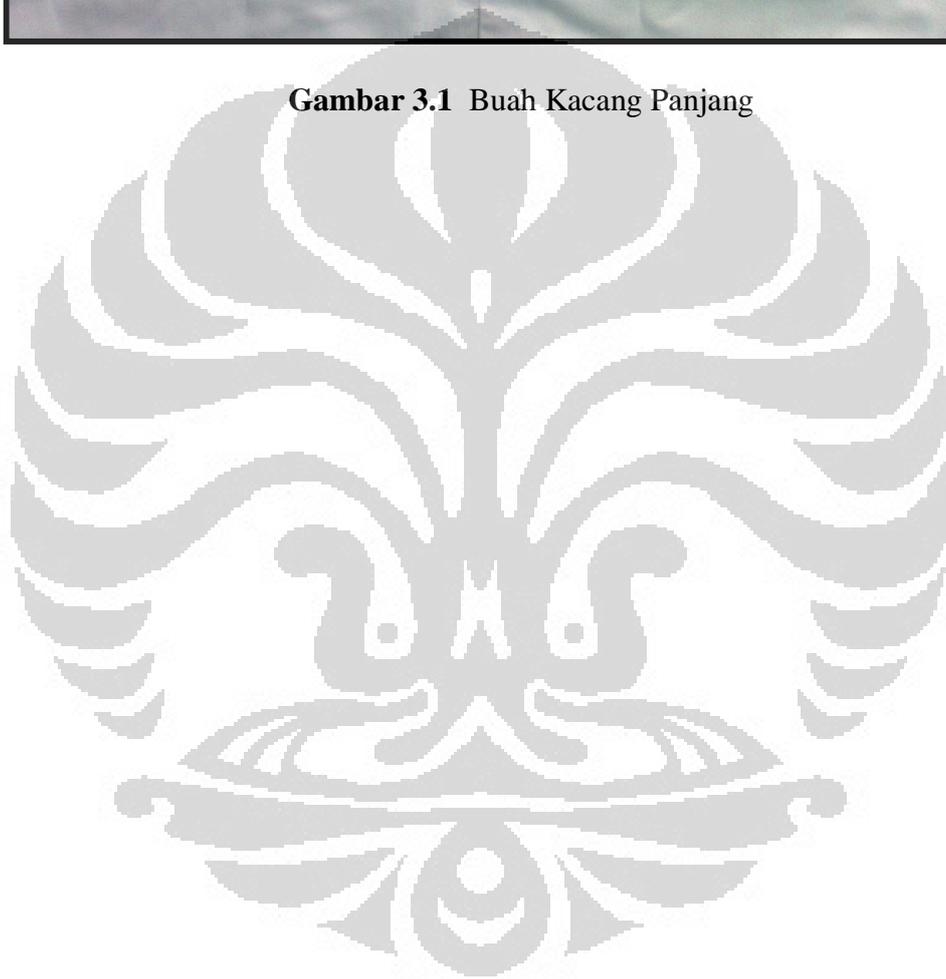


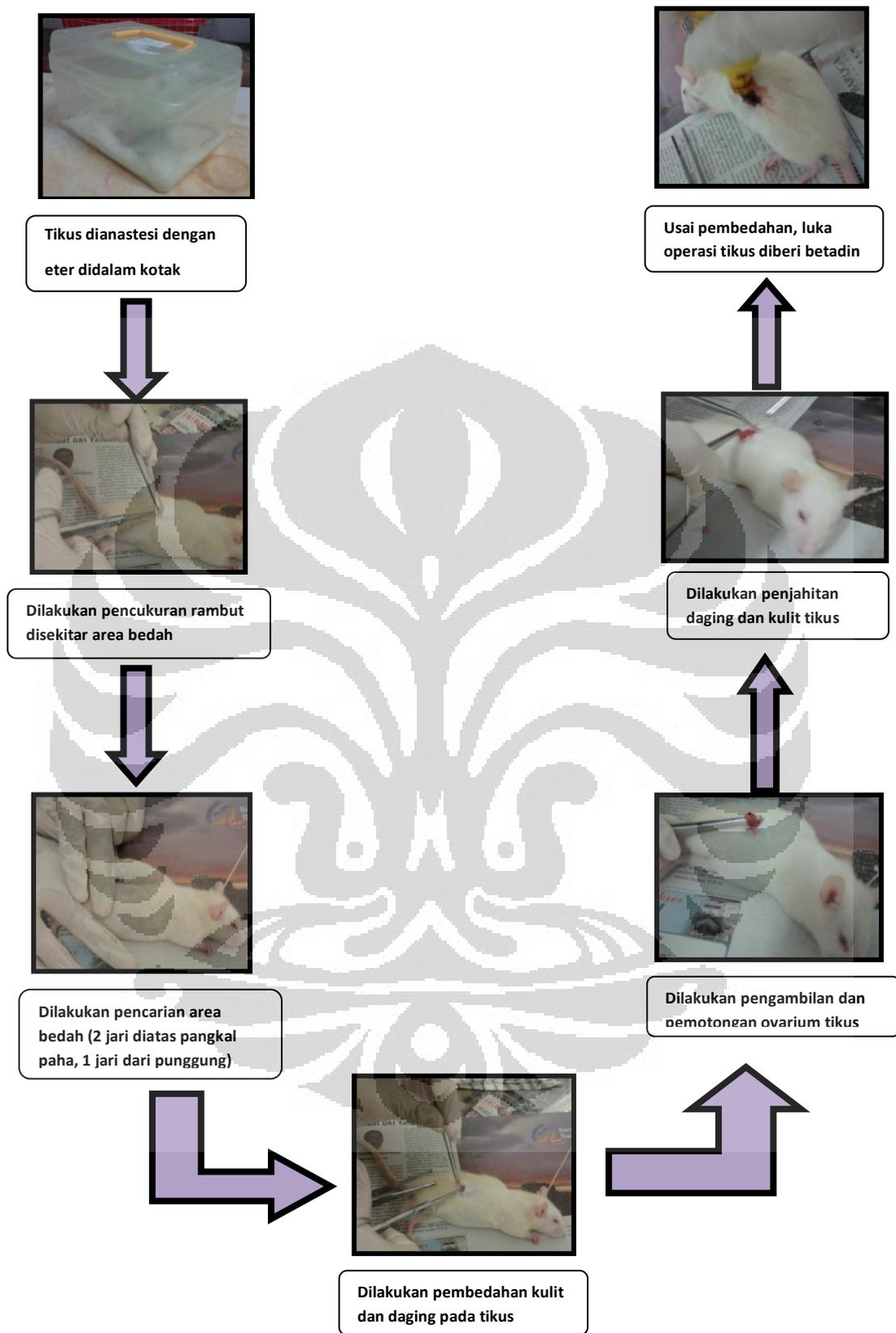
# GAMBAR





**Gambar 3.1** Buah Kacang Panjang





**Gambar 3.2** Prosedur Ovariektomi



**Gambar 3.3** Proses Dekalsifikasi Tulang Trabekular Menggunakan Larutan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  dengan Pengadukan Konstan



**Gambar 3.4** Oven yang digunakan untuk infiltrasi



**Gambar 3.5** Mikrotom yang Digunakan untuk Memotong Preparat Tulang dengan ketebalan 5-7 Mikron



**Gambar 3.6** Alat Pemanas dalam Histologi



Keterangan : Tanda panah berwarna hitam menunjukkan sel osteoklas

**Gambar 4.4** Preparat Histologi Tulang Tikus Kontrol Negatif dengan Menggunakan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin, Pengamatan dengan Mikroskopi Optik, Perbesaran 100x



Keterangan : Tanda panah berwarna hitam menunjukkan sel osteoklas

**Gambar 4.5** Preparat Histologi Tulang Tikus Kontrol Positif dengan Menggunakan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin, Pengamatan dengan Mikroskopi Optik, Perbesaran 100x



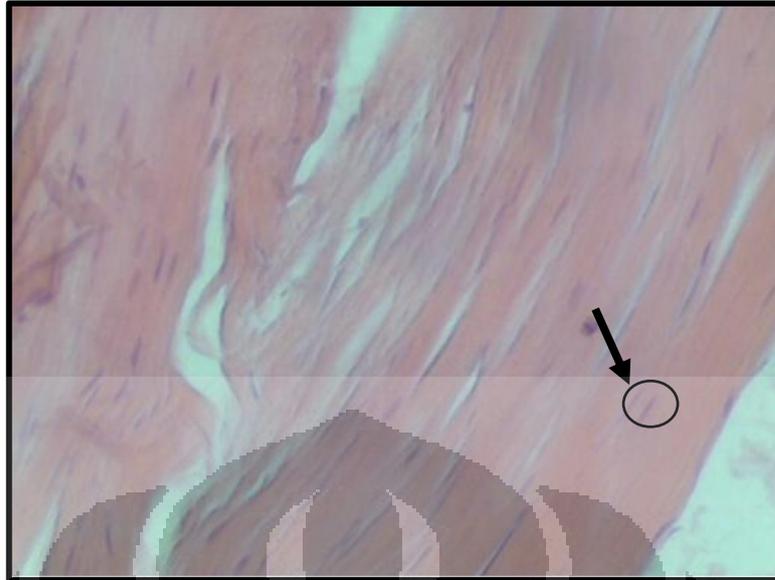
Keterangan : Tanda panah berwarna hitam menunjukkan sel osteoklas

**Gambar 4.6** Preparat Histologi Tulang Tikus Dosis 1 dengan Menggunakan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin, Pengamatan dengan Mikroskopi Optik, Perbesaran 100x



Keterangan : Tanda panah berwarna hitam menunjukkan sel osteoklas

**Gambar 4.7** Preparat Histologi Tulang Tikus Dosis 2 dengan Menggunakan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin, Pengamatan dengan Mikroskopi Optik, Perbesaran 100x



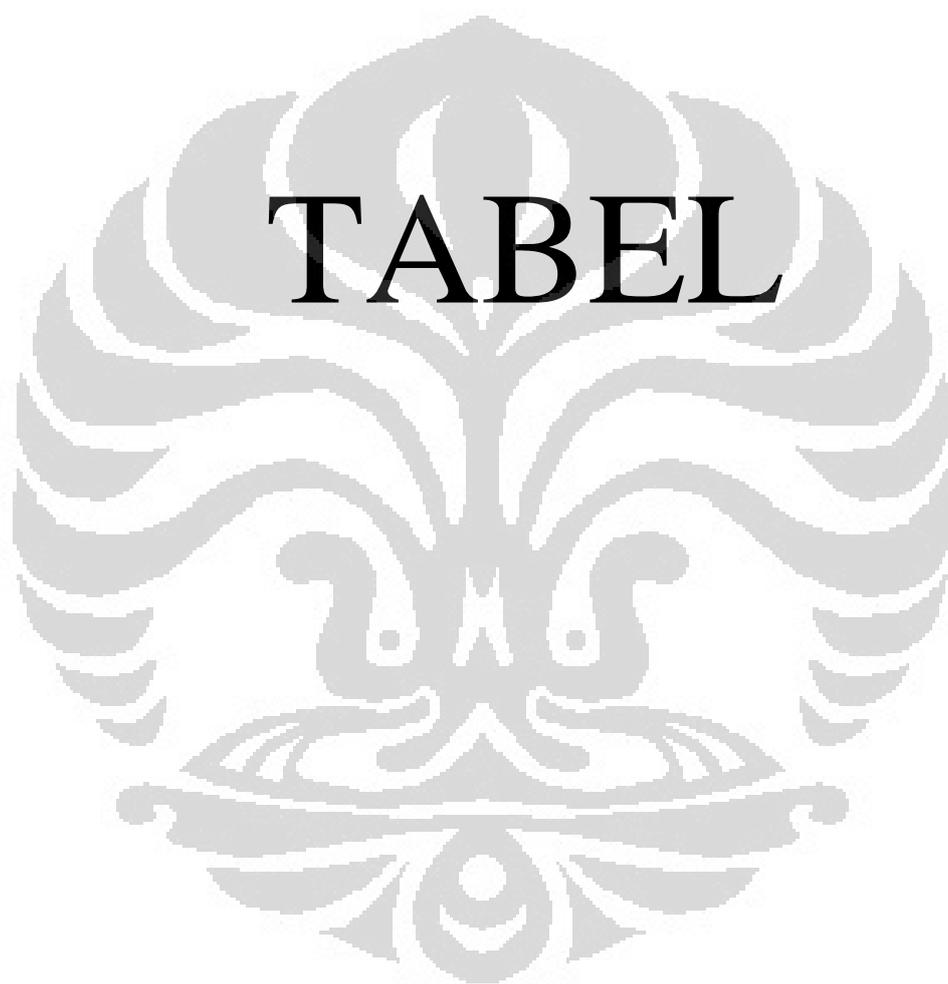
Keterangan : Tanda panah berwarna hitam menunjukkan sel osteoklas

**Gambar 4.8** Preparat Histologi Tulang Tikus Dosis 3 dengan Menggunakan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin, Pengamatan dengan Mikroskopi Optik, Perbesaran 100x



Keterangan : Tanda panah berwarna hitam menunjukkan sel osteoklas

**Gambar 4.9** Preparat Histologi Tulang Tikus Kelompok *sham* dengan Menggunakan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin, Pengamatan dengan Mikroskopi Optik, Perbesaran 100x



**Tabel 4.3** Berat uterus semua kelompok setelah hari ke-28

Kontrol Negatif	Kontrol Positif	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3	Kontrol Normal
0.0708 g	0.0563 g	0.0778 g	0.1031 g	0.0775 g	0.3163 g
0.0503 g	0.1047 g	0.0443 g	0.0454 g	0.0544 g	0.0962 g
0.0798 g	0.0474 g	0.0699 g	0.0609 g	0.0457 g	0.2949 g
0.0465 g	0.0353 g	0.0395 g	0.0577 g	0.0267 g	0.3002 g
0.0401 g	0.0389 g	0.0792 g	0.0853 g	0.0388 g	0.0692 g
	0.0542 g		0.0374 g	0.0404 g	0.2064 g

Keterangan: Kontrol Negatif = tikus yang diovariectomi (larutan cmc 0,5% 3,0 ml/200 gram bb), Kontrol Positif = tikus yang diovariectomi (larutan natrium alendronat 0,18 mg/200 gram bb), Dosis 1 = tikus yang diovariectomi (suspensi ekstrak etanol 70% buah kacang panjang 100 mg/200 gram bb), Dosis 2 = tikus yang diovariectomi (suspensi ekstrak etanol 70% buah kacang panjang 200 mg/200 gram bb), Dosis 3 = tikus yang diovariectomi (suspensi ekstrak etanol 70% buah kacang panjang 400 mg/200 gram bb), Kelompok *sham* = tikus hanya dibedah tanpa ovariektomi (larutan cmc 0,5% 3,0 ml/200 gram bb).

**Tabel 4.5** Berat Badan Rata-Rata Masing-Masing Tikus Selama 28 Hari pada Semua Kelompok

N (Ulangan Tikus)	Rataan Berat Badan Tikus (gram)					
	Kontrol Normal	Kontrol Negatif	Dosis I	Dosis II	Dosis III	Kontrol Positif
1	167.4	151.1179	163.9857	168.35	145.9143	177.675
2	116.1143	169.8679	128.2393	164.925	161.325	143.4357
3	132.5179	162.7714	145.8786	155.3	137.5	128.4786
4	138.05	161.8679	143.5607	163.2286	166.7357	139.5571
5	124.8786	162.5607	146.6214	175.7429	148.7071	138.5429
6	89.33571	160.1429	171.575	162.4393	126.3821	155.675

Keterangan: Kontrol Negatif = tikus yang diovariectomi (larutan cmc 0,5% 3,0 ml/200 gram bb), Kontrol Positif = tikus yang diovariectomi (larutan natrium alendronat 0,18 mg/200 gram bb), Dosis 1 = tikus yang diovariectomi (suspensi ekstrak etanol 70% buah kacang panjang 100 mg/200 gram bb), Dosis 2 = tikus yang diovariectomi (suspensi ekstrak etanol 70% buah kacang panjang 200 mg/200 gram bb), Dosis 3 = tikus yang diovariectomi (suspensi ekstrak etanol 70% buah kacang panjang 400 mg/200 gram bb), Kelompok *sham* = tikus hanya dibedah tanpa ovariektomi (larutan cmc 0,5% 3,0 ml/200 gram bb).

**Tabel 4.6** Jumlah Osteoklas Masing-Masing Tikus Semua Kelompok per 38.590 mikron<sup>2</sup>

<b>Kontrol Negatif</b>	<b>Kontrol Positif</b>	<b>Dosis 1</b>	<b>Dosis 2</b>	<b>Dosis 3</b>	<b>Kontrol Normal</b>
216	86	60	84	91	143
210	101	61	84	59	124
244	127	53	81	76	108
197	104	54	89	88	120
176	136	46	78	65	167
165	154	42	103	84	147

Keterangan: Kontrol Negatif = tikus yang diovariectomi (larutan cmc 0,5% 3,0 ml/200 gram bb), Kontrol Positif = tikus yang diovariectomi (larutan natrium alendronat 0,18 mg/200 gram bb), Dosis 1 = tikus yang diovariectomi (suspensi ekstrak etanol 70% buah kacang panjang 100 mg/200 gram bb), Dosis 2 = tikus yang diovariectomi (suspensi ekstrak etanol 70% buah kacang panjang 200 mg/200 gram bb), Dosis 3 = tikus yang diovariectomi (suspensi ekstrak etanol 70% buah kacang panjang 400 mg/200 gram bb), Kelompok *sham* = tikus hanya dibedah tanpa ovariektomi (larutan cmc 0,5% 3,0 ml/200 gram bb).

# LAMPIRAN



## Lampiran 1. Penentuan dosis dan pembuatan bahan uji

### 1.1 Penentuan dosis dan pembuatan larutan natrium alendronat

Dosis Natrium alendronat yang biasa digunakan adalah 10 mg/hari atau 70 mg/minggu (Epstein, S., *et al.* 2005). Pada penelitian ini, digunakan dosis 10 mg/hari. Jika dikonversi ke dosis tikus, maka dosis harian yang akan diberikan ke tikus adalah  $10 \text{ mg} \times 0,018 = 0,18 \text{ mg}/200 \text{ g BB tikus/hari}$ .

Dalam 3 ml larutan mengandung 0,18 mg natrium alendronat.

Sehingga diperlukan larutan dengan konsentrasi 0,18 mg/3 ml atau setara dengan 0,06 mg/ml.

Untuk membuat larutan alendronat dengan konsentrasi 0,06 mg/ml, ditimbang sebanyak 17,64 mg serbuk Alendronat kemudian dilarutkan dalam aquadest dan dicukupkan volumenya hingga 294 ml.

### 1.2 Penentuan dosis dan jumlah ekstrak buah kacang panjang serta CMC

Dosis ekstrak kental kacang panjang yang digunakan berdasarkan penelitian terdahulu adalah 1000mg/kg BB tikus. Dosis ini setara dengan 200 mg/200 mg BB tikus (Meiyanto, Handayani dan Jenie, 2008). Dalam penelitian ini digunakan variasi dosis untuk mengetahui dosis optimumnya. Variasi dosis yang digunakan adalah:

1. 100 mg/200 mg BB tikus
2. 200 mg/200 mg BB tikus
3. 400 mg/200 mg BB tikus.

Jumlah ekstrak dan CMC yang dibutuhkan setiap hari:

#### a. Untuk dosis 1

$100 \text{ mg}/200 \text{ mg BB tikus} \times 6 \text{ ekor tikus} = 600 \text{ mg ekstrak}$

Dibuat dalam suspensi dengan konsentrasi 33,33 mg/ml.

$600 \text{ mg}/33,33 \text{ mg/ml} = 18 \text{ ml}$

Jadi untuk dosis 1, diperlukan 600 mg ekstrak dalam 18 ml CMC 0,5%

(lanjutan)

b. Untuk dosis 2

$200 \text{ mg}/200 \text{ mg BB tikus} \times 6 \text{ ekor tikus} = 1200 \text{ mg ekstrak}$

Dibuat dalam suspensi dengan konsentrasi 66,67 mg/ml.

$1200 \text{ mg}/66,67 \text{ mg/ml} = 18 \text{ ml}$

Jadi untuk dosis 2, diperlukan 1200 mg ekstrak dalam 18 ml CMC 0,5%

c. Untuk dosis 3

$400 \text{ mg}/200 \text{ mg BB tikus} \times 6 \text{ ekor tikus} = 2400 \text{ mg ekstrak}$

Dibuat dalam suspensi dengan konsentrasi 133,33 mg/ml.

$2400 \text{ mg}/133,33 \text{ mg/ml} = 18 \text{ ml}$

Jadi untuk dosis 3, diperlukan 2400 mg ekstrak dalam 18 ml CMC 0,5%.

d. Untuk kontrol negatif dan kelompok *sham*

Masing-masing tikus mendapat 3 ml CMC 0,5%/200 g BB.

$3 \text{ ml} \times 12 \text{ ekor tikus} = 36 \text{ ml CMC 0,5\%}$

Jadi total larutan CMC 0,5% yang diperlukan setiap hari adalah :

$18 \text{ ml} + 18 \text{ ml} + 18 \text{ ml} + 36 \text{ ml} = 90 \text{ ml} \sim 100 \text{ ml}$

e. Untuk membuat 100 ml larutan CMC 0,5%

$\frac{0,5 \text{ gr}}{100 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml} = 0,5 \text{ g CMC}$

## Lampiran 2. Uji statistik berat uterus semua kelompok

### 2.1 Uji normalitas (Uji Shapiro-Wilk) terhadap seluruh kelompok uji

a. Tujuan : untuk mengetahui kenormalan data sebagai syarat uji ANAVA

b. Hipotesis :

Ho = data berat uterus tikus berasal dari populasi yang terdistribusi normal

Ha = data berat uterus tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi normal

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil :

Kelompok	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Berat_Uterus Kontrol Negatif	.925	5	.560
Kontrol Positif	.897	6	.354
Dosis 1	.824	5	.125
Dosis 2	.969	6	.885
Dosis 3	.981	6	.956
Kelompok Sham	.822	6	.092

e. Kesimpulan : Ho diterima, berarti data berat uterus tikus terdistribusi normal.

### 2.2 Uji Homogenitas (Uji Levene) terhadap seluruh kelompok uji

a. Tujuan : untuk mengetahui homogenitas data sebagai syarat uji ANAVA

b. Hipotesis :

Ho = data berat uterus tikus berasal dari populasi yang terdistribusi homogen

Ha = data berat uterus tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi homogen

c. Kriteria Uji :

(lanjutan)

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil:

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.687	5	28	.170

e. Kesimpulan: Ho diterima, berarti data berat uterus tikus terdistribusi homogen.

### 2.3 Uji analisis varians satu arah terhadap seluruh kelompok uji

a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari berat uterus tikus tiap perlakuan

b. Hipotesis :

Ho = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap berat uterus tikus tiap kelompok perlakuan

Ha = Terdapat perbedaan yang bermakna berat uterus tikus tiap kelompok perlakuan

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil :

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.458	5	.292	8.637	.000
Within Groups	.946	28	.034		
Total	2.404	33			

(lanjutan)

- e. Kesimpulan:  $H_0$  ditolak, berarti terdapat perbedaan yang bermakna terhadap berat uterus tikus tiap kelompok perlakuan

#### 2.4 Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) terhadap seluruh kelompok uji

- a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna berat uterus tikus antara enam kelompok perlakuan
- b. Hipotesis :
- $H_0$  = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap berat uterus tikus antara enam kelompok perlakuan
- $H_a$  = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap berat uterus tikus antara enam kelompok perlakuan
- c. Kriteria Uji :
- Sig.  $< 0,05$  berarti  $H_0$  ditolak
- Sig.  $> 0,05$  berarti  $H_0$  diterima
- d. Hasil:

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	.0251808	.823	-.202761	.253122
	Dosis 1	-.0305963	.794	-.268673	.207481
	Dosis 2	-.0418144	.710	-.269756	.186127
	Dosis 3	.0937501	.407	-.134191	.321692
	Kelompok Sham	-.5193556*	.000	-.747297	-.291414
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	-.0251808	.823	-.253122	.202761
	Dosis 1	-.0557771	.620	-.283719	.172164
	Dosis 2	-.0669952	.533	-.284329	.150338

(lanjutan)

	Dosis 3	.0685693	.523	-.148764	.285903
	Kelompok Sham	-.5445364*	.000	-.761870	-.327203
Dosis 1	Kontrol Negatif	.0305963	.794	-.207481	.268673
	Kontrol Positif	.0557771	.620	-.172164	.283719
	Dosis 2	-.0112182	.920	-.239160	.216723
	Dosis 3	.1243464	.273	-.103595	.352288
	Kelompok Sham	-.4887594*	.000	-.716701	-.260818
Dosis 2	Kontrol Negatif	.0418144	.710	-.186127	.269756
	Kontrol Positif	.0669952	.533	-.150338	.284329
	Dosis 1	.0112182	.920	-.216723	.239160
	Dosis 3	.1355645	.212	-.081769	.352898
	Kelompok Sham	-.4775412*	.000	-.694875	-.260208
Dosis 3	Kontrol Negatif	-.0937501	.407	-.321692	.134191
	Kontrol Positif	-.0685693	.523	-.285903	.148764
	Dosis 1	-.1243464	.273	-.352288	.103595
	Dosis 2	-.1355645	.212	-.352898	.081769
	Kelompok Sham	-.6131057*	.000	-.830439	-.395772
Kelompok Sham	Kontrol Negatif	.5193556*	.000	.291414	.747297
	Kontrol Positif	.5445364*	.000	.327203	.761870
	Dosis 1	.4887594*	.000	.260818	.716701

(lanjutan)

Dosis 2	.4775412*	.000	.260208	.694875
Dosis 3	.6131057*	.000	.395772	.830439

- e. Kesimpulan:  $H_0$  ditolak pada perbandingan antara kelompok kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya. Hal ini berarti terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol normal dengan kelima kelompok lainnya. Namun, tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kontrol positif, kontrol negatif dan ketiga kelompok dosis.



### Lampiran 3. Uji statistik berat badan semua kelompok

#### 3.1 Uji normalitas (Uji Shapiro-Wilk) terhadap seluruh kelompok uji

a. Tujuan : untuk mengetahui kenormalan data sebagai syarat uji ANAVA

b. Hipotesis :

Ho = data berat badan tikus berasal dari populasi yang terdistribusi normal

Ha = data berat badan tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi normal

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil :

Kelompok	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Berat_badan Kontrol Negatif	.906	6	.409
Kontrol Positif	.903	6	.391
Dosis 1	.941	6	.666
Dosis 2	.970	6	.895
Dosis 3	.973	6	.914
Kelompok sham	.980	6	.949

e. Kesimpulan : Ho diterima, berarti data berat badan tikus terdistribusi normal.

#### 3.2 Uji Homogenitas (Uji Levene) terhadap seluruh kelompok uji

a. Tujuan : untuk mengetahui homogenitas data sebagai syarat uji ANAVA

b. Hipotesis :

Ho = data berat badan tikus berasal dari populasi yang terdistribusi homogen

Ha = data berat badan tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi homogen

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

(lanjutan)

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil:

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.827	5	30	.138

e. Kesimpulan: Ho diterima, berarti data berat badan tikus terdistribusi homogen.

### 3.3 Uji analisis varians satu arah terhadap seluruh kelompok uji

a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari berat badan tikus tiap perlakuan

b. Hipotesis :

Ho = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap bobot berat badan tikus tiap kelompok perlakuan

Ha = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap berat badan tikus tiap kelompok perlakuan

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil :

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5094.532	5	1018.906	4.051	.006
Within Groups	7546.286	30	251.543		
Total	12640.818	35			

e. Kesimpulan: Ho ditolak, berarti terdapat perbedaan yang bermakna terhadap berat badan tikus tiap kelompok perlakuan

### 3.4 Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) terhadap seluruh kelompok uji

a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna berat badan tikus antara enam kelompok perlakuan

b. Hipotesis :

(lanjutan)

Ho = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap berat badan tikus antara enam kelompok perlakuan

Ha = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap berat badan tikus antara enam kelompok perlakuan

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil:

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	14.160733	.132	-4.54002	32.86148
	Dosis 1	11.411333	.222	-7.28942	30.11208
	Dosis 2	-3.609517	.696	-22.31027	15.09123
	Dosis 3	13.627417	.147	-5.07333	32.32817
	Kelompok sham	33.338698*	.001	14.63795	52.03945
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	-14.160733	.132	-32.86148	4.54002
	Dosis 1	-2.749400	.766	-21.45015	15.95135
	Dosis 2	-17.770250	.062	-36.47100	.93050
	Dosis 3	-.533317	.954	-19.23407	18.16743
	Kelompok sham	19.177965*	.045	4.7721	37.87872
Dosis 1	Kontrol Negatif	-11.411333	.222	-30.11208	7.28942
	Kontrol Positif	2.749400	.766	-15.95135	21.45015
	Dosis 2	-15.020850	.111	-33.72160	3.67990
	Dosis 3	2.216083	.810	-16.48467	20.91683
	Kelompok sham	21.927365*	.023	3.22661	40.62812
Dosis 2	Kontrol Negatif	3.609517	.696	-15.09123	22.31027
	Kontrol Positif	17.770250	.062	-.93050	36.47100
	Dosis 1	15.020850	.111	-3.67990	33.72160
	Dosis 3	17.236933	.070	-1.46382	35.93768
	Kelompok sham	36.948215*	.000	18.24746	55.64897
Dosis 3	Kontrol Negatif	-13.627417	.147	-32.32817	5.07333
	Kontrol Positif	.533317	.954	-18.16743	19.23407
	Dosis 1	-2.216083	.810	-20.91683	16.48467
	Dosis 2	-17.236933	.070	-35.93768	1.46382
	Kelompok sham	19.711282*	.040	1.01053	38.41203

(lanjutan)

Kelompok sham	Kontrol Negatif	-33.338698*	.001	-52.03945	-14.63795
	Kontrol Positif	-19.177965*	.045	-37.87872	-.47721
	Dosis 1	-21.927365*	.023	-40.62812	-3.22661
	Dosis 2	-36.948215*	.000	-55.64897	-18.24746
	Dosis 3	-19.711282*	.040	-38.41203	-1.01053

- e. Kesimpulan:  $H_0$  ditolak pada perbandingan antara kelompok normal dengan kelima kelompok lainnya, kecuali kelompok kontrol positif. Hal ini berarti terdapat perbedaan bermakna antara kelompok normal dengan kelima kelompok lainnya, kecuali kelompok kontrol positif. Namun, tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kontrol positif, kontrol negatif dan ketiga kelompok dosis.

#### Lampiran 4. Uji statistik perhitungan osteoklas semua kelompok

##### 4.1 Uji normalitas (Uji Shapiro-Wilk) terhadap seluruh kelompok uji

a. Tujuan : untuk mengetahui kenormalan data sebagai syarat uji ANAVA

b. Hipotesis :

Ho = data jumlah osteoklas berasal dari populasi yang terdistribusi normal

Ha = data jumlah osteoklas berasal dari populasi yang tidak terdistribusi normal

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil :

Kelompok	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Jumlah_Osteoklas			
Kontrol Positif	.976	6	.933
Kontrol Negatif	.966	6	.861
Dosis 1	.923	6	.528
Dosis 2	.879	6	.263
Dosis 3	.910	6	.437
Kontrol Normal	.972	6	.906

e. Kesimpulan : Ho diterima, berarti data berat badan tikus terdistribusi normal.

##### 4.2 Uji Homogenitas (Uji Levene) terhadap seluruh kelompok uji

a. Tujuan : untuk mengetahui homogenitas data sebagai syarat uji ANAVA

b. Hipotesis :

Ho = data berat badan tikus berasal dari populasi yang terdistribusi homogen

Ha = data berat badan tikus berasal dari populasi yang tidak terdistribusi homogen

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

(lanjutan)

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil:

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.339	5	30	.275

e. Kesimpulan: Ho diterima, berarti data jumlah osteoklas terdistribusi homogen.

#### 4.3 Uji analisis varians satu arah terhadap seluruh kelompok uji

a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari jumlah osteoklas tiap perlakuan

b. Hipotesis :

Ho = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah osteoklas tiap kelompok perlakuan

Ha = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah osteoklas tiap kelompok perlakuan

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

d. Hasil :

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.245	5	.249	51.427	.000
Within Groups	.145	30	.005		
Total	1.391	35			

e. Kesimpulan: Ho ditolak, berarti terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah osteoklas tiap kelompok perlakuan

#### 4.4 Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) terhadap seluruh kelompok uji

a. Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna jumlah osteoklas antara enam kelompok perlakuan

b. Hipotesis :

(lanjutan)

Ho = Tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah osteoklas antara enam kelompok perlakuan

Ha = Terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah osteoklas antara enam kelompok perlakuan

c. Kriteria Uji :

Sig. < 0,05 berarti Ho ditolak

Sig. > 0,05 berarti Ho diterima

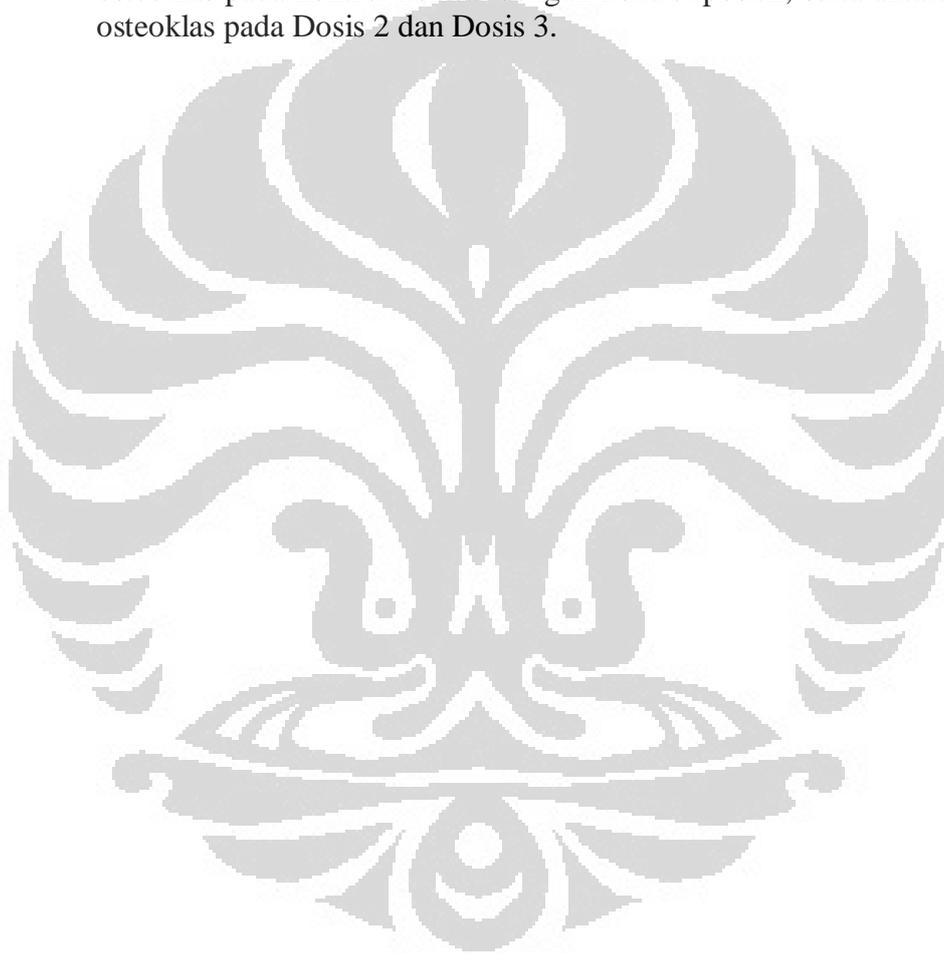
d. Hasil:

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Sig.	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	.23680153*	.000	.1547420	.3188611
	Dosis 1	.58256131*	.000	.5005018	.6646209
	Dosis 2	.36502671*	.000	.2829672	.4470863
	Dosis 3	.41819057*	.000	.3361310	.5002501
	Kontrol Normal	.17502153*	.000	.0929620	.2570811
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	-.23680153*	.000	-.3188611	-.1547420
	Dosis 1	.34575978*	.000	.2637002	.4278193
	Dosis 2	.12822518*	.003	.0461656	.2102847
	Dosis 3	.18138903*	.000	.0993295	.2634486
	Kontrol Normal	-.06178000	.135	-.1438396	.0202795
Dosis 1	Kontrol Negatif	-.58256131*	.000	-.6646209	-.5005018
	Kontrol Positif	-.34575978*	.000	-.4278193	-.2637002
	Dosis 2	-.21753460*	.000	-.2995942	-.1354750
	Dosis 3	-.16437075*	.000	-.2464303	-.0823112
	Kontrol Normal	-.40753978*	.000	-.4895993	-.3254802
Dosis 2	Kontrol Negatif	-.36502671*	.000	-.4470863	-.2829672
	Kontrol Positif	-.12822518*	.003	-.2102847	-.0461656
	Dosis 1	.21753460*	.000	.1354750	.2995942
	Dosis 3	.05316385	.196	-.0288957	.1352234
	Kontrol Normal	-.19000518*	.000	-.2720647	-.1079456
Dosis 3	Kontrol Negatif	-.41819057*	.000	-.5002501	-.3361310
	Kontrol Positif	-.18138903*	.000	-.2634486	-.0993295
	Dosis 1	.16437075*	.000	.0823112	.2464303
	Dosis 2	-.05316385	.196	-.1352234	.0288957
	Kontrol Normal	-.24316904*	.000	-.3252286	-.1611095
Kontrol Normal	Kontrol Negatif	-.17502153*	.000	-.2570811	-.0929620

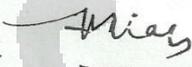
(lanjutan)

Kontrol Positif	.06178000	.135	-.0202795	.1438396
Dosis 1	.40753978*	.000	.3254802	.4895993
Dosis 2	.19000518*	.000	.1079456	.2720647
Dosis 3	.24316904*	.000	.1611095	.3252286

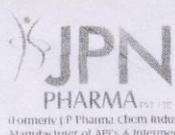
- e. Kesimpulan:  $H_0$  ditolak pada perbandingan antara kelompok kontrol normal dengan kelompok kontrol positif serta antara Dosis 2 dengan Dosis 3. Artinya tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara jumlah osteoklas pada kontrol normal dengan kontrol positif, serta antara jumlah osteoklas pada Dosis 2 dan Dosis 3.



## Lampiran 5. Sertifikat Hewan Uji

	<p align="center"> <b>BAGIAN PRODUKSI TERNAK DAGING KERJA DAN ANEKA TERNAK</b>  <b>DEPARTEMEN ILMU PRODUKSI DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN</b>  <b>FAKULTAS PETERNAKAN</b>  <b>INSTITUT PERTANIAN BOGOR</b> </p>
	<p align="center">           Sekretariat : Jl. Agatis, Kampus IPB, Dramaga, Bogor 16680            Telepon : (0251) 8624774, Fax. (0251) 8624774         </p>
<p><b><u>SURAT KETERANGAN</u></b></p>	
<p>Yang bertanda tangan di bawah ini:</p>	
<p>Nama</p>	<p>: Prof. Dr. Ir. Pollung H. Siagian, MS</p>
<p>Jabatan</p>	<p>: Kepala Bagian Produksi Ternak Daging Kerja Dan Aneka Ternak</p>
<p>Alamat</p>	<p>: Jl. Agatis kampus IPB Darmaga-Bogor Telp. 0251-8624774, Fax. 0251-8624774</p>
<p>Menyatakan bahwa tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) strain <i>Sprague Dawley</i> (SD) yang dikembangkan di Laboratorium Non Ruminansia dan Satwa Harapan, Fakultas Peternakan IPB, telah memenuhi syarat sebagai hewan uji untuk penelitian atau kegiatan praktikum.</p>	
<p>Demikian surat keterangan ini dibuat dengan sebenar-benarnya.</p>	
<p align="right">Kepala,</p>	
<p align="right">             _____         </p>	
<p align="right">           Prof. Dr. Ir. Pollung H. Siagian, MS            NIP. 19460825 197711 1 001         </p>	

**Lampiran 6. Sertifikat Natrium alendronat sebagai kontrol positif**

  
**JPN**  
**PHARMA**  
(formerly J.P. Pharma Chem Industries)  
 Manufacturer of APIs & Intermediates

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

MFG. LIC. NO.: -KD-634  
 Name of the Material:- ALENDRONATE SODIUM 3 H<sub>2</sub>O  
 Batch No. : - SA / 06 / 09  
 Batch Size:- 75.00 Kgs

A. R. No.: -IPC / 1254 / 09  
 Date : - 19 / 07 / 09  
 Mfg. Date: - JUL - 2009  
 Exp. Date: - JUN-2014

Test	Specification	Results
<b>Characters</b>	White crystalline powder. Soluble in water, very slightly soluble in methanol, practically insoluble in methylene chloride	White crystalline powder, Soluble in water, very slightly soluble in methanol, practically insoluble in methylene chloride
<b>Identification</b> A) IR B) Reaction of Sodium	A) IR Test passes B) Gives reaction (a) of Sodium	A) Complies B) Complies
<b>Appearance of Solution</b>	The solution should clear and not more intensely coloured than reference solution B7 or BY 7	Clear and colourless solution.
pH (1%w/v Solution in D/w.)	Limit between 4.0 to 5.0 (0.5 gm in 50 ml water)	4.53
<b>4 - Amino Butyric Acid (By T.L.C.)</b>	NMT 0.5%	Complies
<b>Phosphate and Phosphite (By H.PLC)</b>	NMT 0.5%	0.17 %
<b>Heavy Metals</b>	Max. 20 PPM	Complies
<b>Loss on drying (at 140° C to 145° C)</b>	Limit: 16.1% to 17.1%	16.33 %
<b>Assay (O.D. B.) (By H.P.L.C.) (By Titration)</b>	Limit: 98% to 102%	99.5%

**Remark:** - The Sample Complies w.r.t. Specification as per BP.

ANALYSED BY   
 Q.C. CHEMIST

  
 APPROVED BY  
 Q.C. INCHARGE

Office:  
 D-10, 3rd Floor, Main, Akash Building, Near Railway Station,  
 S.V. Road, Kandivali (West), Mumbai - 400 067, India  
 Tel: +91-22-2864 3481 / 2807 2382 Fax: +91-22-2864 0377  
 Plant:  
 1, 10th/109, MIDC, Karamba, Bhiwadi, Dist. Thane - 401 506,  
 Maharashtra, India  
 Tel: +91-2525 271290  
 Email: jpn@jpn.com, website: jpnpharma.com

## Lampiran 7. Surat determinasi tanaman kacang panjang



**LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA**  
 ( Indonesian Institute of Sciences )  
**PUSAT PENELITIAN BIOLOGI**  
 ( Research Center for Biology )  
 Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong  
 Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

---

Cibinong, 27 Februari 2012

Nomor : 253/IPH.1.02/If.8/II/2012  
 Lampiran : -  
 Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.  
 Bpk./Ibu/Sdr/ni, Melda Silviasari Silalahi  
 Mhs. Univ. Indonesia  
 Depok

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Kacang Panjang	<i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>unguiculata</i> (L.) Walp.	Fabaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani  
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,  
  
 Dr. Jerni Setijoe Rahajoe  
 NIP. 196705241993032004

D:\Ident 2012\Melda Silviasari Silalahi.doc\Wardi-DG

**Lampiran 8.** Skema kerja pelaksanaan uji antiosteoporosis