

Lampiran 1

Ovariectomi Hewan Coba

Tikus jenis *Rattus Norvegicus* betina usia 2-2,5 bulan dilakukan ovariectomi dengan cara insisi lewat punggung tikus coba setelah pembiusan. pembiusan dilakukan setelah penimbangan berat badan terakhir dengan menggunakan ether anaestheticum di dalam stoples pembiusan. Kurang lebih 2 menit tikus sudah tidak bergerak yang ditandai dengan mata meredup dan anggota badan tidak bergerak (Malole, 1989).

Ovarium diidentifikasi berupa jaringan berwarna merah muda tertutup lemak peritoneal berjumlah dua buah, kemudian saluran oviduknya ditutup dengan cara dikauterisasi dengan alat kauter, luka insisi dijahit dengan benang katun. Area operasi diolesi dengan alkohol sebagai desinfektan dan tikus harus dijaga kehangatan badannya sampai pulih dari pengaruh obat anestesia. Selama 5 hari berturut-turut, diambil hapusan vaginal dari tikus yang telah diovariectomi tadi untuk memastikan bahwa kedua ovarium telah terangkat sempurna. Tikus yang menunjukkan hapusan vaginal tahap estrus pada tiga hari terakhir harus dieksklusi dari percobaan ini karena tidak memenuhi syarat. Kemudian tikus ditunggu hingga mencapai hari ke tujuh (1 minggu) untuk mendapatkan keadaan seperti pada pasca menopause (Hatano et al 2001).

Lampiran 2

Frakturasi Hewan Coba

Frakturasi hewan coba adalah jenis fraktur transversal pada tulang tibia kanan sepertiga tengah ekstremitas inferiornya secara terbuka pada tikus yang telah dalam pembiusan (*open transverse fracture*) dengan membuat insisi anterior, kemudian mengidentifikasi tibia, dan selanjutnya dilakukan pemotongan tibia dengan gunting. Garis fraktur harus patah sempurna berupa garis fraktur transversal kompliit. Kemudian ekstremitas yang difrakturasi difiksasi dengan menggunakan *plaster cast of Paris* yang meliputi kedua sendi proksimal dan distal garis fraktur. Jaringan kalus pada tulang Tibia didapatkan setelah hewan coba dikorbankan dengan ether anaestheticum di dalam stoples pembiusan. (Malole, 1989).

ampiran 3

Pembuatan Sediaan Histologis Tulang

Langkah-langkah teknik pembuatan sediaan histologis tulang dengan teknik

parafin adalah sebagai berikut :

1. Fiksasi : larutan buffer formalin 10%
2. Proses dekalsifikasi: larutan asam nitrat 5%
3. Dehidrasi : larutan alkohol 80% selama 2 jam
larutan alkohol 90% selama 2 jam
larutan alkohol 95% selama 2 jam
larutan alkohol absolut I selama 1 jam
larutan alkohol absolut II selama 1 jam
4. *Clearing* : kloroform
5. Infiltrasi : parafin cair I selama 3 jam
parafin cair II selama 3 jam
6. *Embedding* : dicetak bentuk blok kemudian didinginkan selama 24 jam
7. *Trimming* : dikepris menjadi cetakan yang rapi
8. *Sectioning* : dilakukan pemotongan dengan mikrotom, tebal 5-6 mikron
9. *Mounting* : hasil potongan diletakkan diatas obyek gelas yang diberi *egg* albumin, dikeringkan dan sediaan siap untuk diwarnai

Langkah-langkah pewarnaan dengan Hematoksilin-Eosin adalah sebagai

berikut :

1. *Deparafinisasi* : teteskan larutan Xylol I selama 2 menit
teteskan larutan Xylol II selama 2 menit
teteskan larutan alkohol absolut I selama 1 menit
teteskan larutan alkohol absolut II selama 1 menit
teteskan larutan alkohol 95% I selama 1 menit
teteskan larutan alkohol 95% II selama 1 menit
teteskan aquadestilata selama 10 menit
2. *Staining* : larutan hematoksilin selama 15 menit
cuci dengan air mengalir 10 celupan
alkohol asam 3-10 celupan
cuci dengan air lagi
counterstain dengan eosin selama 1-2 menit
3. *Dehidrasi* : alkohol 95% selama beberapa celupan
alkohol absolut I selama 2 menit
alkohol absolut II selama 2 menit
4. *Clearing* : larutan Xylol I selama 2 menit
larutan Xylol II selama 2 menit
larutan Xylol III selama 2 menit
5. *Mounting* : dengan 1 tetes balsam Canada lalu ditutup dengan gelas penutup (*cover glass*) dan dibiarkan kering dalam suhu kamar

ampiran 4

Pengukuran Tebal Kalus

Pengukuran tebal kalus dilakukan pada Gambar preparat histologis tulang dengan menggunakan Gambar mikrometer okuler pada pembesaran yang sama.

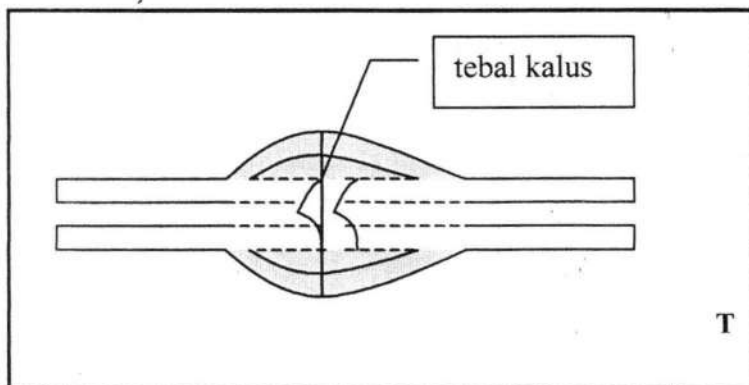
Preparat histologis tulang dan mikrometer okuler difoto dengan pembesaran 100x.

4.1 Tahap Pengukuran Tebal Kalus

Tahap-tahap pengukuran tebal kalus pada preparat histologis adalah sebagai berikut :

1. Mencari area tertebal dari penampang histologis tulang yang dipotong secara longitudinal sebagai pedoman untuk menentukan area pengukuran tebal tulang.
2. Menarik garis tegak lurus dari penampang memanjang tulang pada area tersebut dan meneruskan garis hingga pada sisi penampang yang berseberangan.
3. Garis yang diperpanjang dari area tertebal tersebut merupakan bagian tertebal dari bidang kalus pada sediaan tulang
4. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan graticule dan tegak lurus terhadap penampang tulang.
5. Apabila pada area pengukuran didapatkan jaringan yang pecah, maka jaringan tersebut diperhitungkan dalam pengukuran.
6. Penetapan nilai tebal tulang pada graticule dilakukan dengan bantuan mikroskop

Skema metode pengukuran tebal kalus yang dilakukan pada foto preparat histologis tulang dapat dilihat dibawah ini :



Gambar lampiran 1. Metode Pengukuran Tebal Kalus pada Foto Preparat Histologis Tulang

Lampiran 5

Fase Estrous Mencit

Siklus birahi pada mencit secara normal terbagi dalam empat periode. Masing-masing periode dan perubahan dari periode satu ke periode lainnya dapat diketahui dengan membuat sediaan ulas vagina, mengamati tingkah laku hewan tersebut, dan mengamati perubahan pada alat kelamin luarnya (Norris, 1980).

Periode itu adalah :

1. Periode Pro Estrous

Ditandai dengan perubahan tingkah laku pada mencit mulai dapat menerima pejantan walaupun belum melakukan kopulasi. Perubahan pada alat kelamin luar terlihat peningkatan peredaran darah di daerah tersebut dan epitel vagina menebal. Pada sediaan ulas vagina terdapat sel-sel epitel. Periode ini berlangsung sekitar 12 jam (Hafez, 1987).

2. Periode Estrous

Ditandai dengan penurunan aktifitas berlari, telinga gemetar, mau menerima pejantan. Perubahan pada alat kelamin luar, epitel vagina menebal, terdapat lapisan sel kornifikasi di atas permukaan vagina. Pada sediaan ulas vagina terdapat sel-sel kornifikasi. Periode ini berlangsung sekitar 9 – 15 jam (Hafez, 1987).

3. Periode Met Estrous

Ditandai dengan mencit betina tidak mau lagi menerima peantan. Perubahan pada alat kelamin luar terlihat lapisan kornifikasi yang terlepas dari mukosa vagina. Pada sediaan ulas vagina terdapat lendir kental, sel-sel kornifikasi dengan beberapa leukosit. Periode ini berlangsung sekitar 21 jam (Hafez, 1987).

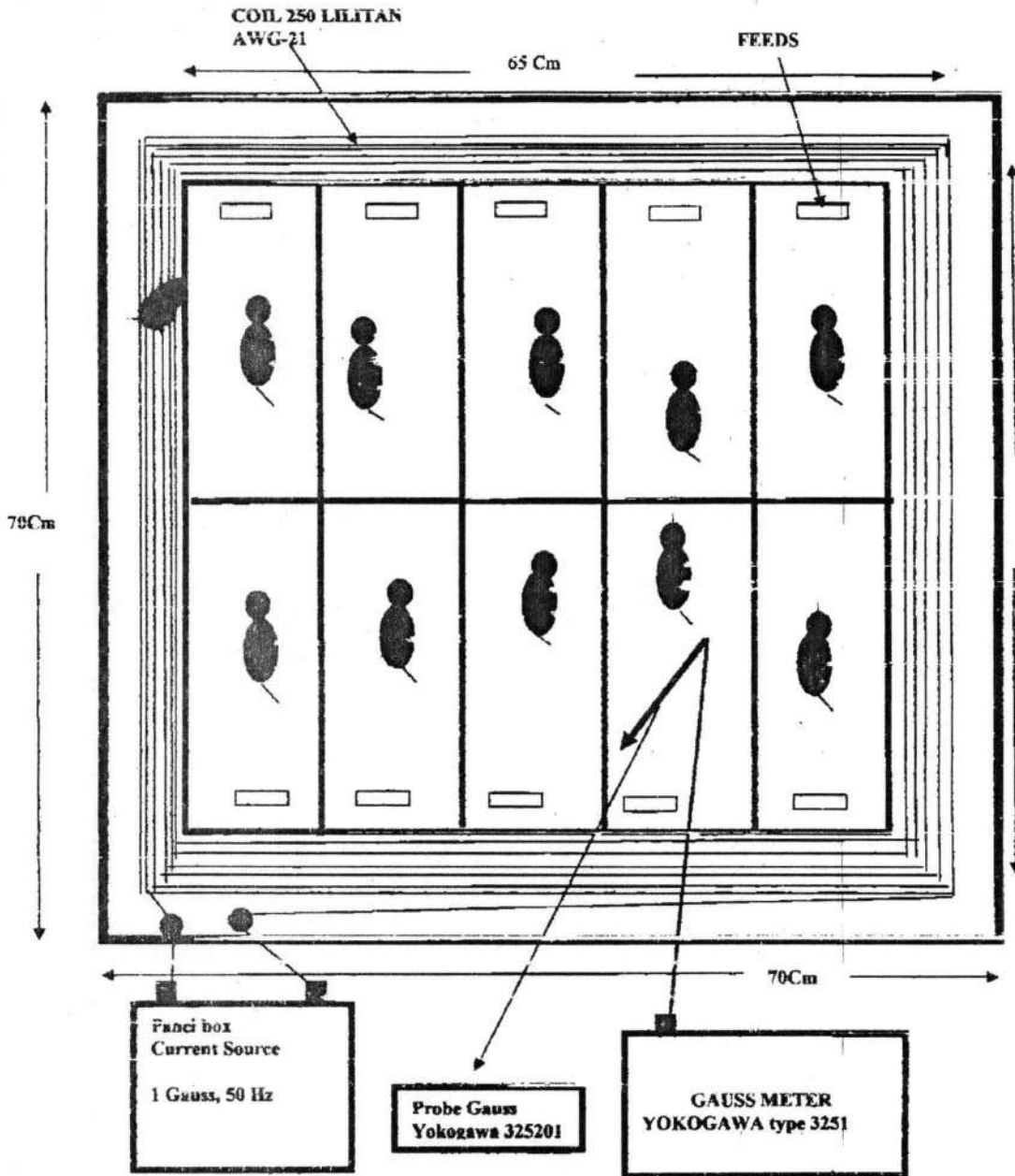
4. Periode Di Estrous

Ditandai dengan betina tidak mau lagi menerima pejantan. Mukosa vagina kembali normal, dengan lapisan epitel yang menipis. Pada sediaan ulas vagina terlihat banyak leukosit dan sel-sel epitel dengan inti yang jelas. Periode ini merupakan periode terpanjang yaitu sekitar 60 - 70 jam (Hafez, 1987).

Lampiran 6

Skema Alat

PANEL BOX ELECTROMAGNETIC AFFECT OSTEOGENESIS



SPESIFIKASI :**BOX PERCOBAAN A.**

1. Box dari papan kayu Multiboard terdiri dari 10 ruang bersekat
2. Kumparan(Coil) 250 Lilitan bahan kawat ukuran AWG-21 melingkari luar box kayu
3. Panel rangkaian sumber Medan Elektromagnet 1 Gauss, 50 Hz.
4. Gauss Meter Merk Yokogawa Type 3251
5. Probe Gauss Merk Yokogawa sensor type 325201

BOX PERCOBAAN B.

1. Box dari papan kayu Multiboard terdiri dari 10 ruang bersekat
2. Tanpa Kumparan(Coil) sehingga tidak terpengaruh medan elektromagnet.

Lampiran 7

Tabel 5.1 : Data Dasar Berat dan Osteoblas

KEL	BERAT	OSTEOBLAS					RERATA
		LP1	LP2	LP3	LP4	LP5	
NON E L E K T R O M A G	205	5	10	4	6	0	5,0
	206	7	0	8	5	10	6,0
	197	0	0	7	7	8	4,4
	200	6	10	7	5	7	7,0
	207	7	4	8	8	7	6,8
	199	7	5	0	4	1	3,4
	205	5	5	4	5	5	4,8
	204	3	3	4	3	5	3,6
	195	4	5	5	5	4	4,6
	206	3	3	3	4	3	3,2
E L E K T R O M A G	201	15	9	15	10	8	11,4
	208	9	12	7	7	15	10,0
	203	18	16	17	16	10	15,4
	201	10	15	10	10	13	11,6
	204	21	13	11	18	5	13,6
	207	13	10	9	10	11	10,6
	199	11	12	10	13	10	11,2
	205	14	14	14	15	15	14,4
	206	12	13	13	14	12	12,8
	201	12	13	14	13	14	13,2

Keterangan :

LP1 = lapang pandang 1, KEL = kelompok, BERAT = berat badan

Tabel 5.2 : Data Dasar TGF β dan tebal kalus

KEL	T G F β						TEBAL KALUS
	LP1	LP2	LP3	LP4	LP5	RERATA	
NON E L E K T R O M A G	0	0	2	0	0	0,4	150
	0	0	2	2	2	1,2	160
	0	0	0	1	0	0,2	150
	3	2	3	2	0	2,0	150
	0	3	2	2	0	1,4	165
	0	1	0	0	0	0,2	175
	1	0	1	0	1	0,6	150
	1	1	0	0	0	0,4	165
	1	1	0	2	1	1,0	155
	0	0	1	0	0	0,2	185
E L E K T R O M A G	7	4	0	3	0	2,8	240
	3	4	0	3	2	2,4	315
	4	2	3	3	2	2,8	165
	2	4	1	2	2	2,2	170
	4	3	3	3	4	3,4	200
	3	2	4	2	2	2,6	150
	4	3	3	2	2	2,8	190
	3	4	3	3	3	3,2	160
	2	2	3	2	4	2,6	130
	3	3	4	2	3	3,0	120

Means

Report

KELOMPOK		BERAT BADAN (gram)	OSTOBLAS (buah plp)	TGF BETA (buah plp)	TEBAL KALUS (mikron)
OVAREK NON ELEKTROMAGNETIK	Mean	202.40	4.8800	.7600	166.50
	Std. Deviation	4.27	1.3506	.6168	15.99
	N	10	10	10	10
OVAREK DG ELEKTROMAGNETIK	Mean	203.50	12.6200	2.7500	184.00
	Std. Deviation	2.99	1.9899	.3689	57.63
	N	10	10	10	10

NPar Tests

KELOMPOK = OVAREK NON ELEKTROMAGNETIK

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		BERAT BADAN (gram)	OSTOBLAS (buah plp)	TGF BETA (buah plp)	TEBAL KALUS (mikron)
N		10	10	10	10
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	202.40	4.8800	.7600	166.50
	Std. Deviation	4.27	1.3506	.6168	15.99
Most Extreme Differences	Absolute	.246	.165	.220	.176
	Positive	.141	.165	.220	.164
	Negative	-.246	-.122	-.182	-.176
Kolmogorov-Smirnov Z		.778	.521	.697	.557
Asymp. Sig. (2-tailed)		.581	.949	.717	.915

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = OVAREK NON ELEKTROMAGNETIK

KELOMPOK = OVAREK DG ELEKTROMAGNETIK

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		BERAT BADAN (gram)	OSTOBLAS (buah plp)	TGF BETA (buah plp)	TEBAL KALUS (mikron)
N		10	10	10	10
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	203.50	12.6200	2.7500	184.00
	Std. Deviation	2.99	1.9899	.3689	57.63
Most Extreme Differences	Absolute	.198	.196	.158	.196
	Positive	.198	.196	.158	.196
	Negative	-.102	-.119	-.089	-.133
Kolmogorov-Smirnov Z		.627	.619	.499	.620
Asymp. Sig. (2-tailed)		.826	.838	.964	.837

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = OVAREK DG ELEKTROMAGNETIK

T-Test untuk uji homogenitas

Group Statistics

KELOMPOK	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
BERAT BADAN (gram) OVAREK NON ELEKTROMAGNETIK	10	202.40	4.27	1.35
OVAREK DG ELEKTROMAGNETIK	10	203.50	2.99	.95

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means			
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference
BERAT BADAN (gram) Equal variances assumed	3.043	.098	-0.667	18	.513	-1.10
			-0.667	16.109	.514	-1.10

General Linear Model

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
KELOMPOK 1	OVAREK NON ELEKTROMAGNETIK	10
2	OVAREK DG ELEKTROMAGNETIK	10

Descriptive Statistics

	KELOMPOK	Mean	Std. Deviation	N
OSTOBLAS (buah plp)	OVAREK NON ELEKTROMAGNETIK	4.8800	1.3506	10
	OVAREK DG ELEKTROMAGNETIK	12.6200	1.9899	10
	Total	8.7500	4.3017	20
TGF BETA (buah plp)	OVAREK NON ELEKTROMAGNETIK	.7600	.6168	10
	OVAREK DG ELEKTROMAGNETIK	2.7500	.3689	10
	Total	1.7550	1.1344	20
TEBAL KALUS (mikron)	OVAREK NON ELEKTROMAGNETIK	166.50	15.99	10
	OVAREK DG ELEKTROMAGNETIK	184.00	57.63	10
	Total	175.25	42.13	20

Multivariate Tests^b

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.021	.109 ^a	3.000	15.000	.953
	Wilks' Lambda	.979	.109 ^a	3.000	15.000	.953
	Hotelling's Trace	.022	.109 ^a	3.000	15.000	.953
	Roy's Largest Root	.022	.109 ^a	3.000	15.000	.953
BB	Pillai's Trace	.071	.379 ^a	3.000	15.000	.769
	Wilks' Lambda	.929	.379 ^a	3.000	15.000	.769
	Hotelling's Trace	.076	.379 ^a	3.000	15.000	.769
	Roy's Largest Root	.076	.379 ^a	3.000	15.000	.769
KEL	Pillai's Trace	.881	37.097 ^a	3.000	15.000	.000
	Wilks' Lambda	.119	37.097 ^a	3.000	15.000	.000
	Hotelling's Trace	7.419	37.097 ^a	3.000	15.000	.000
	Roy's Largest Root	7.419	37.097 ^a	3.000	15.000	.000

a. Exact statistic

b. Design: Intercept+BB+KEL

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	OSTOBLAS (buah plp)	299.616 ^a	2	149.808	49.001	.000
	TGF BETA (buah plp)	19.805 ^b	2	9.902	36.242	.000
	TEBAL KALUS (mikron)	3070.638 ^c	2	1535.319	.851	.444
Intercept	OSTOBLAS (buah plp)	.156	1	.156	.051	.824
	TGF BETA (buah plp)	5.009E-03	1	5.009E-03	.018	.894
	TEBAL KALUS (mikron)	661.408	1	661.408	.367	.553
BB	OSTOBLAS (buah plp)	7.834E-02	1	7.834E-02	.026	.875
	TGF BETA (buah plp)	4.165E-03	1	4.165E-03	.015	.903
	TEBAL KALUS (mikron)	1539.388	1	1539.388	.854	.368
KEL	OSTOBLAS (buah plp)	290.833	1	290.833	95.128	.000
	TGF BETA (buah plp)	19.235	1	19.235	70.400	.000
	TEBAL KALUS (mikron)	1060.456	1	1060.456	.588	.454
Error	OSTOBLAS (buah plp)	51.974	17	3.057		
	TGF BETA (buah plp)	4.645	17	.273		
	TEBAL KALUS (mikron)	30653.112	17	1803.124		
Total	OSTOBLAS (buah plp)	1882.840	20			
	TGF BETA (buah plp)	86.050	20			
	TEBAL KALUS (mikron)	647975.000	20			
Corrected Total	OSTOBLAS (buah plp)	351.590	19			
	TGF BETA (buah plp)	24.449	19			
	TEBAL KALUS (mikron)	33723.750	19			

a. R Squared = .852 (Adjusted R Squared = .835)

b. R Squared = .810 (Adjusted R Squared = .788)

c. R Squared = .091 (Adjusted R Squared = -.016)

Estimated Marginal Means

KELOMPOK

Estimates

Dependent Variable	KELOMPOK	Mean	Std. Error
OSTOBLAS (buah plp)	OVAREK NON ELEKTROMAGNETIK	4.890 ^a	.556
	OVAREK DG ELEKTROMAGNETIK	12.610 ^a	.556
TGF BETA (buah plp)	OVAREK NON ELEKTROMAGNETIK	.762 ^a	.166
	OVAREK DG ELEKTROMAGNETIK	2.748 ^a	.166
TEBAL KALUS (mikron)	OVAREK NON ELEKTROMAGNETIK	167.879 ^a	13.511
	OVAREK DG ELEKTROMAGNETIK	182.621 ^a	13.511

a. Evaluated at covariates appeared in the model: BERAT BADAN (gram) = 202.95.

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
OSTOBLAS (buah plp)	OVAREK NON ELEKTROMAGNETIK	OVAREK DG ELEKTROMAGNETIK	-7.720	.792	.000
	OVAREK DG ELEKTROMAGNETIK	OVAREK NON ELEKTROMAGNETIK	7.720	.792	.000
TGF BETA (buah plp)	OVAREK NON ELEKTROMAGNETIK	OVAREK DG ELEKTROMAGNETIK	-1.985	.237	.000
	OVAREK DG ELEKTROMAGNETIK	OVAREK NON ELEKTROMAGNETIK	1.985	.237	.000
TEBAL KALUS (mikron)	OVAREK NON ELEKTROMAGNETIK	OVAREK DG ELEKTROMAGNETIK	-14.742	19.22	.454
	OVAREK DG ELEKTROMAGNETIK	OVAREK NON ELEKTROMAGNETIK	14.742	19.22	.454

Based on estimated marginal means

a.

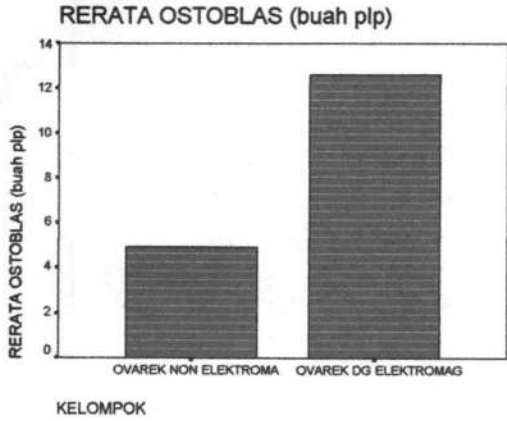
Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustment)

Univariate Tests

Dependent Variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
OSTOBLAS (buah plp)	Contrast	290.833	1	290.833	95.128	.000
	Error	51.974	17	3.057		
TGF BETA (buah plp)	Contrast	19.235	1	19.235	70.400	.000
	Error	4.645	17	.273		
TEBAL KALUS (mikron)	Contrast	1060.456	1	1060.456	.588	.454
	Error	30653.112	17	1803.124		

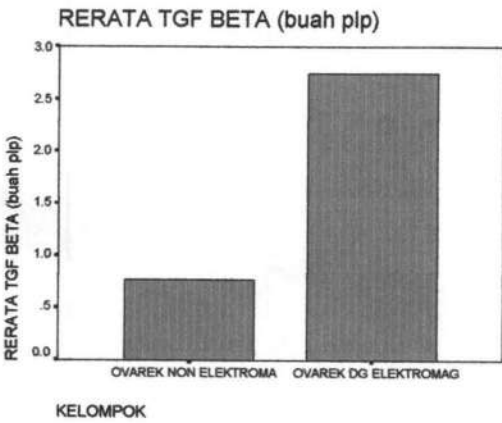
The F tests the effect of KELOMPOK. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

OSTOBLAS (buah plp)



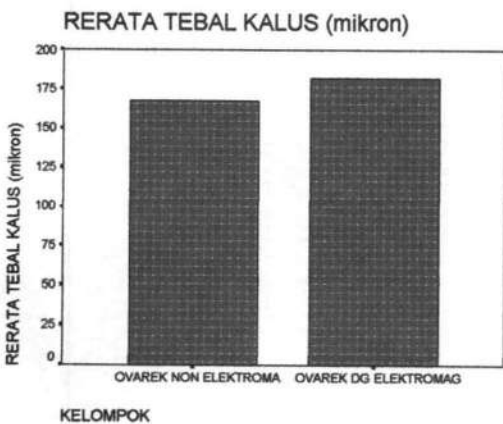
GAMBAR : DIAGRAM RERATA OSTEUBLAS MENURUT KELOMPOK PERLAKUAN

TGF BETA (buah plp)



GAMBAR : DIAGRAM BATANG RERATA TGF BETA MENURUT KELOMPOK PERLAKUAN

TEBAL KALUS (mikron)



GAMBAR : DIAGRAM BATANG RERATA TEBAL KALUS MENURUT KELOMPOK PERLAKUAN