

BOVE DEWATI
IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SOYBEAN

TESIS

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK KEDELAI DALAM
MENGHAMBAT PENURUNAN KEPADATAN TULANG
PADA TERAPI KORTIKOSTEROID JANGKA PANJANG
TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus norvegicus*)**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



KKA
KK
TKD 10/07
Sum
e

TITO SUMARWOTO

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2004



TESIS

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK KEDELAI DALAM
MENGHAMBAT PENURUNAN KEPADATAN TULANG
PADA TERAPI KORTIKOSTEROID JANGKA PANJANG
TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus norvegicus*)**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TITO SUMARWOTO

NIM 090214876M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2004

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK KEDELAI DALAM
MENGHAMBAT PENURUNAN KEPADATAN TULANG
PADA TERAPI KORTIKOSTEROID JANGKA PANJANG
TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus norvegicus*)
PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**

TESIS

**Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Klinik
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh

TITO SUMARWOTO

NIM 090214876M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

Tanggal 6 September 2004

iii

“Dan seandainya seluruh pohon yang ada di muka bumi dijadikan pena dan seluruh lautan menjadi tintanya, kemudian sesudah kering habis digunakan ditambahkan lagi tujuh lautan, niscaya tidak akan habis-habisnya dituliskan ilmu ALLAH. Sesungguhnya ALLAH Maha Perkasa lagi Maha Bijaksana”

(Q. S. Luqman : 27)

“Niscaya ALLAH akan meninggikan orang-orang yang beriman diantara kamu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat.

Dan ALLAH mengetahui apa yang kamu kerjakan”

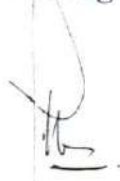
(Q. S. Al Mujadalah : 11)

**Kupersembahkan kepada
Kedua orang tua dan mertua
Atas doa dan kasih sayangnya
Yang tiada pernah habis-habisnya
Selalu terlimpah sepanjang masa
Kepada istriku atas cinta dan citanya
Kepada anak-anakku atas keluguannya
Kepada adik-adikku atas dukungannya
Kepada para sahabatku atas kebersamaannya
Kepada almamater kebanggaanku Universitas Airlangga**

Lembar Pengesahan

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
UNTUK DIUJI PADA TANGGAL 6 SEPTEMBER 2004**

**Oleh
Pembimbing Ketua**



Prof Dr Djoko Roeshadi, dr, SpB, SpOT

NIP 130 325 838

Pembimbing



Dr Paulus Liben, dr, MS

NIP 130 531 788

Telah diuji pada

Tanggal 6 September 2004

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof Retno Handayani, dr, MS, PhD

Anggota : 1. Prof Dr Djoko Roeshadi, dr, SpB, SpOT

2. Dr Paulus Liben, dr, MS

3. Rahardjo, dr, MS

4. M. Cholil Munif, dr, AIF

UCAPAN TERIMA KASIH

BISMILLAAHIRROHMAANIRROHIIM

Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayahNya sehingga tesis ini dapat saya selesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Prof Dr Djoko Roeshadi, dr, SpB, SpOT selaku Pembimbing Ketua yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan, koreksi, masukan, saran dan wawasannya kepada saya.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Dr Paulus Liben, dr, MS selaku Pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah meluangkan waktunya untuk memberikan dorongan, bimbingan, saran dan masukan yang sangat berarti dalam melakukan penelitian ini.

Kesempatan kali ini izinkan saya untuk menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat :

Rektor Universitas Airlangga Surabaya Prof Dr Med Puruhito, dr, SpB TKV;
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya Prof Dr HMS Wiyadi, dr, SpTHT; Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya Prof Dr H Muhammad Amin, dr, SpP; Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya Prof Retno Handayani, dr, MS, PhD; Prof Soetjipto, dr, MS, PhD selaku mantan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya; serta Ketua Program Studi Orthopaedi dan Traumatologi

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga / Rumah Sakit Umum dr Soetomo Surabaya Prof Dr Djoko Roeshadi, dr, SpB, SpOT yang telah memberi kesempatan kepada penulis untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan di Program Magister ini.

Prof Retno Handayani, dr, MS, PhD dan Rahardjo, dr, MS yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan masukan dan arahan dalam penyusunan tesis ini. M. Cholil Munif, dr, AIF yang telah memberikan bimbingan dan saran dalam pengolahan data penelitian di tesis ini.

Seluruh staf, teman-teman sejawat PPDS dan karyawan di Laboratorium Orthopaedi dan Traumatologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga / Rumah Sakit Umum dr Soetomo Surabaya yang telah membantu dan bekerja sama mulai dari awal kuliah hingga selesainya penulisan tesis ini.

Mas Herry Soemantoro dan Mas Khairul yang telah banyak membantu dalam pemeliharaan, perlakuan percobaan dan pengambilan unit analisis hewan coba di Laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

Kedua orang tua, kedua mertua dan adik-adik yang telah memberikan dukungan moral, finansial dan doa sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan ini. Istri tercinta beserta anak-anak yang manis-manis, selalu setia mendampingi dan memberikan semangat penulis dalam rangka menyelesaikan pendidikan ini.

Semua pihak yang ikut membantu dan mendukung selama masa pendidikan yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu di sini.

Dengan segala kerendahan hati penulis memohon maaf atas segala kekurangan, mohon masukan dan saran untuk perbaikan serta semoga bermanfaat bagi kita semuanya.

Surabaya, September 2004

Penulis

RINGKASAN

Efek Pemberian Ekstrak Kedelai Dalam Menghambat Penurunan Kepadatan Tulang Pada Terapi Kortikosteroid Jangka Panjang Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*)

Tito Sumarwoto

Penelitian ini bermula dari perhatian penulis terhadap banyaknya kasus osteoporosis sekunder akibat pemberian kortikosteroid jangka panjang yang berakibat meningkatnya kejadian patah tulang sehingga mempengaruhi produktivitas. Estrogen merupakan hormon steroid yang dapat menurunkan resorpsi tulang sehingga dapat mencegah hilangnya massa tulang dikenal sebagai agen antiresorptif. Fitoestrogen, yang banyak terdapat dalam makanan berasal dari kedelai, merupakan sekelompok campuran non-steroid tanaman yang memiliki kemampuan estrogenik, berperan pada sel dengan cara yang sama seperti estrogen tetapi memiliki efek samping yang lebih ringan daripada estrogen apabila diberikan dalam jangka waktu yang lama. Mekanisme antiresorptif inilah yang dianggap berperan dalam menghambat penurunan kepadatan tulang pada terapi kortikosteroid jangka panjang. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang dalam menghambat penurunan kepadatan tulang.

Rancangan penelitian yang dipakai adalah *The Post-Test Only Control Group Design*. Penelitian dilakukan terhadap 48 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar berusia 3 bulan yang dibagi secara acak menjadi 6

kelompok. Kelompok tersebut terdiri dari kelompok kontrol yang tidak diberi prednisolon peroral dan tidak diberi ekstrak kedelai peroral (P_1), kelompok yang hanya diberi perlakuan ekstrak kedelai 1,8 mg / 200 gram tikus / hari peroral (P_2), kelompok yang hanya diberi perlakuan kortikosteroid berupa prednisolon 0,54 mg / 200 gram tikus / hari peroral (P_3), kelompok yang diberi perlakuan kortikosteroid berupa prednisolon 0,54 mg / 200 gram tikus / hari peroral dan ekstrak kedelai 0,9 mg / 200 gram tikus / hari peroral (P_4), kelompok yang diberi perlakuan kortikosteroid berupa prednisolon 0,54 mg / 200 gram tikus / hari peroral dan ekstrak kedelai 1,8 mg / 200 gram tikus / hari peroral (P_5); dan kelompok yang diberi perlakuan kortikosteroid berupa prednisolon 0,54 mg / 200 gram tikus / hari peroral dan ekstrak kedelai 3,6 mg / 200 gram tikus / hari peroral (P_6). Setelah 100 hari perlakuan, kepadatan tulang diukur menggunakan alat DBM Sonic 1200 pada metafisis femur semua hewan coba dan kadar alkali fosfatase dalam serum menggunakan metode standar yang dioptimalisasikan sesuai rekomendasi *Deutsche Gessellschaft fur Chemie*.

Hasil penelitian menunjukkan rerata kepadatan tulang kelompok kontrol ($1637,00 \pm 12,26$) m/dtk, kelompok yang diberi ekstrak kedelai ($1658,50 \pm 23,66$) m/dtk, kelompok yang diberi prednisolon ($1614,00 \pm 9,52$) m/dtk, kelompok yang diberikan prednisolon dan ekstrak kedelai dosis setengah ($1640,25 \pm 18,87$) m/dtk, dosis penuh didapat ($1644,63 \pm 19,62$) m/dtk dan dosis dua kali lipat ($1652,13 \pm 20,23$) m/dtk. Sedangkan respons perubahan kepadatan tulang didapatkan masing-masing ($21,5000 \pm 23,6643$) m/dtk; ($-23,0000 \pm 9,5169$) m/dtk; ($3,2500 \pm 18,8661$) m/dtk; ($7,6250 \pm 19,6173$) m/dtk; ($15,1250 \pm 20,2304$) m/dtk. Pengukuran kadar

alkali fosfatase dalam serum didapat harga rerata kelompok kontrol ($102,13 \pm 5,54$) IU/L, kelompok yang diberi ekstrak kedelai ($109,75 \pm 10,65$) IU/L, kelompok yang mendapat prednisolon ($92,38 \pm 15,31$) IU/L, kelompok yang diberikan prednisolon dan ekstrak kedelai dosis setengah ($98,88 \pm 26,59$) IU/L, dosis penuh didapat ($116,87 \pm 33,39$) IU/L, dosis dua kali lipat ($119,50 \pm 26,40$) IU/L. Sedangkan respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum masing-masing kelompok didapat ($6,6200 \pm 10,6469$) IU/L; ($-10,7550 \pm 15,3058$) IU/L; ($-4,2550 \pm 26,5945$) IU/L; ($13,7450 \pm 33,3913$) IU/L dan ($16,3700 \pm 26,4035$) IU/L.

Hasil penelitian selanjutnya dianalisis menggunakan analisis multi varians dilanjutkan dengan uji beda (Beda Nyata Terkecil / *pairwise comparisons*). Hasil analisis dengan menggunakan uji multi varians menunjukkan bahwa secara bersama-sama rerata hasil pengukuran kepadatan tulang dan kadar alkali fosfatase dalam serum dipengaruhi oleh pemberian ekstrak kedelai dan prednisolon dengan $p < 0,05$. Kemudian dari uji beda didapatkan perbedaan rerata kepadatan tulang yang sangat bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok kedelai $p = 0,022$ ($p < 0,05$) dan dengan kelompok prednisolon $p = 0,014$ ($p < 0,05$). Sedangkan kelompok kontrol terhadap ketiga kelompok perlakuan pemberian prednisolon dan ekstrak kedelai tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna yaitu masing-masing $p = 0,720$ ($p > 0,05$), $p = 0,402$ ($p > 0,05$) dan $p = 0,101$ ($p > 0,05$). Diantara ketiganya terlihat bahwa harga p cenderung semakin kecil.

Antara kelompok kedelai dengan kelompok prednisolon terdapat perbedaan rerata kepadatan tulang yang bermakna dengan $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Antara kelompok

kedelai dengan kelompok perlakuan pemberian prednisolon dan ekstrak kedelai dengan dosis setengah juga terdapat perbedaan rerata kepadatan tulang yang bermakna dengan $p = 0,049$ ($p < 0,05$). Tetapi tidak dijumpai perbedaan rerata yang bermakna antara kelompok kedelai dengan kedua kelompok perlakuan pemberian prednisolon dan ekstrak kedelai berikutnya yaitu masing-masing, $p = 0,131$ ($p > 0,05$) dan $p = 0,483$ ($p > 0,05$).

Antara kelompok prednisolon dengan ketiga kelompok perlakuan pemberian prednisolon dan ekstrak kedelai juga terdapat perbedaan rerata kepadatan tulang yang bermakna dengan masing-masing $p = 0,006$ ($p < 0,05$); $p = 0,002$ ($p < 0,05$) dan $p = 0,000$ ($p < 0,05$).

Antar ketiga kelompok perlakuan pemberian prednisolon dan ekstrak kedelai tidak terdapat perbedaan rerata kepadatan tulang yang bermakna dengan masing-masing $p = 0,630$ ($p > 0,05$); $p = 0,195$ ($p > 0,05$) dan $p = 0,410$ ($p > 0,05$).

Sementara itu berdasar pada respons perubahan kepadatan tulang terdapat perbedaan rerata yang sangat bermakna antara kelompok kedelai dengan kelompok prednisolon dengan $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Tetapi tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna antara kelompok kedelai dengan ketiga kelompok perlakuan pemberian prednisolon dan ekstrak kedelai masing-masing dengan $p = 0,063$ ($p > 0,05$), $p = 0,153$ ($p > 0,05$) dan $p = 0,506$ ($p > 0,05$).

Antara kelompok prednisolon dengan ketiga kelompok perlakuan pemberian prednisolon dan ekstrak kedelai didapat perbedaan rerata yang bermakna dengan masing-masing $p = 0,009$ ($p < 0,05$); $p = 0,003$ ($p < 0,05$) dan $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Antar ketiga kelompok perlakuan pemberian prednisolon dan ekstrak kedelai

tidak terdapat perbedaan rerata kepadatan tulang yang bermakna dengan masing-masing $p = 0,648$ ($p > 0,05$); $p = 0,219$ ($p > 0,05$) dan $p = 0,435$ ($p > 0,05$).

Bila mengamati hasil perhitungan uji beda untuk kadar alkali fosfatase dalam serum hampir semua didapat harga $p > 0,05$ yang berarti tidak terdapat perbedaan rerata kadar alkali fosfatase dalam serum yang bermakna diantara kelompok-kelompok tersebut di atas, kecuali antara kelompok 3 dengan kelompok 5 dan antara kelompok 3 dengan kelompok 6 dengan p masing-masing 0,031 dan 0,018 ($p < 0,05$). Demikian juga pada hasil perhitungan uji beda untuk respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum hampir semua didapat harga $p > 0,05$ yang berarti tidak terdapat perbedaan rerata respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum yang bermakna diantara kelompok-kelompok tersebut di atas, kecuali juga antara kelompok 3 dengan kelompok 5 dan antara kelompok 3 dengan kelompok 6 dengan p masing-masing 0,048 dan 0,030 ($p < 0,05$).

Akhirnya dengan menggunakan uji korelasi regresi linier terbukti bahwa terdapat hubungan antara peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai dengan peningkatan efek penghambatan penurunan kepadatan tulang dan peningkatan kadar alkali fosfatase serum dengan hasil p masing-masing adalah 0,000 dan 0,000 ($p < 0,05$). Jadi dengan peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai berpengaruh secara bermakna terhadap efek penghambatan penurunan kepadatan tulang dan peningkatan kadar alkali fosfatase serum.

Penelitian ini menyimpulkan bahwa pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang dapat menghambat terjadinya penurunan kepadatan tulang. Pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang juga

dapat meningkatkan kadar alkali fosfatase dalam serum tetapi peningkatan enzim ini tidak dapat dipakai sebagai petanda untuk melihat peningkatan aktivitas osteoblas. Dan dengan peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang ternyata dapat meningkatkan penghambatan terjadinya penurunan kepadatan tulang.

SUMMARY

The Effect of Soybean Extract on Hampering Decreasing Bone Density in Long-term Corticosteroid Therapy in Male White Rat

(Rattus norvegicus)

Tito Sumarwoto

This research was begun from the attention of author to the count of secondary osteoporosis due to long-term corticosteroid therapy that increasing the morbidity of fracture and finally influencing productivity. Estrogen is steroid hormone that be able to decrease bone resorption with the result that be able to prohibit loosening bone mass known as antiresorptive agent. Phytoestrogen, much found in soybean originally food, is a group of plant non-steroid mixture which has estrogenic capability, has a role in cell with the same way as estrogen but has less side effect than estrogen when it is given in long-term therapy. This antiresorptive mechanism is believed have a role in hampering decreasing bone density in long-term corticosteroid therapy. The objective of this study was to demonstrate the effect of soybean extract on hampering decreasing bone density in long-term corticosteroid therapy.

The outline of this study was *The Post-Test Only Control Group Design*. The research was done using forty-eight three month old male wistar strain white rats. These rats were randomly divided into six groups. They consist of a control group which was not given prednisolon and soybean extract orally (P₁), a group which was only given soybean extract 1,8 mg / 200 gram BW / day orally (P₂), a group

which was only given prednisolon 0,54 mg / 200 gram BW / day orally (P₃), a group which was given prednisolon 0,54 mg / 200 gram BW / day orally and soybean extract 0,9 mg / 200 gram BW / day orally (P₄), a group which was given prednisolon 0,54 mg / 200 gram BW / day orally and soybean extract 1,8 mg / 200 gram BW / day orally (P₅); dan a group which was given prednisolon 0,54 mg / 200 gram BW / day orally and soybean extract 3.6 mg / 200 gram BW / day orally (P₆). After 100 days, the bone density measurement was undertaken at metaphyseal part of femoral bone of all experimental rats using ultrasound densitometry DBM Sonic 1200 and serum alkali phosphatase using optimalized standard method according *Deutsche Gessellschaft fur Chemie* recommendation.

The result of this study showed the mean of bone density in control group was (1637.00 ± 12.26) m/sec, soybean extract group was (1658.50 ± 23.66) m/sec, corticosteorid (prednisolon) group was (1614.00 ± 9.52) m/sec, the group that was given corticosteroid (prednisolon) and soybean extract with different dose were (1640.25 ± 18.87) m/sec, (1644.63 ± 19.62) m/sec and (1652.13 ± 20.23) m/sec. Meanwhile the results of bone density changing response noted below each were (21.5000 ± 23.6643) m/sec, (-23.0000 ± 9.5169) m/sec, (3.2500 ± 18.8661) m/sec, (7.6250 ± 19.6173) m/sec, (15.1250 ± 202304) m/sec. The mean of serum alkali phosphatase level for the control group was (102.13 ± 5.54) IU/L, soybean extract group was (109.75 ± 10.65) IU/L, corticosteroid (prednisolon) group was (92.38 ± 15.31) IU/L, and the group that was given corticosteroid and soybean extract with different dose were (98.88 ± 26.59) IU/L, (116.87 ± 3339) IU/L, and (119.50 ± 26.40) IU/L. The results of serum alkali phosphatase level changing response for

each group were (6.6200 ± 10.6469) IU/L, (-10.7550 ± 15.3058) IU/L, (-4.2550 ± 26.5945) IU/L, (13.7450 ± 33.3913) IU/L and (16.3700 ± 26.4035) IU/L.

The result of this study was subsequently analyzed by using multi variant analysis and pairwise comparisons. By using multi variant test showed that the mean of bone density and serum alkali phosphatase level were influenced by administering soybean extract and corticosteroid (prednisolon) with $p < 0.05$. Pairwise comparisons showed a significant difference in mean bone density between control group compare to soybean extract group $p = 0.022$ ($p < 0.05$) and to corticosteroid group (prednisolon) $p = 0.014$ ($p < 0.05$). Meanwhile there were no significant differences between control group compare to three groups which were administered soybean extract and corticosteroid with each $p = 0.720$ ($p > 0.05$), $p = 0.402$ ($p > 0.05$) and $p = 0.101$ ($p > 0.05$); and there was decreasing the value of p among them.

There was a significant difference in mean bone density between soybean extract group and corticosteroid group with $p = 0.000$ ($p < 0.05$). There was a significant difference also in mean bone density between soybean extract group and group which was administered soybean extract with a half dose and corticosteroid with $p = 0,049$ ($p < 0,05$). But no significant difference between soybean extract compare to two groups which were administered soybean extract and corticosteroid with each $p = 0,131$ ($p > 0.05$) and $p = 0.483$ ($p > 0.05$).

There was a significant difference also in mean bone density between corticosteroid group compare to three groups which were administered soybean

extract and corticosteroid with each $p = 0.006$ ($p < 0.05$); $p = 0.002$ ($p < 0.05$) and $p = 0.000$ ($p < 0.05$).

But there was no significant differences among three groups which were administered soybean extract and corticosteroid with $p = 0.630$ ($p > 0.05$); $p = 0.195$ ($p > 0.05$) and $p = 0.410$ ($p > 0.05$).

Meanwhile there was a significant difference between soybean extract group compare to corticosteroid group based in mean of the bone density changing response with $p = 0.000$ ($p < 0.05$). But there were no significant differences between soybean group compare to three groups which were administered soybean extract and corticosteroid with $p = 0.063$ ($p > 0.05$), $p = 0.153$ ($p > 0.05$) and $p = 0.506$ ($p > 0.05$).

There were significant differences in mean of bone density changing response between corticosteroid group compare to three groups which were administered soybean extract and corticosteroid with $p = 0.009$ ($p < 0.05$); $p = 0.003$ ($p < 0.05$) and $p = 0.000$ ($p < 0.05$). There was no significant differences among three groups which were administered soybean extract and corticosteroid each with $p = 0.648$ ($p > 0.05$); $p = 0.219$ ($p > 0.05$) and $p = 0.435$ ($p > 0.05$).

Meanwhile there were no significant differences in the level of serum alkali phosphatase in almost all of groups with $p > 0.05$, except between corticosteroid group compare to group which was administered soybean extract 1,8 mg and corticosteroid 0.54 mg (group 5) and between corticosteroid group compare to group which was administered soybean extract 3.6 mg and corticosteroid 0.54 mg (group 6) with $p = 0.031$ and 0.018 ($p < 0.05$). There were also no significant

differences in the changing response of serum alkali phosphatase level in almost all of groups with $p > 0.05$, except between corticosteroid group compare to group which was administered soybean extract 1,8 mg and corticosteroid 0.54 mg (group 5) and between corticosteroid group compare to group which was administered soybean extract 3.6 mg and corticosteroid 0.54 mg (group 6) with each p 0.048 and 0.030 ($p < 0.05$).

Finally by using linier regresion correlation test was proven that there was a correlation between the raising dose of soybean extract administration with the increasing on hampering decreasing bone density and the increasing serum alkali phosphatase level with each p were 0.000 and 0.000 ($p < 0.05$). So by increasing the dose of soybean extract administration had a significant effect to the hampering decreasing bone density and the increasing of serum alkali phosphatase level.

This study concluded that administration of soybean extract in long-term corticosteroid therapy could hamper decreasing bone density. The administration of soybean extract in long-term corticosteroid therapy could also increasing serum alkali phosphatase level but the increasing of this enzyme could not be used as the marker of increasing osteoblast activity. And by raising the dose of the soybean extract administration in long-term corticosteroid therapy had be able to increase hampering decreasing bone density.

ABSTRAK

Efek Pemberian Ekstrak Kedelai Dalam Menghambat Penurunan Kepadatan Tulang Pada Terapi Kortikosteroid Jangka Panjang Tikus Putih Jantan

(Rattus norvegicus)

Tito Sumarwoto

Ekstrak kedelai mengandung fitoestrogen, merupakan sekelompok campuran non-steroid tanaman yang memiliki kemampuan estrogenik tetapi memiliki efek samping lebih ringan daripada estrogen apabila diberikan dalam jangka waktu lama. Fitoestrogen memiliki cara yang sama dengan estrogen dalam menurunkan resorpsi tulang, dapat menghambat penurunan massa tulang yang dikenal sebagai agen anti-resorptif. Mekanisme antiresorptif inilah yang dianggap berperan dalam menghambat penurunan kepadatan tulang pada terapi kortikosteroid jangka panjang.

Tujuan penelitian ini membuktikan efek pemberian ekstrak kedelai dalam menghambat penurunan kepadatan tulang pada terapi kortikosteroid jangka panjang.

Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar berusia tiga bulan, secara acak dibagi dalam enam kelompok. Terdiri atas kelompok kontrol, kelompok ekstrak kedelai, kelompok prednisolon, dan tiga kelompok yang diberikan prednisolon dan ekstrak kedelai dengan dosis berbeda. Setelah 100 hari, densitas tulang diukur pada bagian metafisis femur menggunakan densitometri

DBM Sonic 1200 dan alkali fosfatase dalam serum menggunakan metoda standar yang dioptimalisasikan menurut rekomendasi *Deutsche Gessellschaft fur Chemie*. Hasil yang didapat adalah kepadatan tulang dan kadar alkali fosfatase dalam serum rata-rata dipengaruhi oleh pemberian ekstrak kedelai dan kortikosteroid (prednisolon) dengan $p < 0,05$. Uji Beda Nyata menunjukkan perbedaan rata-rata kepadatan tulang yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok ekstrak kedelai ($p < 0,05$) dan dengan kelompok prednisolon ($p < 0,05$). Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan tiga kelompok yang diberikan kortikosteroid (prednisolon) dan ekstrak kedelai dengan dosis yang berbeda ($p > 0,05$), dan terdapat penurunan harga p . Terdapat perbedaan rata-rata kepadatan tulang yang bermakna antara kelompok ekstrak kedelai dengan kelompok kortikosteroid ($p < 0,05$). Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok ekstrak kedelai dengan tiga kelompok yang mendapat kortikosteroid (prednisolon) dan ekstrak kedelai dengan dosis yang berbeda ($p > 0,05$). Perbedaan yang bermakna juga terdapat pada rata-rata kepadatan tulang antara kelompok kortikosteroid dengan tiga kelompok yang diberikan kortikosteroid dan ekstrak kedelai dengan dosis yang berbeda ($p < 0,05$).

Tidak terdapat perbedaan kadar alkali fosfatase dalam serum yang bermakna pada hampir semua kelompok ($p > 0,05$). Dengan menggunakan uji korelasi regresi linier terbukti bahwa terdapat hubungan antara peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai dengan peningkatan efek penghambatan penurunan kepadatan tulang dan peningkatan kadar alkali fosfatase serum dengan hasil p masing-masing adalah 0,000 dan 0,000 ($p < 0,05$).

Penelitian ini menyimpulkan pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang dapat menghambat penurunan kepadatan tulang; dan juga dapat meningkatkan kadar alkali fosfatase dalam serum tetapi tidak dapat digunakan sebagai petanda meningkatnya aktivitas osteoblas. Peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang dapat meningkatkan penghambatan penurunan kepadatan tulang.

Kata kunci : ekstrak kedelai, kepadatan tulang, kortikosteroid jangka panjang

ABSTRACT

The Effect of Soybean Extract on Hampering Decreasing Bone Density in Long-term Corticosteroid Therapy in Male White Rat

(Rattus norvegicus)

Tito Sumarwoto

Soybean extract containing phytoestrogen, a group of plant non-steroid mixture, has estrogenic capability but has less side effect than estrogen when it is given in long-term therapy. It has a role in cell with the same way as estrogen to decrease bone resorption with the result that be able to prohibit loosening bone mass, known as antiresorptive agent. This antiresorptive mechanism is believed have a role in hampering decreasing bone density in long-term corticosteroid therapy.

The objective of this study was demonstrating the effect of soybean extract on hampering decreasing bone density in long-term corticosteroid therapy.

Experimental animals used in this study were three month old male wistar strain white rats. These rats were randomly divided into six groups. They consist of a control group, soybean extract group, prednisolon group and three groups which were administered corticosteroid and soybean extract with different dose. After 100 days, the bone density was measured at metaphyseal part of femoral bone of all the experimental animals using ultrasound densitometry DBM Sonic 1200 and serum alkali phosphatase using optimized standard method according *Deutsche Gessellschaft fur Chemie* recommendation.

The mean of bone density and serum alkali phosphatase level were influenced by administering soybean extract and corticosteroid (prednisolon) with $p < 0.05$. Pairwise comparisons showed a significant difference in mean bone density between control group compare to soybean extract group ($p < 0.05$) and to corticosteroid group ($p < 0.05$). No significant differences between control group compare to three groups which were administered corticosteroid and soybean extract with different dose ($p > 0.05$), and there was decreasing the value of p among them. There was a significant difference in mean bone density between soybean extract group and corticosteroid group ($p < 0.05$). No significant difference between soybean extract compare to three groups which were administered corticosteroid and soybean extract with different dose ($p > 0.05$). A significant difference also in mean bone density between corticosteroid group compare to three groups which were administered corticosteroid and soybean extract with different dose ($p < 0.05$).

No significant differences in the level of serum alkali phosphatase in almost all of groups ($p > 0.05$). By using linier regresion correlation test was proven that there was a correlation between the raising dose of soybean extract administration with the increasing on hampering decreasing bone density and the increasing serum alkali phosphatase level with each p were 0.000 and 0.000 ($p < 0.05$).

This study concluded that administration of soybean extract in long-term corticosteroid therapy could hamper decreasing bone density; and could also increasing serum alkali phosphatase level but could not be used as the marker of increasing osteoblast activity. Increasing dose of the soybean extract

administration in long-term corticosteroid therapy had a tendency be able to increase hampering decreasing bone density.

Keywords : soybean extract, bone density, long-term corticosteroid

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat Gelar	iii
Kata Mutiara.....	iv
Lembar Pengesahan.....	v
Panitia Penguji.....	vi
Ucapan Terima Kasih	vii
Ringkasan.....	x
Summary.....	xvi
Abstrak.....	xxi
Abstract.....	xxiv
DAFTAR ISI.....	xxvii
DAFTAR GAMBAR.....	xxxii
DAFTAR TABEL.....	xxxiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxxvi
DAFTAR SINGKATAN.....	xxxviii
 BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan umum.....	4
1.3.2 Tujuan khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Anatomi Tulang.....	6
2.2 Struktur Tulang Panjang.....	6

2.3	Histologi Tulang.....	8
2.4	Tulang Sebagai Struktur Anatomi dan Organ Fisiologi.....	9
2.5	Sel Tulang.....	10
2.5.1	Osteoblas.....	10
2.5.2	Osteosit.....	12
2.5.3	Osteoklas.....	14
2.6	Remodeling Tulang.....	18
2.7	Petanda Biokimia Tulang.....	23
2.7.1	Petanda pembentukan tulang	24
2.7.2	Petanda resorpsi tulang.....	25
2.8	Regulasi Hormonal dan Sitokin.....	26
Hormon Parathyroid.....		27
Kalsitonin.....		29
Interleukin.....		30
<i>Transforming Growth Factor β</i>		31
<i>Insulin-like Growth Factor I</i>		33
Prostaglandin E.....		34
Osteopontin.....		35
2.9	Terapi Kortikosteroid.....	36
2.10	Osteopenia Akibat Penggunaan Kortikosteroid Jangka Panjang.....	41
2.11	Estrogen.....	44
2.12	Fitoestrogen.....	47
2.13	Kedelai Sebagai Sumber Fitoestrogen yang Bergizi Tinggi.....	49
2.14	DBM Sonic 1200.....	53

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1	Dasar Teori.....	55
3.2	Kerangka Konseptual Penelitian.....	58
3.3	Hipotesis.....	59

BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1	Rancangan Penelitian.....	60
4.2	Populasi Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel.....	61

4.3 Variabel Penelitian.....	62
4.3.1 Klasifikasi variabel.....	62
4.3.2 Definisi operasional variabel.....	63
4.4 Bahan dan Instrumen Penelitian.....	65
4.4.1 Bahan penelitian.....	65
4.4.2 Instrumen penelitian.....	65
4.5 Prosedur Penelitian.....	66
4.5.1 Aklimatisasi.....	66
4.5.2 Pembagian kelompok hewan coba.....	66
4.5.3 Penimbangan berat badan sebelum perlakuan.....	66
4.5.4 Pelaksanaan perlakuan.....	66
4.5.5 Penimbangan berat badan di tengah dan akhir perlakuan.....	67
4.5.6 Pembiusan.....	68
4.5.7 Pengukuran kepadatan tulang.....	68
4.5.8 Pemeriksaan kadar alkali fosfatase serum.....	68
4.5.9 Alur penelitian.....	69
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	70
4.6.1 Lokasi penelitian.....	70
4.6.2 Waktu penelitian.....	70
4.7 Analisis Data.....	70
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN	
5.1 Data Penelitian.....	71
5.2 Hasil Uji Stasistik Deskriptif.....	75
5.3 Hasil Uji Normalitas.....	80
5.4 Hasil Analisis Multi Varians.....	81
5.5 Hasil Uji Korelasi Regresi Linier.....	88
BAB 6 PEMBAHASAN	
6.1 Metode Penelitian.....	93
6.2 Pembahasan Hasil Penelitian.....	95
6.2.1 Uji statistik deskriptif.....	95

6.2.2 Uji normalitas.....	98
6.2.3 Uji analisis multi varians.....	99
6.2.4 Korelasi regresi linier.....	104
6.3 Efek Pemberian Ekstrak Kedelai dalam Menghambat Penurunan Kepadatan Tulang.....	104
6.4 Perbedaan Efek Penghambatan Penurunan Kepadatan Tulang Akibat Adanya Perbedaan Dosis.....	107
BAB 7 PENUTUP	
7.1 Kesimpulan.....	109
7.2 Saran.....	109
DAFTAR PUSTAKA.....	111
LAMPIRAN.....	117

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Gambar tulang panjang.....	8
Gambar 2.2 Gambaran mikroskopik tulang woven dan tulang lamellar.....	9
Gambar 2.3 Jalur diferensiasi progenitor sel tulang.....	11
Gambar 2.4 Gambar yang menunjukkan hubungan antar sel-sel tulang.....	13
Gambar 2.5 Proses perkembangan osteoklas.....	15
Gambar 2.6 Gambar skematik asal, diferensiasi serta hubungan antara osteoblas, osteosit dan osteoklas.....	16
Gambar 2.7 Gambar skematik osteoklas.....	17
Gambar 2.8 Gambaran skematik menunjukkan sel-sel tulang dalam satu lapang pandang dan osteoid.....	17
Gambar 2.9 Gambaran skematik yang menunjukkan tempat-tempat terjadinya remodeling tulang.....	19
Gambar 2.10 Gambaran skematik yang menunjukkan potongan longitudinal unit remodeling tulang kortikal.....	20
Gambar 2.11 Gambar skematik yang menunjukkan remodeling tulang trabekuler selama keseluruhan proses remodeling.....	21
Gambar 2.12 Sel-sel mononuklear dan preosteoblas.....	21
Gambar 2.13 Siklus remodeling tulang.....	23
Gambar 2.14 PTH berpengaruh pada proses pembentukan osteoklas.....	29
Gambar 2.15 Hubungan antar sel-sel tulang, prekursor-prekursornya, sitokin dan hormon.....	31
Gambar 2.16 Gambar yang menunjukkan komunikasi antara osteoklas dengan osteoblas diperankan oleh TGF β	32
Gambar 2.17 Pengaturan proses pembentukan tulang dan resorpsi tulang.....	33
Gambar 2.18 Struktur beberapa kortikosteroid.....	40
Gambar 2.19 Gambaran skematik patogenesis osteopenia akibat glukokortikoid.....	43

Gambar 2.20 Rumus bangun estradiol dan genistein.....	48
Gambar 2.21 Gambar tanaman kedelai.....	50
Gambar 5.1 Diagram yang menunjukkan rerata kepadatan tulang.....	76
Gambar 5.2 Diagram yang menunjukkan rerata respons perubahan kepadatan..	77
Gambar 5.3 Diagram yang menunjukkan rerata kadar alkali fosfatase serum....	78
Gambar 5.4 Diagram yang menunjukkan rerata respons perubahan kadar alkali fosfatase serum.....	79
Gambar 5.5 Hubungan antara peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai dengan peningkatan efek penghambatan penurunan kepadatan tulang.....	91
Gambar 5.6 Hubungan antara peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai dengan peningkatan kadar alkali fosfatase serum.....	92

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Petanda biokimia tulang.....	26
Tabel 2.2 Beberapa kortikosteroid alami dan sintesis.....	39
Tabel 2.3 Efek kortikosteroid pada osteoblas-osteoklas.....	43
Tabel 2.4 Kandungan kalori, protein dan karbohidrat setiap 100 gram kedelai dan bahan makanan lainnya.....	50
Tabel 2.5 Kandungan asam amino kedelai dan beberapa macam bahan makanan (mg/g).....	51
Tabel 2.6 Kandungan gizi bahan olahan yang berasal dari kedelai per 100 gr...	52
Tabel 2.7 Beberapa bahan makanan kedelai dan produk-produknya yang merupakan sumber isoflavon dalam 100 mg bahan makanan tersebut.....	52
Tabel 5.1 Data hasil penimbangan berat badan (gram) hewan coba Sebelum dan setelah perlakuan masing-masing kelompok.....	73
Tabel 5.2 Data hasil pengukuran kepadatan tulang (m/dtk) dari masing-masing kelompok.....	74
Tabel 5.3 Data hasil pengukuran kadar alkali fosfatase dalam serum (IU/L) dari masing-masing kelompok.....	74
Tabel 5.4 Statistik deskriptif hasil penimbangan berat badan (gram) sebelum dan setelah perlakuan masing-masing kelompok.....	75
Tabel 5.5 Statistik deskriptif kepadatan tulang (m/dtk) dari masing-masing kelompok.....	76

Tabel 5.6	Statistik deskriptif respons perubahan kepadatan tulang (m/dtk) dari masing-masing kelompok terhadap kontrol.....	77
Tabel 5.7	Statistik deskriptif hasil pengukuran kadar alkali fosfatase dalam serum (IU/L).....	78
Tabel 5.8	Statistik deskriptif hasil pengukuran respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum (IU/L) terhadap kelompok kontrol.....	79
Tabel 5.9	Hasil uji normalitas data masing-masing kelompok terhadap kepadatan tulang (m/dtk) dan kadar alkali fosfatase dalam serum (IU/L).....	80
Tabel 5.10	Hasil uji normalitas data masing-masing kelompok terhadap respons perubahan kepadatan tulang (m/dtk) dan respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum (IU/L).....	81
Tabel 5.11	Hasil perhitungan uji multi varians untuk variabel kepadatan tulang (m/dtk) dan kadar alkali fosfatase dalam serum (IU/L).....	82
Tabel 5.12	Hasil perhitungan uji beda untuk kepadatan tulang (m/dtk) dan kadar alkali fosfatase dalam serum (IU/L).....	83
Tabel 5.13	Hasil perhitungan uji beda untuk respons perubahan kepadatan tulang (m/dtk) dan respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum (IU/L).....	84
Tabel 5.14	Hasil uji korelasi regresi linier antara peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai dengan peningkatan efek	

penghambatan penurunan kepadatan tulang dan peningkatan
kadar alkali fosfatase serum.....89

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Perhitungan dosis hewan coba menggunakan tabel Konversi Laurence & Bacharah.....	117
Lampiran 2. Konversi perhitungan dosis pemberian kortikosteroid dan ekstrak kedelai.....	118
Lampiran 3. Jumlah sampel.....	119
Lampiran 4. Pemberian maksimal volume larutan obat perlakuan pada hewan coba.....	120
Lampiran 5. Jadwal penelitian.....	121
Lampiran 6. Pembuatan ekstrak kedelai.....	122
Lampiran 7. Pembuatan larutan / suspensi.....	123
Lampiran 8. Prinsip tes pemeriksaan alkali fosfatase.....	124
Lampiran 9. Pakan tikus (P3 CP 524-2).....	125
Lampiran 10. Tabel berat badan hewan coba.....	126
Lampiran 11. Statistik deskriptif berat badan awal hewan coba (sebelum perlakuan) dan berat badan akhir hewan coba (setelah perlakuan).....	127
Lampiran 12. Data hasil pengukuran kepadatan tulang dan kadar alkali fosfatase dalam serum setelah mendapat perlakuan masing-masing kelompok.....	128
Lampiran 13. Hasil statistik deskriptif terhadap kepadatan tulang, respons perubahan kepadatan tulang, hasil pengukuran kadar alkali fosfatase dalam serum dan respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum.....	129
Lampiran 14. Perhitungan statistik dengan menggunakan <i>Uji Kolmogorov-Smirnov</i> untuk semua kelompok.....	130
Lampiran 15. Uji Tes Multivariat (<i>Multivariate Test</i>) terhadap variabel tergantung (kepadatan tulang dan kadar alkali fosfatase dalam serum).....	133
Lampiran 16. Uji beda pengaruh secara individu melalui	

uji beda terkecil (<i>Pairwise Comparisons</i>).....	134
Lampiran 17. Hasil perhitungan Uji Korelasi Regresi Linier.....	136

DAFTAR SINGKATAN

ALP	= Alkali phosphatase
BGP	= Bone Gla Protein
BMC	= Bone Mineral Content
BMD	= Bone Mass Density
BMPs	= Bone Morphogenic Proteins
cAMP	= cyclic Adenosine MonoPhosphate
CFU-S	= Colony Forming Unit Stem cell
CMC	= Carboxy Methyl Cellulose
CT	= Calcitonin
DBM	= Digital Bone Measurement
DEXA	= Dual Energy X-ray Absorpsiometry
DNA	= Deoxyribo Nucleic Acid
GM-CFU	= Granulocyte Macrophage Colony Forming Unit
HE	= Hematoxylin Eosin
IFN	= Interferon
IGF I	= Insulin-like Growth Factor I
IGF II	= Insulin-like Growth Factor II
IGFBPs	= Insulin-like Growth Factor Binding Proteins
IL	= Interleukin
ITP	= Idiopathic Thrombocytopenic Purpura
mRNA	= messenger Ribo Nucleic Acid

PGE ₂	= Prostaglandin E ₂
PTH	= Parathormon
QUS	= Quantitative Ultrasound
TGF-β	= Transforming Growth Factor β
TNF	= Tumor Necrosis Factor

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Osteoporosis merupakan keadaan tulang ditandai dengan penurunan pembentukan matriks tulang oleh osteoblas dan peningkatan penyerapan tulang oleh osteoklas sehingga menyebabkan penurunan jumlah total tulang (Salter, 1999). Osteoporosis didefinisikan sebagai kelainan skeletal khusus yang ditandai dengan rendahnya massa tulang dan kelainan mikroarsitektur jaringan tulang dengan suatu konsekuensi peningkatan kerapuhan tulang dan kerentanan terhadap resiko fraktur (WHO, 1994; Roeshadi, 1997).

Osteoporosis dapat diklasifikasikan sebagai osteoporosis primer yang mempunyai hubungan dengan proses penuaan dan penurunan aktivitas gonad; osteoporosis sekunder akibat dari beberapa gangguan endokrin, metabolik dan neoplastik (Apley, 1993).

Yang termasuk osteoporosis primer adalah osteoporosis pascamenopause dan osteoporosis senilis. Osteoporosis pascamenopause terjadi pada wanita yang mengalami menopause dan untuk waktu 10 tahun ke depan. Saat tersebut terjadi penurunan massa tulang yang dipercepat sekitar 3% pertahun dibandingkan normal sebesar 0,3% pertahun. Osteoporosis senilis terjadi pada wanita setelah lima belas tahun mengalami menopause dan pada laki-laki di usia yang sama yaitu pada dekade ketujuh atau kedelapan. Penurunan massa tulang keduanya sebesar 0,5% pertahun (Apley, 1993).

Osteoporosis sekunder adalah osteoporosis yang disebabkan oleh beberapa keadaan. Penyebab yang paling penting adalah hiperkortisonisme, defisiensi hormon gonad, hipertiroidisme, myeloma multiple, alkoholisme kronis dan immobilisasi (Apley, 1993; Riggs, Melton, 1995).

Osteoporosis sekunder akibat hiperkortisonisme dapat terjadi karena sindroma Cushing (hiperkortisonisme endogen) merupakan keadaan yang relatif jarang dan penggunaan kortikosteroid jangka panjang (hiperkortisonisme eksogen) yang merupakan keadaan lebih banyak dijumpai (Riggs, Melton, 1995).

Pemberian kortikosteroid yang lama menyebabkan penurunan massa tulang dan dapat diikuti timbulnya fraktur osteoporotik. Prevalensi terjadinya fraktur vertebra bervariasi dapat sebesar 34% pada pasien dengan arthritis reumatoid. Sedangkan pada pasien asma prevalensi terjadinya fraktur pada vertebra dapat sebesar 42% (Reginster et al, 1999).

Alkali fosfatase (*alkaline phosphatase*) dan alkali fosfatase tulang (*bone alkaline phosphatase*) merupakan enzim yang dihasilkan oleh sel tulang osteoblas dan dapat digunakan sebagai petanda biokimia untuk melihat aktivitas pembentukan tulang. Kedua enzim tersebut beredar dalam sirkulasi setelah dihasilkan oleh osteoblas (Roeshadi, 1997; Widijanti, Muchlison, 2003).

Estrogen merupakan hormon steroid yang diproduksi dalam tubuh (Guyton, 1997). Percobaan *invivo* estrogen dapat menurunkan resorpsi tulang sehingga dapat mencegah hilangnya massa tulang dikenal sehingga sebagai agen antiresorptif. Aksi estrogen juga terjadi secara tidak langsung yaitu melalui

penurunan sintesis sitokin yang berperan dalam stimulasi resorpsi tulang (Favus, 1993).

Penggunaan estrogen juga terbukti efektif dalam mencegah progresifitas terjadinya penurunan massa tulang akibat menopause pada osteoporosis pascamenopuse (Francis,1990; Sari,2000; Soehartono,2003).

Estrogen dapat dipakai untuk mencegah terjadinya penurunan massa tulang pada penggunaan kortikosteroid jangka panjang selain pemberian kalsium, sodium fluoride, vitamin D beserta metabolitnya dan bisfosfonat (Francis,1990; Head, 2003).

Fitoestrogen merupakan sekelompok campuran non-steroid tanaman yang memiliki kemampuan estrogenik. Fitoestrogen berperan pada sel dengan cara yang sama seperti estrogen (estradiol) tetapi memiliki efek samping yang lebih ringan daripada estrogen apabila diberikan dalam jangka waktu yang lama (Gilbert, 2003).

Fitoestrogen banyak terdapat dalam makanan berasal dari kedelai seperti kacang kedelai, tepung kedelai, tempe, tofu, susu kedelai (Anderson, 2003).

Indonesia merupakan negara agraris yang kaya akan tumbuh-tumbuhan salah satunya adalah kedelai. Kedelai beserta produknya banyak dijumpai dalam kehidupan sehari-hari. Berdasarkan uraian di atas peneliti merasa perlu melakukan penelitian sejauh mana ekstrak kedelai yang mengandung fitoestrogen dapat menghambat osteoporosis sekunder pada pemakaian kortikosteroid jangka panjang.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas maka rumusan masalahnya :

1. Apakah pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang dapat menghambat terjadinya penurunan kepadatan tulang ?
2. Apakah pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang dapat meningkatkan alkali fosfatase serum ?
3. Apakah peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang dapat meningkatkan penghambatan terjadinya penurunan kepadatan tulang ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Membuktikan pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang dapat menghambat terjadinya penurunan kepadatan tulang.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Membuktikan pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang dapat menghambat penurunan kepadatan tulang.
2. Membuktikan pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang dapat meningkatkan alkali fosfatase serum.
3. Membuktikan bahwa peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang dapat meningkatkan penghambatan terjadinya penurunan kepadatan tulang.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan sumbangan ilmiah bagi perkembangan terapi osteoporosis akibat pemakaian kortikosteroid jangka panjang.
2. Mengembangkan terapi osteoporosis dengan memanfaatkan sumber daya alam yang mudah didapat dan murah menggunakan ekstrak kedelai (fitoterapi).

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Anatomi Tulang

Secara anatomi tulang dapat diklasifikasikan menjadi :

- a. tulang panjang atau tulang tubuler, contohnya adalah femur
- b. tulang pendek atau tulang kuboid, contohnya adalah tulang-tulang carpal dan tarsal
- c. tulang pipih, contohnya adalah scapula

Masing-masing tulang terdiri dari tulang kortikal padat (*compactum*) terletak di sebelah luar yang dilapisi oleh *periosteum* dan tulang trabekuler merupakan bentukan seperti sepon di sebelah dalam (*spongiosa*) yang dilapisi oleh *endosteum* (Salter, 1999; Vigorita, 1999).

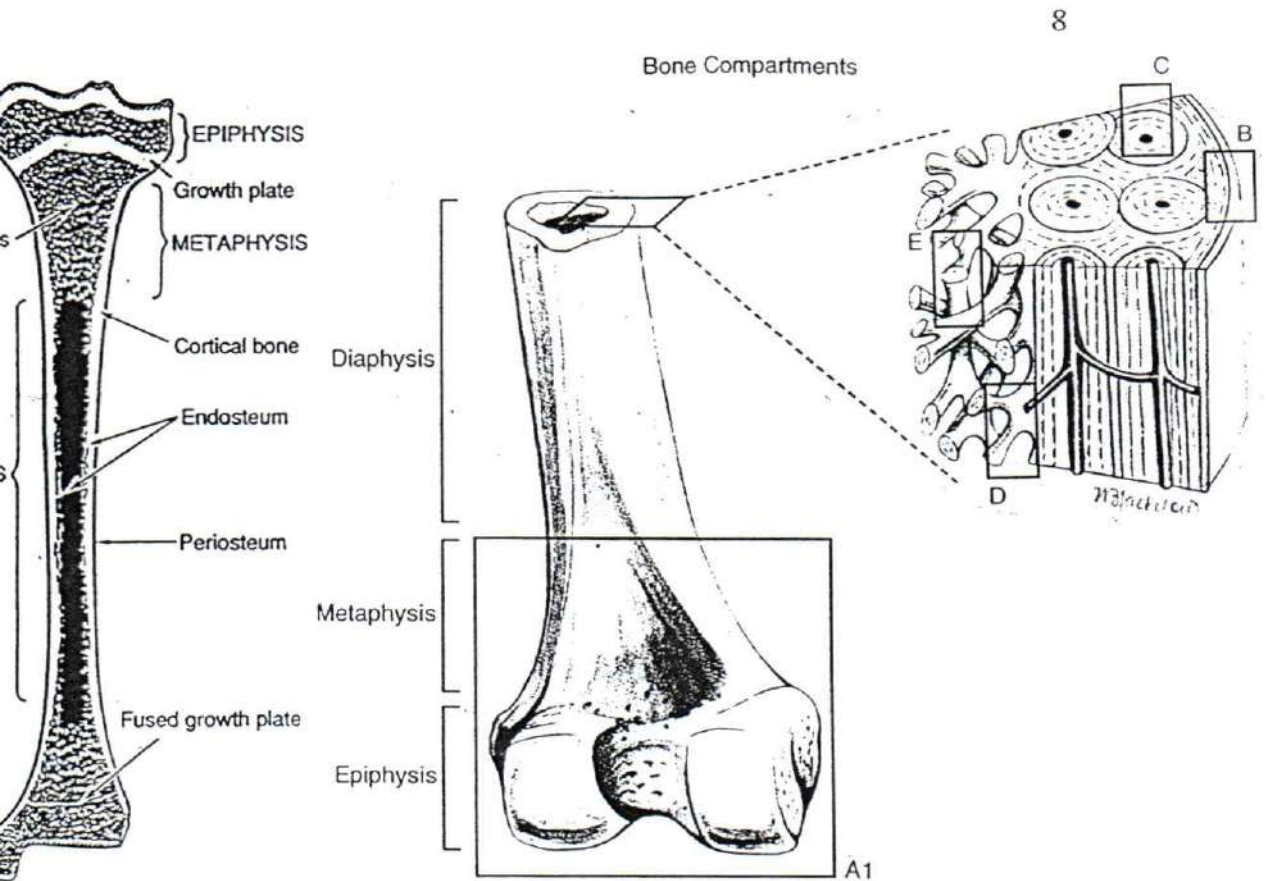
2.2 Struktur Tulang Panjang

Tulang panjang memiliki bagian-bagian yaitu :

- a. Epifisis yang merupakan ujung tulang mengandung tulang spongiosa / trabekuler berisi sumsum tulang warna merah tempat terjadinya hematopoiesis
- b. Metafisis merupakan daerah antara epifisis dan diafisis
- c. Diafisis atau *shaft* merupakan bagian tengah tulang panjang berbentuk silinder berupa tulang kortikal padat mengelilingi ruangan di tengahnya

- d. Ruang meduler (*medullary cavity*) merupakan ruang yang dibatasi oleh tulang kortikal di daerah diafisis dan berisi sumsum tulang berwarna kuning karena banyak mengandung lemak berwarna kuning
- e. Kartilago artikuler berupa kartilago hyalin menutupi epifisis berfungsi sebagai pelindung lunak epifisis dan memfasilitasi pergerakan sendi
- f. *Periosteum* merupakan serabut membran berupa serat-serat kolagen dan fibroblas menutupi permukaan luar tulang panjang kecuali pada daerah epifisis yang dilapisi oleh kartilago
- g. *Endosteum* merupakan lapisan tipis yang sedikit mengandung jaringan ikat melapisi seluruh permukaan ruang meduler
Periosteum dan *endosteum* berfungsi sebagai pemberi nutrisi tulang dan tempat persediaan osteoblas baru untuk keperluan perbaikan dan pertumbuhan tulang
- h. Lempeng epifisis (*epiphyseal line / epiphyseal plate*) terdapat diantara epifisis dan diafisis yang merupakan tempat pertumbuhan tulang memanjang

(Thibodeau, 1994; De Graaff, 1998; Junqueira, 1998)



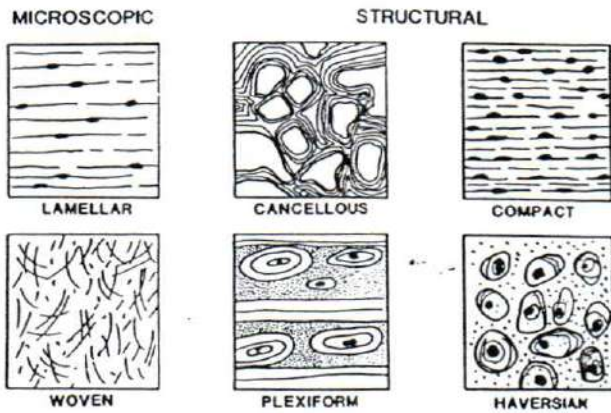
Gambar 2.1 Gambar tulang panjang (femur, tibia) yang terdiri atas tiga bagian epyphysis, metaphysis dan diaphysis. Pada potongan koronal tulang terdiri atas tulang kortikal dan tulang trabekuler (Bronner, 1991; Vigorita, 1999).

2.3 Histologi Tulang

Secara histologi tulang diklasifikasikan menjadi :

1. Tulang immatur (tulang non-lamellar / tulang woven / tulang fiber)
2. Tulang matur (tulang lamellar) yang terdiri dari :
 - a. tulang kortikal (*compactum*) merupakan 80% dari seluruh massa tulang
 - b. tulang trabekuler (*spongiosa*) yang merupakan 20% dari seluruh massa tulang

(Bronner, 1991; Apley, 1993; Salter, 1999; Bostrom, 2000)



Gambar 2.2 Gambaran mikroskopik tulang woven dan tulang lamellar (Bostrom, 2000).

2.4 Tulang Sebagai Struktur Anatomi dan Organ Fisiologi

Tulang merupakan organ tubuh yang berfungsi :

- a. memberi bentuk dan menegakkan tubuh (penyangga)
- b. tempat melekatnya otot dan membantu pergerakan (pergerakan)
- c. melindungi organ-organ dalam (pelindung)
- d. sebagai jaringan hematopoietik yang menghasilkan eritrosit, leukosit dan trombosit. (hematopoiesis)
- e. sebagai tempat penyimpanan kalsium, fosfor, magnesium, natrium dan mineral lainnya (penyimpanan mineral)

(Thibodeau, 1996; De Graaff, 1998; Salter, 1999)

Tulang merupakan jaringan khusus yang terdiri dari :

- a. substansi organik (30%) dengan komposisi
 - 1) matriks/substansi interseuler organik (98%) yang terdiri dari kolagen (95%) dan non-kolagen protein (5%) berupa osteokalsin, osteonektin, asam hyaluronat, khondroitin sulfat, proteoglikan, sikloprotein, proteolipid, fosfoprotein, protein morfogenik.
 - 2) sel-sel tulang (2%) yaitu osteoblas, osteosit dan osteoklas
- b. substansi anorganik /mineral (60%) yang paling penting adalah kalsium dan fosfor serta ion-ion lain seperti magnesium, natrium, karbonat, hidroksil, fluorid, kalium yang membentuk kristal hidroksiapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 (\text{OH})_2$
- c. air (10%)

(Bronner, Worrel, 1991; Salter, 1999; Tjokprawiro, 2000; Cook, 2000)

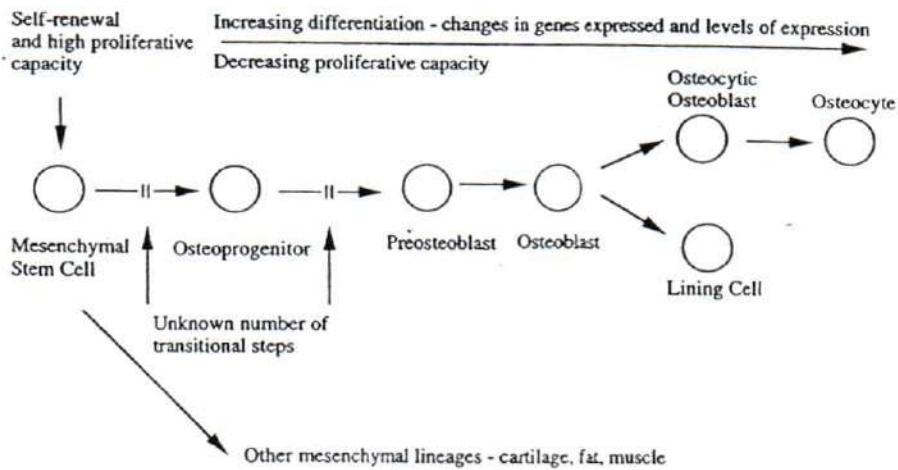
2.5 Sel Tulang

Sel-sel tulang terdiri dari osteoblas, osteosit dan osteoklas.

2.5.1 Osteoblas

Osteoblas merupakan sel pembentuk tulang, berasal dari sel-sel induk mesenkimal di sumsum tulang (*bone marrow stromal stem cell* atau *connective tissue mesenchymal stem cell*) (Favus, 1993; Riggs, Melton, 1995; Pritchard, 1996). Prekursor ini berproliferasi dan berdiferensiasi membentuk preosteoblas, *early osteoblas* dan selanjutnya menjadi *late osteoblas* (osteoblas matur).

Dengan menggunakan mikroskop cahaya osteoblas terlihat memiliki nukleus bulat pada dasar sel berlawanan dengan permukaan tulang, sitoplasma sangat basofilik, kompleks Golgi yang prominen diantara nukleus dan apeks sel.



Gambar 2.3 Jalur diferensiasi progenitor sel tulang dari sel stem mesenkimal menjadi osteoblas dan osteosit (Rosier, 2000).

Osteoblas selalu dijumpai berkelompok sekitar 100-400 sel sepanjang permukaan tulang (periosteum, endosteum, permukaan trabekula).

Osteoblas bertanggung jawab terhadap sintesis komponen matriks tulang (kolagen dan substansi dasar) sehingga mereka selalu terlihat berdekatan dengan matriks tulang yang mereka sintesis dan yang belum mengalami kalsifikasi (jaringan osteoid). Dalam keadaan aktif osteoblas

berbentuk bulat, oval, kuboid atau polihedral/kolumner (15 hingga 30 μm) tetapi dapat sekecil 1 μm berbentuk pipih bila dalam keadaan tidak aktif dan sering disebut sebagai *bone lining sel* (Bronner, Worrel, 1991; Smith, 1998).

Pada tingkat ultrastruktur terlihat adanya tonjolan sitoplasma yang kemudian masuk ke dalam matriks dan berhubungan dengan tonjolan osteosit melalui kanalikuli (Favus, 1993).

Membran plasma osteoblas banyak mengandung alkali fosfatase yang keberadaannya dalam serum dapat digunakan sebagai penunjuk pembentukan tulang dan terdapat reseptor untuk hormon paratiorid. Sedangkan reseptor estrogen dan vitamin D₃ terdapat pada nukleusnya (Favus, 1993; Geneser, 1994; Salter, 1999).

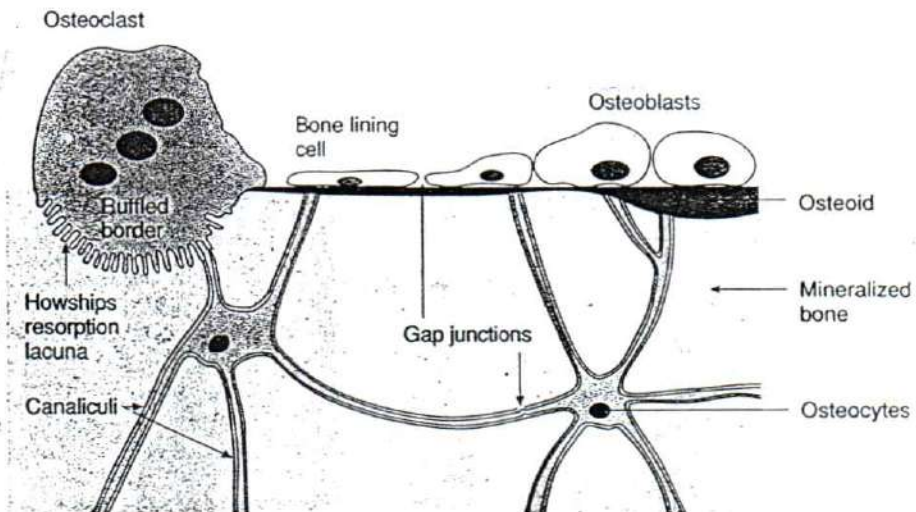
Menurut Onoe et al (1997) secara umum reseptor estrogen ada dua yaitu alfa dan beta, sedangkan yang banyak pada osteoblas adalah reseptor estrogen beta (Barnes, Kim, 2003).

2.5.2 Osteosit

Osteosit adalah osteoblas yang 'terkubur' dalam matriks yang dihasilkannya sendiri yang kemudian mengalami mineralisasi. Sel ini ditandai dengan perbandingan nukleus terhadap sitoplasma yang lebih tinggi dan mengandung sedikit organela.

Dengan menggunakan mikroskop cahaya osteosit tampak tersusun konsentrik di sekitar lumen dari osteon dan diantara lamela-lamela. Osteosit memiliki tonjolan-tonjolan sitoplasma disebut prosesus

membentuk hubungan dan komunikasi dengan osteosit-osteosit yang berdekatan melalui kanalikuli. Osteosit juga berhubungan dengan osteoblas pada permukaan tulang melalui prosesus yang terdapat dalam sistem kanalikuli (Bronner, Worrel, 1991; Junqueira, 1998; Bostrom, 2000).



Gambar 2.4 Gambar yang menunjukkan hubungan antar sel-sel tulang (Smith, 1998)

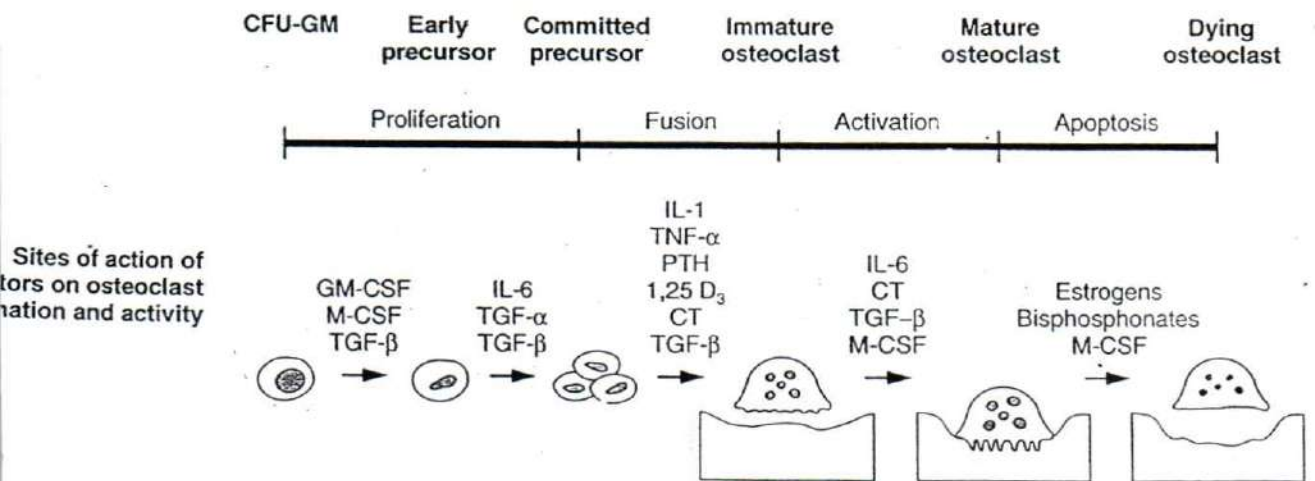
Prosesus osteosit sebagian besar terdiri atas mikrofilamen dengan diameter 5-7 nm (Vigorita, 1999).

Menurut Hosking (1994) sel ini diperkirakan menjawab mekanisme rangsangan gaya mekanik. Gaya fiselektrik ini mengakibatkan dikeluarkannya IGF I yang merangsang resting osteoblast menjadi aktif disamping merangsang pembentukan osteoblas baru (Roeshadi, 1997).

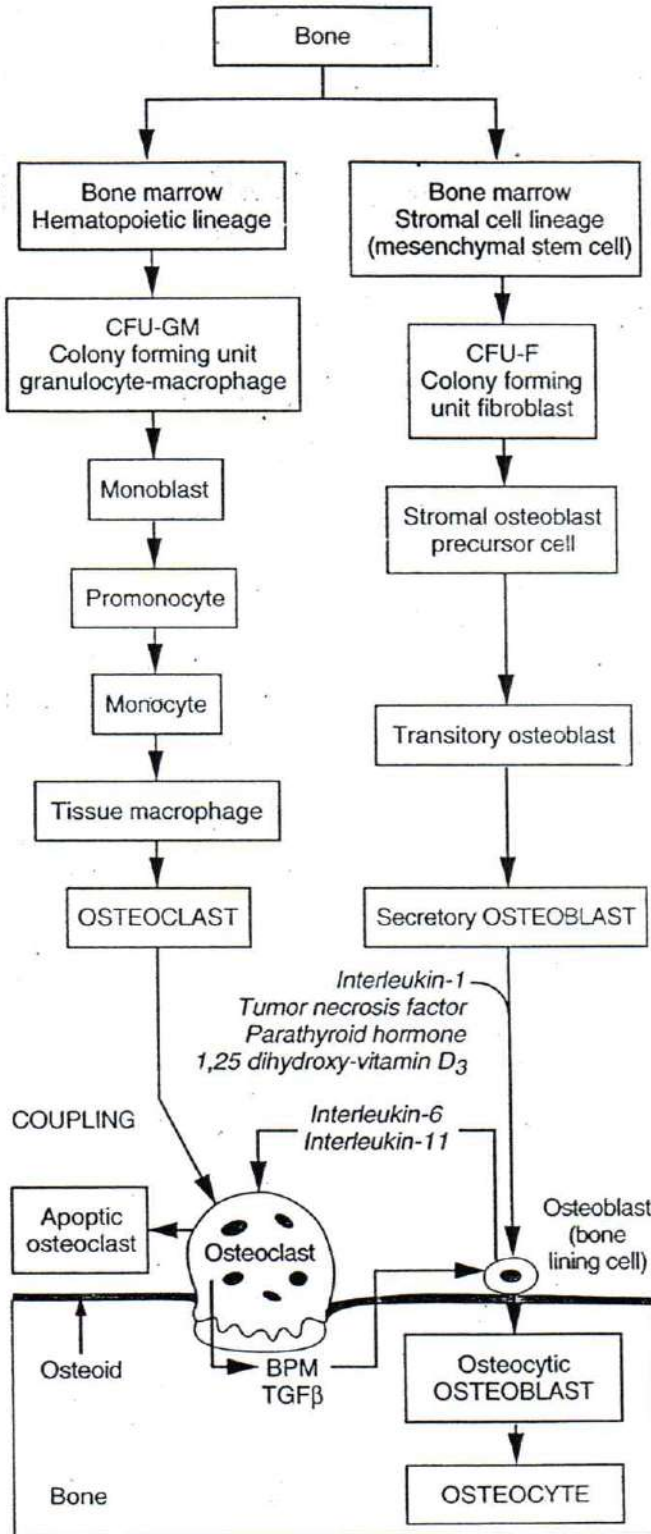
2.5.3 Osteoklas

Osteoklas merupakan sel yang bertanggung jawab terhadap resorpsi tulang. Osteoklas berasal dari sel-sel induk hematopoietik multipotensial (*multipotential hematopoietic stem cell/colony forming unit stem cell / CFU-S*) yang kemudian berdiferensiasi menjadi sel progenitor granulosit-makrofag (*granulocyte-macrophage colony forming unit / GM-CFU*) (Williams, 1998; Salter, 1999; Bostrom, 2000). Prekursor osteoklas mononuklear dapat masuk ke dalam sirkulasi. Pada permukaan tulang endosteal prekursor tersebut berproliferasi membentuk sel multinukleus raksasa (4-20 nukleus). Osteoklas merupakan sel yang motil biasanya dijumpai bersinggungan dengan permukaan tulang dan terdapat dalam lakuna (lakuna Howship) yang merupakan hasil aktivitas resorpsi osteoklas sendiri. Biasa dijumpai empat atau lima osteoklas dalam satu tempat resorpsi tetapi seringkali hanya satu atau dua. Dalam keadaan tidak aktif osteoklas berinti satu. Dengan mikroskop cahaya nukleus-nukleus tampak bervariasi dalam satu sel dapat bulat dan eukromatik atau berbentuk sangat ireguler dan heterokromatik, terletak di tengah, biasanya mengandung 1-2 nukleolus. Sitoplasma tampak seperti 'berbusa' dengan banyak vakuola. Bagian osteoklas yang bersinggungan dengan tulang disebut *ruffled border* dipakai untuk proses resorpsi dibatasi oleh bagian kecil yang padat disebut *sealing zone*.

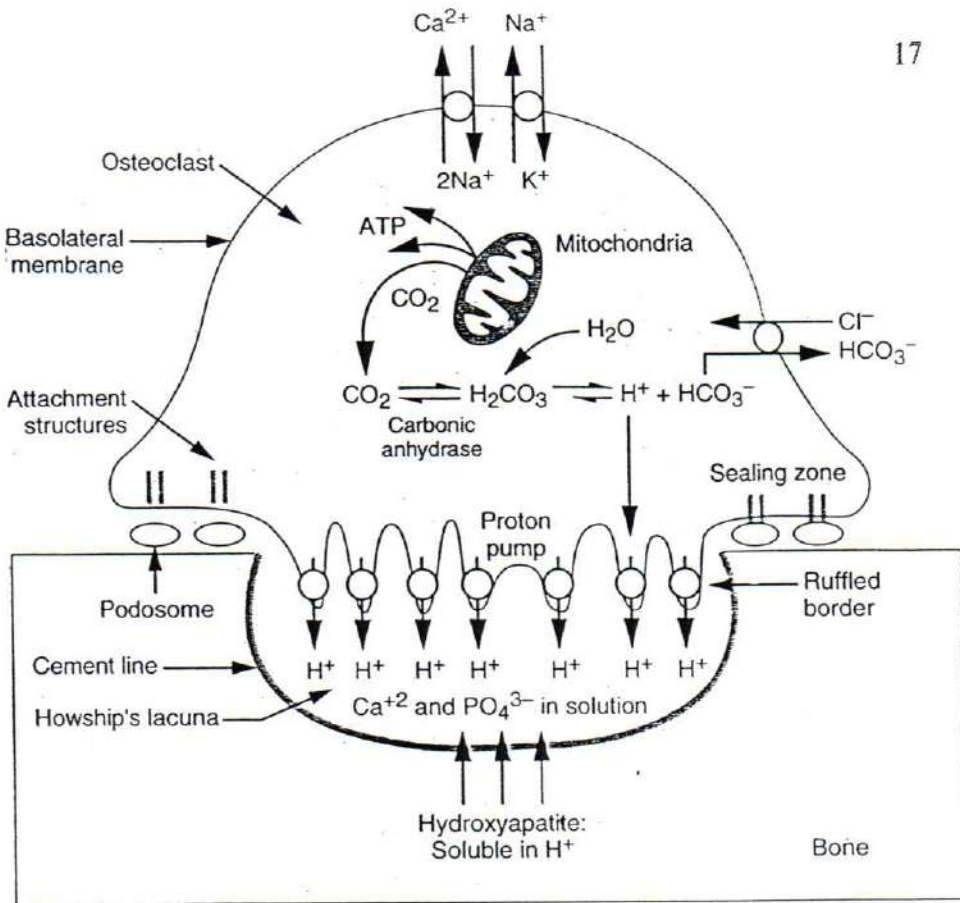
Gambaran ultrastruktur yang khas sel ini adalah banyaknya kompleks Golgi yang terletak di sekitar tiap nukleus dan mitokondria. Penempelan osteoklas pada matriks tulang melalui protein integrin (Favus, 1993; Williams, 1998; Bostrom, 2000).



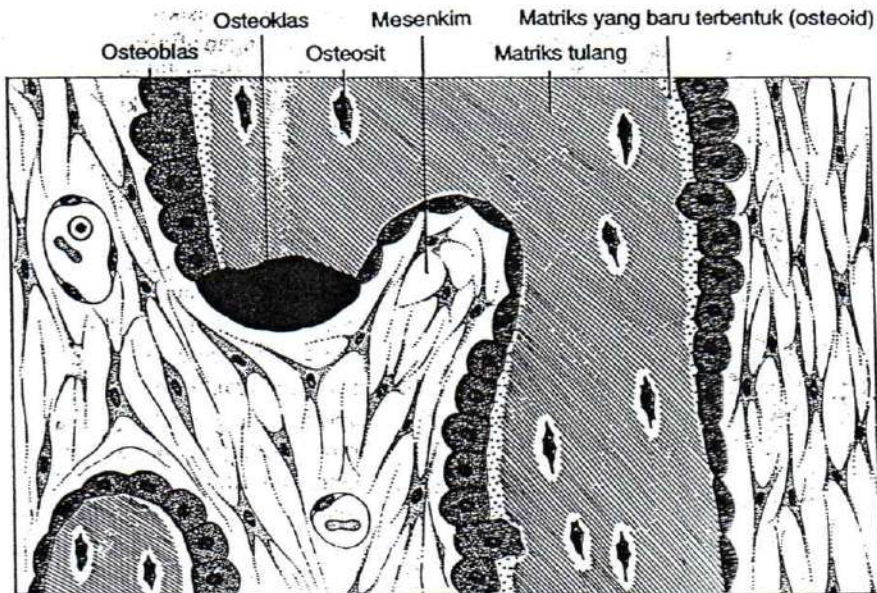
Gambar 2.5 Proses perkembangan osteoklas dari sel-sel induk hematopoietik multipotensial (GMCFU) (Vigorita, 1999).



Gambar 2.6 Gambar skematik asal, diferensiasi serta hubungan antara osteoblas, osteosit dan osteoklas (Vigorita, 1999)



Gambar 2.7 Gambar skematik osteoklas yang meresorpsi tulang menghasilkan lakuna Howship (Vigorita, 1999).



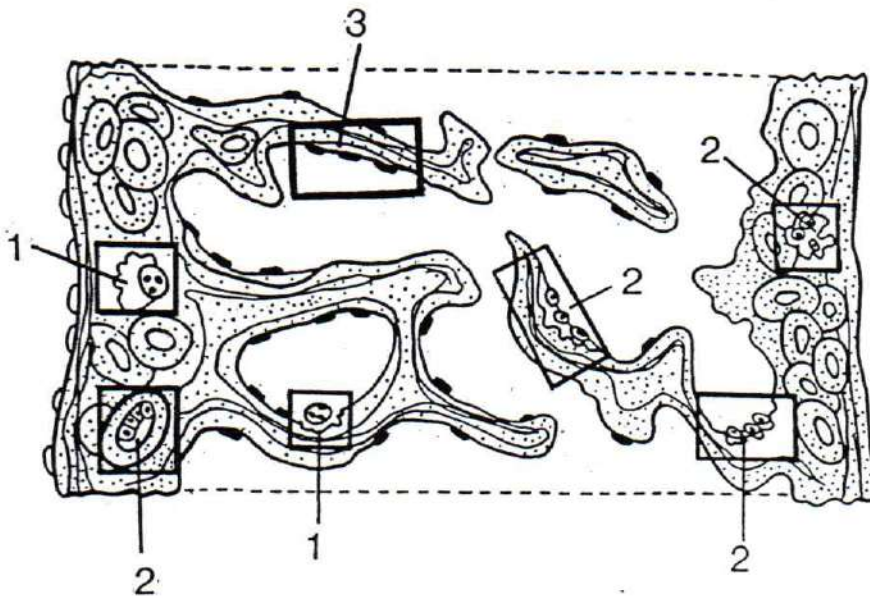
Gambar 2.8 Gambar skematik menunjukkan sel-sel tulang dalam satu lapang pandang dan osteoid (Junqueira, 1998)

2.6 Remodeling Tulang

Proses remodeling merupakan proses yang terjadi terus-menerus dalam tulang setelah tulang woven menjadi tulang lamellar. Proses remodeling ini berupa proses resorpsi tulang oleh osteoklas yang diikuti oleh proses pembentukan tulang oleh osteoblas secara berurutan dalam tulang (Salter, 1999; Vigorita, 1999; Bostrom, 2000). Masing-masing siklus remodeling berlangsung selama 4 sampai 6 minggu dan sel-sel tulang yang melakukan remodeling secara bersama-sama ini dikenal sebagai *bone remodelling unit* (Bronner, 1991; Apley, 1993).

Proses remodeling tulang bertujuan untuk menyesuaikan keadaan dengan kebutuhan mekanik yang diterima oleh tulang dan untuk mempertahankan keseimbangan biokimia tulang dengan cara memperbaiki kerusakan, memelihara tulang yang bahannya tersedia untuk homeostasis mineral (Bostrom, 2000).

Proses remodeling tulang terjadi pada tulang trabekuler maupun tulang kortikal. Proses ini terjadi pada daerah permukaan yaitu di periosteum, endosteum, kanal Havers pada tulang kortikal dan pada permukaan tulang trabekuler. Proses ini menghasilkan *plate-like structure* pada tulang trabekuler dan *cylindrical structure* pada tulang kortikal yang disebut *basic multicellular* atau *basic structural unit*. Tulang kortikal maupun tulang trabekuler mengalami siklus remodeling tulang yang sama. Kecepatan proses remodeling tulang trabekuler lebih besar 5 sampai 10 kali daripada tulang kortikal pada orang dewasa (Williams, 1998; Bostrom, 2000).



Gambar 2.9 Gambaran skematik yang menunjukkan tempat-tempat terjadinya remodeling tulang. Awalnya tulang diresorpsi oleh osteoklas pada tulang trabekuler maupun tulang kortikal (1). Proses pembentukan tulang oleh osteoblas mengikuti proses resorpsi tulang pada tempat yang sama (2). Kemudian osteoblas menjadi osteosit (3) (Bostrom, 2000).

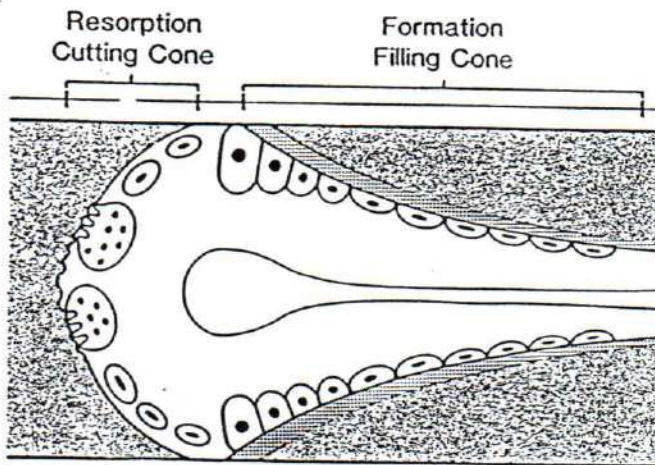
Dalam keadaan normal sebagian besar tulang dalam keadaan istirahat (inaktif / tidak mengadakan remodeling tulang) yaitu sebesar 80% permukaan tulang trabekuler dan tulang kortikal (periosteal dan endosteal). Pada keadaan tidak aktif ini tulang dilapisi oleh sel-sel pelapis tulang (*bone-lining cells*) yang berfungsi sebagai sel-sel prekursor osteogenik dan dapat menghasilkan membran endosteal suatu lapisan tipis 0,1 – 0,5 μm berupa jaringan ikat tidak termineralisasi dengan sedikit serabut kolagen dan substansi dasar amorphous yang lebih sedikit daripada yang dijumpai pada tulang (Bronner, 1991; Vigorita, 1999).

Urut-urutan remodeling tulang dibagi menjadi empat tahap yaitu tahap aktivasi, tahap resorpsi, tahap reversal (*coupling*) dan tahap pembentukan tulang-mineralisasi tulang.

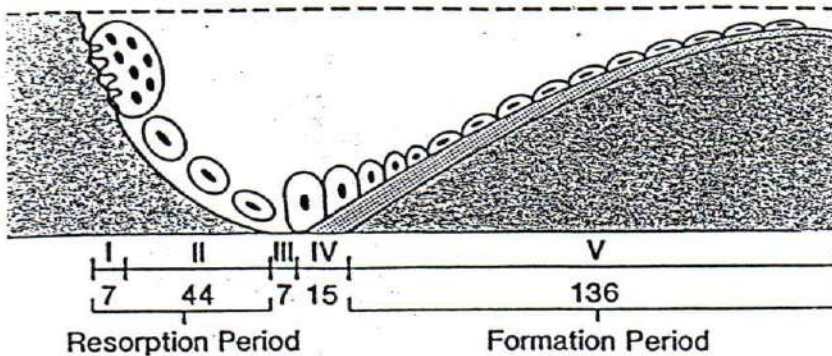
Tahap aktivasi merupakan awal terjadinya remodeling tulang dan osteoklas berperan utama dalam tahap ini. Aktivitas osteoklas ini dirangsang oleh sel

prekursor osteoblas. Adanya perubahan lingkungan lokal permukaan tulang karena faktor hormonal maupun kekuatan fisik akan menarik osteoklas ke tempat tersebut (*resorptive surface*).

Setelah melekat pada permukaan tulang osteoklas akan menurunkan pH di daerah tersebut dengan cara memproduksi ion-ion hidrogen melalui enzim karbonik anhidrase, enzim-enzim proteolitik seperti pepsin dan kolagenase. pH yang asam ini akan melarutkan hidroksiapatit dan protease asam yang disekresikan akan melarutkan kolagen matriks sehingga membentuk lakuna Howship pada tulang trabekuler atau kavitas resorpsi (*cutting cones*) pada tulang kortikal. Kedalaman rata-rata resorpsi ini sekitar 60 μm pada tulang trabekuler dan sekitar 100 μm pada tulang kortikal. Fase resorpsi ini berlangsung sekitar 1 hingga 3 minggu.

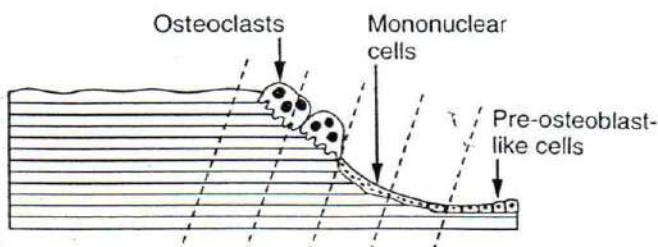


Gambar 2.10 Gambar skematik yang menunjukkan potongan longitudinal unit remodeling tulang kortikal. Osteoklas multinukleus dalam lakuna Howship yang memanjang dari kanan ke kiri dan secara radial melebar membentuk kavitas resorpsi (*cutting cone*). Kejadian ini kemudian diikuti dengan proses pembentukan tulang sehingga mengisi ruangan yang diresorpsi oleh osteoklas sebelumnya (Bronner, 1991).



Gambar 2.11 Gambar skematik yang menunjukkan remodeling tulang trabekuler selama keseluruhan proses remodeling. Remodeling dibagi menjadi tahap resorpsi oleh osteoklas (I, 7 hari), tahap resorpsi oleh sel mononuklear (II, 44 hari), tahap reversal (III, 7 hari), tahap mineralisasi awal (IV, 15 hari) dan tahap pembentukan tulang serta mineralisasi (V, 136 hari) (Bronner, 1991).

Tahap selanjutnya adalah tahap reversal yang merupakan interval antara proses resorpsi secara lengkap dengan permulaan proses pembentukan tulang. Penampakan histologik pada tahap reversal ini adalah hilangnya osteoklas pada lakuna Howship dan kavitas resorpsi digantikan oleh sel-sel mononuklear. Fungsi sel ini adalah fagositosis debris, sekresi substansi semen, sintesis dan sekresi mitogen osteoblas atau memfasilitasi mekanisme coupling yang selanjutnya diikuti oleh datangnya osteoblas pada daerah tersebut.



Gambar 2.12 Sel-sel mononuklear dan preosteoblas (Vigorita, 1999)

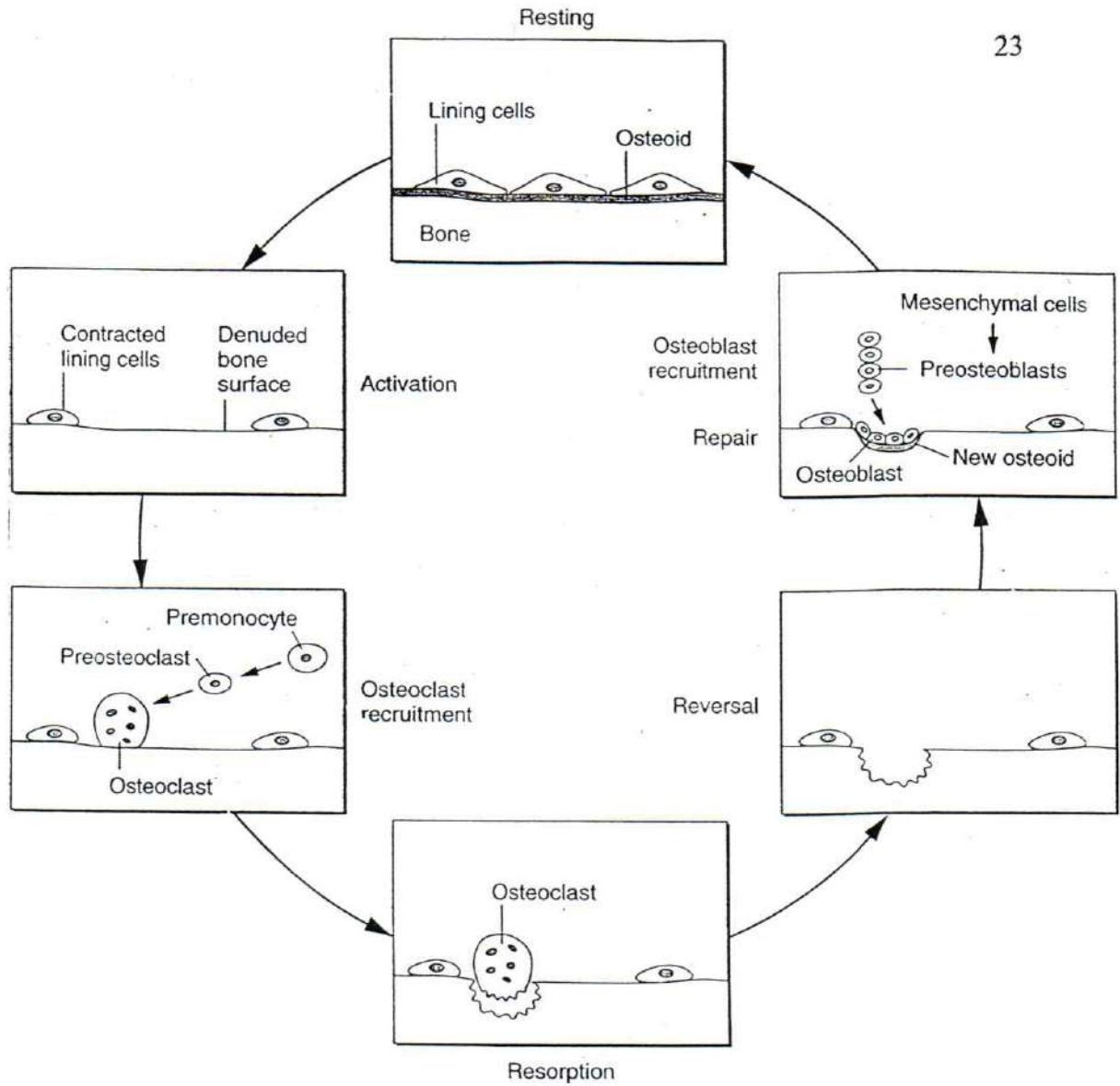
Tahap selanjutnya adalah tahap pembentukan tulang dan mineralisasi tulang, yang berlangsung dua tahap yaitu sintesis matriks dan mineralisasi. Segera setelah deposisi permukaan semen (garis reversal/*reversal line*) osteoblas yang baru tersebut mulai untuk menghasilkan matriks tulang yang dikenal sebagai osteoid. Osteoid ini akan mulai mineralisasi setelah kurang lebih lima hingga sepuluh hari. Kecepatan pembentukan matriks paling cepat ($2\mu\text{m}$ hingga $3\mu\text{m}$ perhari) pada saat osteoblas berbentuk kolumnar, padat dan tercat basofilik.

Bila pembentukan matriks hampir atau sudah berakhir osteoblas menjadi lebih datar dan melebar dengan sitoplasmanya yang kurang basofilik, osteoid yang terbentuk kemudian mengalami mineralisasi. Tulang trabekuler maupun tulang kortikal memakan waktu 4 bulan untuk mencapai satu siklus penuh remodeling sedangkan mineralisasi yang sempurna memerlukan 3 hingga 6 bulan.

Beberapa osteoblas diantaranya terkubur diantara matriks yang dihasilkannya sendiri menjadi osteosit, beberapa menjadi *bone-cell lining* dan beberapa menghilang akibat proses yang tidak diketahui. Permukaan tulang kemudian memasuki tahap istirahat kembali.

(Bronner, 19991; Favus, 1993; Pritchard, 1996; Williams, 1998; Ganong, 1999; Vigorita, 1999; Bostrom, 2000)

Proses remodeling terjadi secara berpasangan (fenomena *coupling*) dan dalam keadaan normal jumlah tulang yang dibentuk oleh osteoblas sama dengan jumlah tulang yang diresorpsi oleh osteoklas (Favus, 1993; Bostrom, 2000).



Gambar 2.13 Siklus remodeling tulang (Vigorita, 1999)

2.7 Petanda Biokimia Tulang

Petanda biokimia tulang dapat diukur dalam darah dan urine untuk melihat proses remodeling tulang. Petanda ini dikelompokkan menjadi dua yaitu petanda pembentukan tulang dan petanda resorpsi tulang (Riggs, 1995; Roeshadi, 1997; Widijanti, Muchlison, 2003).

Keunggulan dari pemeriksaan ini adalah tindakan tersebut tidak invasif dan bersifat lebih mewakili proses pembentukan tulang maupun proses resorpsi tulang secara keseluruhan dalam tubuh daripada pemeriksaan lainnya seperti pemeriksaan histomorfometri atau pemeriksaan histologi tulang yang hanya mencerminkan keadaan kedua proses tersebut dalam tulang yang diambil sebagai bahan pemeriksaan (Riggs, 1995).

2.7.1 Petanda pembentukan tulang

- a. Alkali fosfatase dihasilkan oleh tulang dan organ-organ lain seperti hati, usus, plasenta dan ginjal. Alkali fosfatase tulang dan hati merupakan isoenzim yang utama beredar dalam sirkulasi.
- b. Alkali fosfatase tulang (*bone alkali phosphatase*) dihasilkan oleh osteoblas dalam jumlah tinggi selama fase pembentukan tulang, dilepaskan ke sirkulasi dan merupakan petanda yang baik untuk melihat aktivitas pembentukan tulang.
- c. Osteokalsin / Protein Gla tulang (*bone gla protein/BGP*) diproduksi osteoblas selama mineralisasi matriks dan sintesisnya tergantung vitamin K. Sebagian kecil osteokalsin disekresikan ke dalam sirkulasi dan dapat diukur secara imunokimiawi. Osteokalsin juga diekskresikan lewat urine pada keadaan ginjal yang normal.
- d. Propeptida prokolagen tipe I dapat dipakai sebagai parameter untuk sintesis kolagen. Propeptida ini masuk ke dalam sirkulasi dengan rasio equimolar dengan kolagen yang baru dibentuk.

(Riggs, Melton, 1995; Roeshadi, 1997; Widijanti, Muchlison, 2003)

2.7.2 Petanda resorpsi tulang

- a. Kalsium urin puasa dapat diukur menggunakan sampel urin pagi hari merupakan pemeriksaan assay yang paling murah untuk proses resorpsi tulang. Pemeriksaan ini sangat berguna untuk mendeteksi adanya peningkatan resorpsi tulang tetapi sensitivitasnya kurang. Kalsium urin puasa menggambarkan jumlah kalsium yang dilepaskan selama proses resorpsi tulang oleh osteoklas.
- b. Hidroksiprolin berasal dari kolagen fibriler (50% dalam tulang) yang kaya akan hidroksiprolin dan hidroksilisin. Setelah degradasi kolagen keduanya diekskresikan melalui urine.
- c. Piridinolin dan Deoksipiridinolin *crosslink* merupakan penguat secara mekanik tulang menghubungkan molekul kolagen dengan fibril kolagen. Ketika terjadi penguraian tulang oleh osteoklas keduanya dilepaskan ke dalam urine.
- d. Fosfatase asam resisten-tartrat plasma (*Plasma Tartrate-Resistant Acid Phosphatase*) merupakan pemeriksaan proses resorpsi tulang yang dilakukan pada plasma. Fosfatase asam merupakan enzim lisosomal yang secara primer terdapat pada tulang, prostat, platelet, eritrosit dan lien. Isoenzim-isoenzim yang berbeda ini dapat dipisahkan dengan cara elektroforesis. Fosfatase asam tulang bersifat resisten terhadap L(+)-tartrat. Fosfatase asam bersirkulasi dalam darah dan menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi pada serum daripada pada plasma karena adanya proses pelepasan fosfatase platelet

selama proses kloting. (Riggs, Melton, 1995; Roeshadi, 1997; Widiyanti, Muchlison, 2003)

Tabel 2.1 Petanda biokimia tulang pada proses pembentukan tulang dan proses resorpsi tulang (Rigg, Melton, 1995)

Formation	Resorption
Serum	Plasma
Osteocalcin (bone gla-protein)	Tartrate-resistant acid phosphatase
Total and bone specific alkaline phosphatase	Pyridinoline and pyridinoline-containing peptides (?)
Procollagen I carboxyterminal extension peptide	Urine
	Urinary pyridinoline and deoxypyridinoline (collagen crosslinks) and containing peptides.
	Fasting urinary calcium and hydroxyproline
	Urinary hydroxylysine glycosides

2.8 Regulasi Hormonal dan Sitokin

Proses remodeling tulang yang diperankan oleh osteoklas dan osteoblas diatur secara sistemik ataupun secara lokal. Pengaturan sistemik dilakukan oleh hormon sedangkan lokal oleh sitokin, faktor pertumbuhan dan prostaglandin secara parakrin atau autokrin (Riggs, Melton, 1995; Williams, 1998).

Hormon merupakan zat kimia yang disekresikan ke dalam cairan tubuh oleh satu sel atau sekelompok sel dan mempunyai efek pengaturan fisiologis terhadap sel-sel tubuh lainnya (Guyton, 1997). Sitokin adalah substansi serupa hormon berupa protein yang dilepaskan oleh limfosit T dan B maupun sel-sel lainnya (makrofag, granulosit, sel endothel) pada reaksi imunologi atau reaksi inflamasi (respons imun seluler) yang berfungsi sebagai sinyal interseluler yang mengatur respons inflamasi lokal ataupun sistemik terhadap rangsangan dari luar (Abbas, 2000; Baratawidjaja, 2000; Kresno, 2001).

Beberapa hormon yang terlibat dalam proses pengaturan remodeling tulang adalah hormon paratiroid (PTH), kalsitriol (1,25 dihidroksikolekalsiferol), kalsitonin, estrogen, androgen, glukokortikoid, insulin, hormon pertumbuhan melalui IGF I dan hormon tiroid (Apley, 1993 ; Favus, 1993 ; Riggs, Melton, 1995; Pritchard, 1996; Williams, 1998; Ganong, 1999; Salter, 1999; Bostrom, 2000).

Sedangkan beberapa sitokin yang terlibat dalam proses pengaturan remodeling tulang adalah interleukin 1, interleukin 6, interleukin 11 (IL 1, IL 6, IL 11); *Transforming Growth Factor* (TGF) β , *Tumor Necrosing Factor* (TNF), *Insulin-like Growth Factor I* (IGF I), *Insulin-like Growth Factor II* (IGF II), Interferon (IFN), *Bone Morphogenic Proteins* (BMPs) (Riggs, Melton, 1995; Bostrom, 2000).

Aktivitas osteoblas akan dirangsang oleh hormon paratiroid, kalsitriol, IL 1, T3-T4, IGF 1, hGH, PGE₂, TNF, estrogen dan dihambat oleh kortikosteroid.

Sedangkan beberapa hormon yang merangsang osteoklas adalah hormon paratiroid, kalsitriol, IL 1, IL 6, IL 11; dihambat oleh kalsitonin, estrogen, TGF β , IFN α , PGE₂.

(Favus, 1993; Riggs, Melton, 1995; Ganong, 1999; Bostrom, 2000).

Hormon Parathyroid

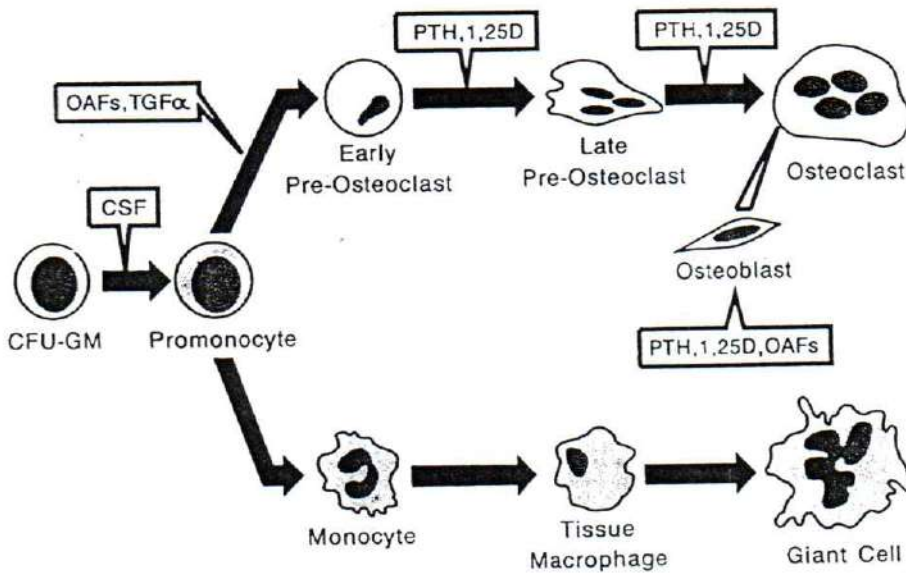
Hormon parathyroid (PTH) dihasilkan oleh kelenjar parathyroid yang terletak di belakang kelenjar thyroid satu kelenjar di belakang setiap kutub atas dan kutub bawah kelenjar thyroid (Guyton, 1997).

Hormon ini berfungsi dalam mempertahankan konsentrasi kalsium ekstraseluler pada kadar yang sangat sempit. Produksi dan pelepasan PTH distimuli oleh keadaan turunnya kalsium plasma pada kadar tertentu di bawah normal.

Konsentrasi normal kalsium plasma dan cairan ekstraseluler 2,2 – 2,6 mmol/L atau 8,8 – 10,4 mg/dl (Apley, 1993).

Target organ PTH adalah tubulus renalis, tulang dan sel-sel usus. Pengaruh PTH pada tubulus renalis menyebabkan peningkatan ekskresi fosfat sehingga menyebabkan peningkatan reabsorpsi kalsium. Hal ini akan mengkompensasi perubahan setiap perubahan kadar kalsium plasma secara cepat. Pengaruh PTH pada sel-sel usus terjadi secara tidak langsung. PTH menyebabkan konversi vitamin D menjadi metabolit aktifnya dalam ginjal. Metabolit aktif vitamin D inilah (1,25 dihidroksikolekalsiferol) akan menyebabkan peningkatan absorpsi kalsium (Apley, 1993; Guyton, 1997; Salter, 1999).

Pada tulang PTH menyebabkan peningkatan resorpsi tulang oleh osteoklas dan menyebabkan pelepasan kalsium dan fosfat dalam darah. PTH merupakan hormon peresorpsi tulang yang poten. Hormon ini menyebabkan peningkatan jumlah maupun aktivitas osteoklas melalui peningkatan pembentukan osteoklas dari sumsum tulang yang berasal dari sel-sel hematopoietik multipotensial membentuk osteoklas yang multinukleus. Pengaruh PTH pada osteoklas tidak secara langsung karena reseptor PTH tidak dijumpai pada osteoklas, reseptor hormon ini dijumpai pada osteoblas. Menurut Rouleau et al reseptor PTH banyak terdapat pada sel-sel yang memproduksi matriks dari *bone-lining cell* dan hanya sedikit terdapat pada osteoblas yang matur (Bronner, 1991; Favus, 1993; Riggs, Melton, 1995).



Gambar 2.14 Bersama dengan kalsitriol, PTH berpengaruh pada proses pembentukan osteoklas multinukleus yang berasal dari sel-sel hematopoietik multipotensial (Favus, 1993).

Kalsitonin

Kalsitonin (CT) merupakan hormon yang disekresi oleh sel-sel C (*clear cells*) kelenjar thyroid. Hormon ini bertindak berlawanan dengan hormon parathyroid yaitu menekan resorpsi tulang dan meningkatkan ekskresi kalsium melewati ginjal. Sekresi hormon ini terjadi bila terdapat peningkatan kadar kalsium serum di atas 2,25 mmol/l (9mg/dl) (Bronner, 1991; Apley, 1993; Salter, 1999).

Kalsitonin merupakan hormon sangat poten yang langsung menghambat aktivitas osteoklas dan pembentukan osteoklas karena sel ini memiliki banyak reseptor kalsitonin yaitu sekitar 300.000 tiap selnya. Kalsitonin dapat menyebabkan hilangnya *ruffled border* yaitu bagian osteoklas yang merupakan tempat resorpsi, menyebabkan kontraksi sitoplasma membran sel osteoklas yang

berhubungan dengan kemampuannya untuk menghambat resorpsi tulang, menyebabkan dissolusi osteoklas matur menjadi sel-sel mononuklear. Kalsitonin dapat juga menghambat pembentukan osteoklas, menghambat proliferasi dan menghambat diferensiasi osteoklas. Efek kalsitonin pada osteoklas ini diperantarai oleh cAMP (Bronner, 1991; Favus, 1993; Riggs, Melton, 1995).

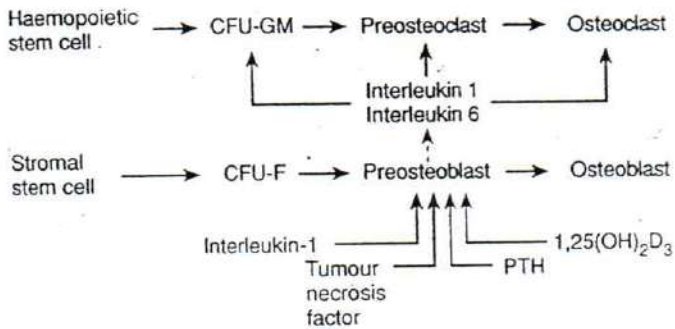
Interleukin

Interleukin merupakan sitokin yang berperan dalam penghantaran sinyal pada pengaturan proses remodeling tulang. Interleukin bekerja secara langsung pada sel-sel tulang karena mereka berasal dari sel-sel sumsum dan ada pada lingkungan mikro tulang atau karena mereka disintesis oleh sel-sel tulang (Favus, 1993).

Osteoblas menstimuli pembentukan IL-1 oleh sel-sel mononuklear (monosit) darah tepi ataupun oleh osteoblas. Selanjutnya IL-1 menstimuli produksi PGE₂, IL-6 dan IL-8 oleh sel-sel osteoblas. IL-1 juga menstimuli pembentukan osteoklas. Reseptor IL-1 banyak dijumpai di osteoblas. Interleukin ini merupakan stimulator osteoklas yang kuat, berpengaruh terhadap semua tahap pembentukan dan aktivasi osteoklas. IL-1 menstimuli proliferasi sel-sel progenitor dan diferensiasi prekursor-prekursor menjadi sel-sel yang matur. Juga mengaktivasi osteoklas multinukleus matur secara tidak langsung melalui sel lain (*bone-lining cells*). (Favus, 1993; Riggs, Melton, 1995).

Interleukin 6 diproduksi oleh makrofag, sel-sel endothelial, fibroblas serta osteoblas sebagai respons terhadap IL-1. Interleukin 6 bersama dengan interleukin 1 dan Tumor Necrosis Factor (TNF) memperantarai peningkatan resorpsi tulang akibat adanya defisiensi estrogen. Interleukin 1 meningkatkan sintesis interleukin 6

yang akan meningkatkan resorpsi tulang akibat adanya proses rekrutmen osteoklas. Sintesis IL-6 dikurangi oleh adanya estrogen dan ini dapat menjelaskan terjadinya penurunan resorpsi tulang setelah pemberian estrogen (Favus, 1993; Riggs, Melton, 1995).



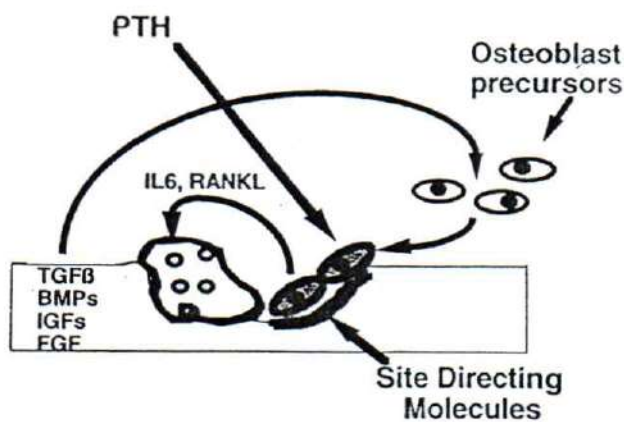
Gambar 2.15 Hubungan antar sel-sel tulang, prekursor-prekursornya, sitokin dan hormon (Smith, 1998)

Transforming Growth Factor β (TGF β)

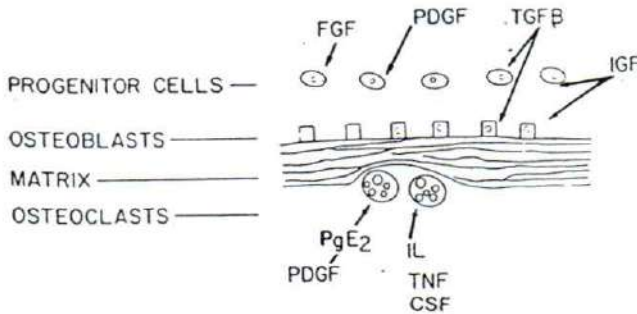
Transforming Growth Factor β (TGF β) merupakan polipeptida multifungsional yang tidak hanya diproduksi oleh sel-sel imun tetapi juga dilepas dari matriks ekstraseluler tulang pada saat proses resorpsi tulang. TGF β memiliki efek yang unik pada osteoklas. Polipeptida ini menghambat pembentukan osteoklas dengan cara menghambat proliferasi maupun diferensiasi prekursor-prekursor osteoklas. Selain itu TGF β juga secara langsung menghambat aktivitas osteoklas matur dengan cara menurunkan pembentukan superoksida dan menghambat penumpukan fosfatase asam resistan tartrat pada osteoklas.

TGF β juga memiliki efek yang kuat pada osteoblas yaitu menstimuli replikasi sel-sel prekursor osteoblas, efek perangsangan secara langsung sintesis kolagen tulang sehingga meningkatkan pembentukan tulang yang termineralisasi.

TGF β merupakan faktor pivotal pada proses remodeling. TGF β yang dilepaskan selama proses resorpsi tulang (berasal dari matriks ekstraseluler tulang) mempunyai kemampuan sebagai penghambat endogen alami terhadap proses resorpsi tulang yang masih berlangsung. Sementara itu pada saat yang bersamaan polipeptida tersebut mampu menstimuli osteoblas untuk mengadakan proses pembentukan tulang baru (Bronner, 1991; Favus, 1993; Riggs, Melton, 1995; Rosier, 2000).



Gambar 2.16 Gambar yang menunjukkan komunikasi antara osteoklas dengan osteoblas diperankan oleh TGF β . TGF β akan dilepas setelah proses resorpsi tulang berasal dari matriks tulang, kemudian TGF β akan menstimuli prekursor-prekursor osteoblas untuk berdiferensiasi menjadi osteoblas matur dan memulai proses pembentukan tulang baru (Rosier, 2000).



Gambar 2.17 Pengaturan proses pembentukan tulang dan resorpsi tulang oleh sitokin dan beberapa faktor pertumbuhan (*growth factor/GF*) termasuk TGF β dan IGF (Favus, 1993)

Insulin-like Growth Factor I (IGF I)

Insulin-like Growth Factor I (IGF I) merupakan kelompok dari IGF secara keseluruhan selain IGF II. IGF I dan IGF II disintesis oleh banyak jaringan termasuk tulang dan memiliki efek biologik yang sama meskipun IGF I lebih kuat 4 hingga 7 kali lipat daripada IGF II.

IGF I mempunyai efek memperbesar sintesis matriks dan kolagen tulang serta menstimuli replikasi sel-sel osteoblas. Efek IGF I secara langsung memodulasi fungsi diferensiasi osteoblas. IGF I juga menurunkan degradasi kolagen tulang. Karena efeknya sangat signifikan pada fungsi sel tulang, IGF I memainkan peran yang fundamental dalam proses pembentukan tulang dan dalam mempertahankan massa tulang (Favus, 1993; Riggs, Melton, 1995).

Sintesis dan pengikatan IGF I pada reseptornya di sel-sel tulang diatur oleh hormon dan oleh faktor-faktor lokal. PTH yang menstimuli cAMP dalam sel-sel tulang merupakan stimulator mayor sintesis IGF I. Glukokortikoid menghambat

sintesis IGF I skeletal dan ini penting dalam mekanisme aksi penurunan proses pembentukan tulang dan massa tulang oleh glukokortikoid.

Faktor-faktor lokal seperti prostaglandin E₂ juga memperbesar sintesis IGF I dan pengikatan IGF I IGF II pada sel-sel tulang. β_2 mikroglobulin suatu polipeptida yang ditemukan dalam serum dan pada permukaan hampir seluruh sel-sel mamalia memiliki efek stimulatori yang sama seperti IGF I dan IGF II pada proses pembentukan tulang akibat dari peningkatan pengikatan IGF pada reseptornya di osteoblas (Bronner, 1991; Favus, 1993; Riggs, Melton, 1995).

Sel-sel tulang juga mensekresi protein-protein pengikat IGF (*IGF binding protein/IGFBPs*). Sejauh ini ada enam IGFBPs yang telah teridentifikasi dan dikenal sebagai IGFBP 1-6 tetapi hanya IGFBPs 1 yang menstimuli sintesis sel-sel tulang. IGFBPs mampu memperpanjang waktu paruh IGF, menetralkan atau memperbesar aktivitas biologik IGF dan berperan dalam transpor IGF menuju sel-sel targetnya. Pengaturan sintesis IGFBPs oleh sel-sel tulang merupakan hal yang kompleks. Pengaturan sintesis beberapa IGFBPs melalui cAMP dan lainnya di bawah kendali IGF I IGF II. Hal ini menunjukkan keberadaan mekanisme umpan balik lokal untuk mencegah paparan yang berlebihan dari sel-sel tulang terhadap IGF (Favus, 1993; Riggs, Melton, 1995).

Prostaglandin E (PGE)

Prostaglandin berperan dalam proses resorpsi tulang dan proses pembentukan tulang secara *invivo* maupun *invitro*. *Invivo* pemberian indomethacin suatu penghambat sintesis prostaglandin akan menurunkan proses pembentukan tulang hal ini membuktikan bahwa prostaglandin terlibat dalam proses tersebut.

Pemberian prostaglandin E_1 ataupun E_2 pada hewan ataupun pada manusia akan menstimuli proses pembentukan tulang periosteal maupun endosteal. Pada hewan coba prostaglandin meningkatkan proses pembentukan tulang maupun proses resorpsi tulang tetapi proses pembentukan tulang jelas lebih banyak (keseimbangan positif). *In vitro* PGE_2 secara primer diproduksi oleh *bone-lining cells* (*osteoblast-lineage cells*) akan berpengaruh pada sel-sel osteoblas maupun osteoklas. Faktor-faktor yang dapat meningkatkan produksi PGE adalah stimuli mekanik, hormon parathyroid, IL-1, TGF β , kalsitriol dan bradikinin. PGE menstimuli proliferasi sel dan produksi kolagen serta replikasi preosteoblas sesuai dengan efek osteogenik *in vivo*. Pada sel-sel osteoblas PGE menstimuli sintesis dan sekresi IGF I (Bronner, 1991; Favus, 1993; Riggs, Melton, 1995; Rosier, 2000).

Pada kultur organ PGE_1 dan PGE_2 merupakan stimulator kuat terhadap resorpsi tulang yang diperankan oleh sel osteoklas. Prostaglandin menstimuli pembentukan osteoklas multinukleus dari sel-sel progenitor sumsum tulang (Bronner, 1991; Favus, 1993; Riggs, Melton, 1995; Rosier, 2000).

Osteopontin

Osteopontin merupakan protein matriks non-kolagen yang diisolasi dari tulang. Osteopontin yang disintesis oleh osteoblas dan osteosit ini tersimpan pada matriks tulang dan berfungsi sebagai pengikat hidroksiapatit (Merry K, 1993; Riggs BL, Melton LJ, 1995). Osteopontin merupakan *phosphoglycoprotein* yang bersifat asam dan dapat bertindak sebagai sitokin yang merupakan penghantar sinyal intraseluler bagi pergerakan osteoklas (Riggs, Melton, 1995; Yuliati, 2002).

Osteopontin dapat menstimuli keberadaan dan motilitas osteoklas pada daerah resorpsi melalui efek autokrin terhadap osteoklas sehingga mempercepat terjadinya resorpsi tulang dan menghambat osteoblas pada daerah pembentukan tulang (Chellaiah, 2003).

2.9 Terapi Kortikosteroid

Kortikosteroid merupakan sekelompok hormon yang dihasilkan oleh korteks adrenal. Ada dua jenis kelompok hormon ini yaitu glukokortikoid dan mineralokortikoid. Mineralokortikoid terutama berpengaruh pada elektrolit cairan ekstraseluler terutama natrium dan kalium, glukokortikoid mempunyai efek yang penting pada glukosa darah. Hormon ini seluruhnya disintesis dari kolesterol steroid (Guyton, 1997, Greenspan, 2000).

Berdasarkan asalnya maka kortikosteroid dapat dibagi menjadi dua golongan :

- a. alami yaitu kortisol / hidrokortison
- b. sintetis seperti kortison, prednison, prednisolon, triamsinolon, parametason, betametason, deksametason, desoksikortison asetat.

(Schimmer, 1996; Laurence, 1997; Katzung, 2002)

Kortikosteroid banyak digunakan untuk terapi pada beberapa keadaan / penyakit diantaranya adalah :

- a. Terapi pengganti

Keadaan insufisiensi adrenokortikal akut / Krisis Addison, keadaan insufisiensi adrenokortikal kronik / Penyakit Addison, keadaan insufisiensi adrenokortikal iatrogenik, hipofungsi atau hiperfungsi adrenal

pada keadaan : hiperplasia adrenal kongenital, sindroma Cushing, aldosteronisme

b. Terapi Farmakologi pada keadaan-keadaan non adrenal

- 1) Reaksi-reaksi alergik : oedema angioneurotik, asma bronkiale, status asmatikus dan dermatitis kontak, sengatan lebah, reaksi-reaksi obat, rhinitis alergika, serum sickness, urtikaria.
- 2) Penggunaan dalam inflamasi sendi, otot dan tulang : arthritis, bursitis, tenosinovitis, myasthenia gravis.
- 3) Gangguan kolagen-vaskuler : arteritis giant cell cranial, sistemik lupus eritematosus, poliarteritis nodosa, reumatik polimialgia, polimiositis, arteritis temporalis
- 4) Penyakit mata : uveitis akut, konjungtivitis alergika, koroiditis, neuritis optika
- 5) Penyakit Gastrointestinal : colitis inflamatorik, sprue non-tropis, nekrosis hati subakut, proctitis, ileitis regional.
- 6) Gangguan hematologis : anemia hemolitik yang didapat, purpura alergika akut, leukemia, anemia hemolitik autoimun, purpura trombositopenik idiopatik (ITP), mieloma multipel.
- 7) Infeksi : Septikemia gram negatif untuk menekan inflamasi yang berlebihan
- 8) Gangguan neurologis : oedema serebri, sklerosis multiple
- 9) Transplantasi organ untuk mencegah reaksi penolakan (*rejection*)

- 10) Penyakit paru : Pneumonia aspirasi, asma bronkiale, pencegahan sindroma sulit bernapas pada bayi, sarkoidosis.
- 11) Gangguan ginjal sindroma nefrotik
- 12) Penyakit kulit : dermatitis atopi, dermatosis, lichen simpleks kronik, pemphigus, dermatitis seboroika, xerosis, eksim
- 13) Penyakit tiroid : eksoftalmus maligna, tiroiditis subakut
- 14) Lain-lain : Mountain / Altitude sickness akut, Hiperkalsemia akibat sarkoidosis dan akibat intoksikasi vitamin D, trichiniasis, demam rematik, Spondilitis ankylosing, pencegahan reaksi yang merugikan akibat pemberian media kontras, Penyakit Miscellaneous

(Suherman, 1995; Schimmer, 1996; Laurence, 1997; Katzung, 2002)

Beberapa kortikosteroid alami dan sintesis yang banyak dimanfaatkan untuk penggunaan terapi :

a. glukokortikoid :

- 1) kerja singkat hingga sedang : hidrokortison, kortison, prednison, prednisolon, metilprednisolon, meprednison.
- 2) kerja menengah : triamsinolon, paramethason, fluprednison
- 3) kerja lama : betametason, deksametason

b. mineralokortikoid : fludrokortison, desoksikortison asetat

Bentuk-bentuk prepatat yang tersedia adalah oral, injeksi, topical, pellet

(Laurence, 1997; Katzung, 2002).

Absorpsi kortikosteroid cukup baik bila diberikan secara peroral. Setelah diabsorpsi 90% akan terikat pada dua jenis protein plasma yaitu globulin pengikat

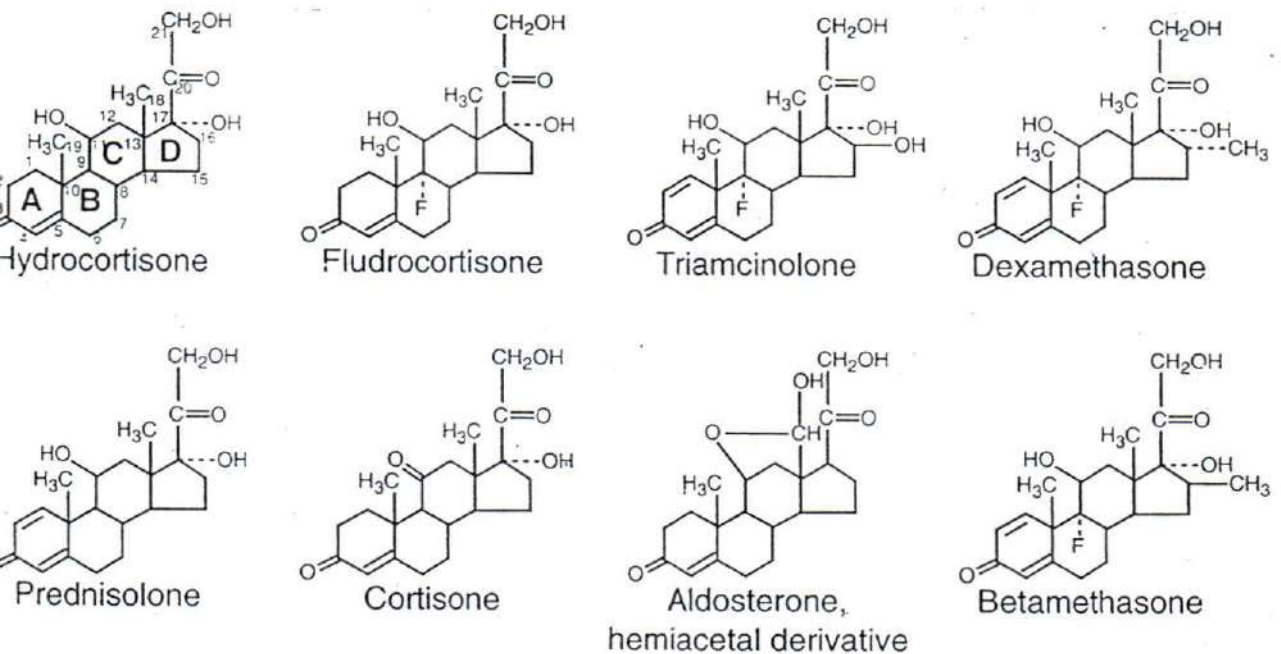
kortikosteroid (*corticosteroid-binding globulin* atau transcortin) dan albumin. Hanya fraksi bebas kortikosteroid saja yang mampu memasuki sel sehingga menimbulkan efek-efek kortikosteroid. Biotransformasinya terjadi di dalam hepar maupun di luar hepar dengan metabolit berupa senyawa inaktif atau berpotensi rendah. Sedangkan proses ekskresinya terjadi lewat ginjal yang keluar bersama dengan urine dan hampir tidak ada dalam feses maupun empedu (Suherman, 1995; Schimmer, 1996; Katzung, 2002).

Tabel 2.2 Beberapa kortikosteroid alami dan sintesis yang banyak dimanfaatkan untuk terapi (Katzung, 2002)

Agen	Aktivitas			Dosis Oral Ekuivalen (mg)	Bentuk-bentuk yang Tersedia
	Anti inflamasi	Topikal	Penahan garam		
Glucocorticoid kerja singkat hingga sedang					
<i>Hydrocortisone (cortisol)</i>	1	1	1	20	Oral, injeksi, topikal
<i>Cortisone</i>	0,8	0	0,8	25	Oral, injeksi, topikal
<i>Prednisone</i>	4	0	0,3	5	Oral
<i>Prednisolone</i>	5	4	0,3	5	Oral, injeksi, topikal
<i>Methylprednisolone</i>	5	5	0	4	Oral, injeksi, topikal
<i>Meprednisone²</i>	5		0	4	Oral, injeksi
Glucocorticoid kerja menengah					
<i>Triamcinolone</i>	5	5 ³	0	4	Oral, injeksi, topikal
<i>Paramethasone²</i>	10		0	2	Oral, injeksi
<i>Fluprednisolone</i>	15	7	0	1,5	Oral
Glucocorticoid kerja lama					
<i>Betamethasone</i>	25-40	10	0	0,6	Oral, injeksi, topikal
<i>Dexamethasone</i>	30	10	0	0,75	Oral, injeksi, topikal
Minerolcorticoid					
<i>Fludrocortisone</i>	10	10	250	2	Oral, injeksi, topikal
<i>Desoxycortisone acetate</i>	0	0	20		Injeksi, pellet

Glukokortikoid merupakan steroid yang memiliki efek jelas pada tulang dan metabolisme mineral. Pemberian jangka pendek pada konsentrasi fisiologis glukokortikoid menstimuli sintesis kolagen tulang melalui peningkatan pengikatan IGF I pada reseptornya. Sebaliknya pada pemberian jangka panjang sintesis kolagen tulang justru dihambat yang menyebabkan penurunan proses pembentukan tulang oleh osteoblas (Favus, 1993; Riggs, Melton, 1995).

Satu hal yang harus diperhatikan adalah kortikosteroid harus digunakan secara hati-hati pada beberapa keadaan termasuk osteoporosis (Suherman, 1995; Schimmer, 1996; Katzung 2002).



Gambar 2.18 Struktur beberapa kortikosteroid (Schimmer, 1996)

2.10 Osteopenia Akibat Penggunaan Kortikosteroid Jangka Panjang

Pemberian kortikosteroid (glukokortikoid) jangka panjang dapat menyebabkan penurunan kepadatan tulang (osteopenia) (Francis, 1990; Favus, 1993; Niewoehner, 1999). Angka kejadian fraktur (fraktur osteoporotik) yang merupakan salah satu gambaran klinik osteopenia akibat pemakaian kortikosteroid jangka panjang sebesar 8-18% bahkan pernah dilaporkan sebesar 34% hingga 42% (Favus, 1993; Reginster, 1999).

Pemberian prednisolon 30 mg/hari atau dosis lebih besar dalam jangka waktu lama dapat menyebabkan penurunan kepadatan tulang (Francis, 1990; Favus, 1993; Reginster et al, 1999). Menurut Ricker et al (1984) pemberian prednisolon 30 mg/hari selama 12 minggu menimbulkan penurunan kepadatan tulang kortikal maupun trabekuler (Francis, 1990; Reginster et al, 1999). Selain itu seseorang yang menerima terapi kortikosteroid sistemik yaitu prednison lebih dari 7,5 mg/hari selama 3 bulan atau lebih beresiko besar terjadi osteopenia (Niewoehner, 1999).

Fraktur (fraktur osteoporotik) pernah dilaporkan terjadi muncul paling cepat satu bulan setelah onset pemberian kortikosteroid. Pengamatan gambaran histologi menunjukkan bahwa terdapat peningkatan jumlah osteoklas dan permukaan resorpsi setelah pemberian kortikosteroid selama 6-8 minggu pada kelinci, 2-3 bulan pada seekor anjing dan rata-rata 4 bulan pada manusia. Peningkatan ekskresi hidroksiprolin melalui urine, penurunan absorpsi kalsium melewati usus dan peningkatan ekskresi kalsium bersama dengan urine terjadi dalam 30 hari pertama dimulainya terapi (Francis, 1990).

Terjadinya osteopenia merupakan hasil dari :

- a. penekanan langsung glukokortikoid terhadap aktivitas pembentukan tulang oleh osteoblas
- b. peningkatan resorpsi tulang akibat stimulasi hormon paratiroid oleh osteoklas

(Favus, 1993; Niewoehner, 1999)

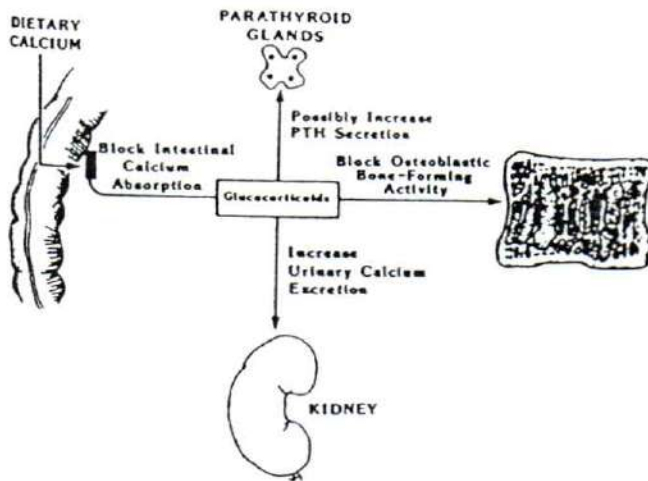
Patogenesis terjadinya osteopenia akibat adanya penekanan langsung kortikosteroid (glukokortikoid) terhadap aktivitas pembentukan tulang oleh osteoblas. Hal ini melalui penghambatan maturasi prekursor osteoblas, penekanan efek autokrin dari prostaglandin (PGE_2) dan faktor pertumbuhan (IGF) yang merangsang osteoblas dan peningkatan efek penghambatan paratiroid hormon terhadap fungsi osteoblas matur (Favus, 1993; Niewoehner, 1999).

Kortikosteroid menyebabkan penurunan absorpsi kalsium lewat sel intestinum. Penurunan ini akibat dari penghambatan secara langsung kortikosteroid terhadap fungsi sel mukosa intestinal. Hal ini dapat berakibat hiperparatiroidisme sekunder dan menyebabkan peningkatan penyerapan tulang oleh osteoklas.

Kortikosteroid juga meningkatkan secara langsung ekskresi kalsium lewat ginjal dan meningkatkan kepekaan osteoklas terhadap hormon paratiroid (Favus, 1993; Ziegler, 1998; Niewoehner, 1999; Patschan, 2001).

Tabel 2.3 Efek kortikosteroid pada osteoblas-osteoklas (Niewoehner, 1999)

<p>Effects that decrease bone formation</p> <ul style="list-style-type: none"> ↓ Bone protein synthesis ↓ Bone growth factors ↑ Collagen degradation ↓ Osteoblast number <p>Effects that increase bone resorption</p> <ul style="list-style-type: none"> ↓ Intestinal calcium absorption ↑ Renal calcium excretion ↑ Parathyroid hormone action ↓ Estrogen and androgen production
--



Gambar 2.19 Gambar skematik patogenesis osteopenia akibat glukokortikoid (Favus, 1993)

Penurunan kepadatan tulang lebih tampak pada tulang trabekuler karena permukaannya sebesar sekitar 80% permukaan tulang sehingga fraktur osteoporotik sering terjadi di costa, vertebra, ujung-ujung tulang panjang (Apley, 1993; Favus, 1993; Salter, 1999).

2.11 Estrogen

Estrogen dihasilkan oleh sel teka dan sel granulosa folikel ovarium dalam jumlah besar pada wanita, sebagian kecil oleh korteks adrenal baik pada wanita maupun pria dan oleh jaringan plasenta pada wanita hamil dalam jumlah besar (Guyton, 1997; Ganong, 1999; Greenspan, 2000).

Hanya tiga estrogen yang ada dalam jumlah bermakna dalam plasma yaitu β -estradiol, estron dan estriol. Estrogen utama yang disekresi ovarium adalah β -estradiol. Estron juga disekresi dalam jumlah kecil tetapi sebagian besar estron dibentuk di jaringan perifer dari androgen yang disekresi oleh korteks ginjal dan sel teka ovarium. Sedangkan estriol merupakan estrogen yang lemah merupakan produk oksidasi berasal dari estradiol maupun estron yang terjadi di hati.

Potensi β -estradiol 12 kali lipat lebih besar daripada estron dan 80 kali lipat lebih besar daripada estriol. Karena itu β -estradiol dianggap sebagai estrogen utama meskipun efek estrogenik estron tidak dapat diabaikan (Suherman, 1995; Guyton, 1997).

Estrogen memiliki reseptor yang disebut reseptor estrogen. Reseptor estrogen ada dua yaitu reseptor estrogen α dan reseptor β .

Reseptor α terdapat dalam inti dan kompleks hormon-reseptor ini kemudian berikatan dengan DNA untuk membentuk mRNA sehingga terjadi sintesis protein baru yang menyebabkan perubahan fungsi sel.

Reseptor β banyak dijumpai dalam jaringan-jaringan tertentu yang peka terhadap estrogen seperti tulang dan kandung kencing. Ini yang menerangkan bahwa

estrogen memiliki efek yang berguna pada tulang maupun kandung kencing (Ganong, 1999; Barnes, 2003).

Efek estrogen pada tulang rangka menyebabkan :

- a. Meningkatnya aktivitas osteoblas, sehingga pada waktu pubertas ketika masuk pada masa reproduksi laju pertumbuhannya menjadi cepat selama beberapa tahun
- b. Terjadinya penggabungan awal epifisis dengan batang tulang panjang, efek ini lebih kuat pada wanita dibandingkan dengan efek serupa testosteron pada pria sehingga pertumbuhan wanita biasanya terhenti beberapa tahun lebih cepat daripada pertumbuhan pria.

Setelah menopause hampir tidak ada estrogen yang disekresi oleh ovarium sehingga menyebabkan :

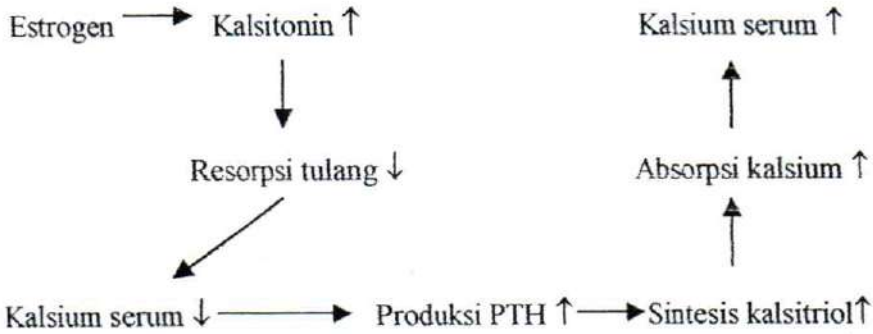
- a. Berkurangnya aktivitas osteoblastik pada tulang
- b. Berkurangnya matriks tulang
- c. Berkurangnya deposit kalsium dan fosfat tulang

(Guyton, 1997)

Menurut Tjokropawiro (2000) mekanisme kerja estrogen yang berpengaruh pada tulang :

- Efek langsung pada tulang melalui reseptor spesifik intranuklear kemudian berikatan dengan DNA dan mengatur produksi mRNA
- Menekan sekresi IL-1, IL-6, TNF- α . Ketiga sitokin ini meningkatkan '*osteoclast recruitment*' dan memacu aktivitas osteoklas. Sebagai kompensasi aktivitas osteoblas akan meningkat.

- Melalui perangsangan kalsitonin



Beberapa penelitian mendapatkan adanya efek estrogen terhadap produksi IL 1, IL 6, TNF dan TGF oleh sel mononuklear yang bersirkulasi dalam darah atau yang dihasilkan oleh sel osteoblas dari tulang trabekula (Gowen, 1994). Estrogen menurunkan pelepasan sitokin yang bersifat katabolik yaitu IL 1, IL 6 dan TNF α . Sebaliknya estrogen akan meningkatkan faktor yang bersifat anabolik yaitu merangsang pembentukan tulang seperti TGF β , IGF I dan IGF II. Secara keseluruhan estrogen akan mempertahankan kepadatan tulang dengan memacu pembentukan tulang dan menekan resorpsi tulang (Gowen, 1994; Prabowo, 1997).

Menurut Zhang (2000) penelitian pengaruh estrogen terhadap pembentukan tulang yang dilakukan pada matriks tulang tikus jantan mendapatkan hasil bahwa terjadi pembentukan daerah tulang baru yang lebih besar pada kelompok yang diberikan estrogen dan androgen dibanding dengan kelompok kontrol. Penelitian ini menunjukkan bahwa reseptor estrogen terdapat pula pada sel osteoblas tikus jantan (Yuliati, 2002).

2.12 Fitoestrogen

Fitoestrogen merupakan sekelompok campuran non-steroid yang dijumpai pada beberapa makanan dari tanaman. Hal-hal yang menarik dari fitoestrogen adalah bahwa fitoestrogen mempunyai efek yang sama dengan estrogen (estradiol) dan memiliki kemampuan sebagai anti oksidan (Muir, 2002; Anderson, 2003; Wilgenburg, 2003).

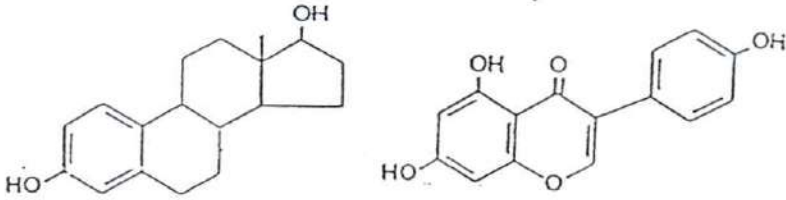
Meskipun demikian pemberian fitoestrogen tidak memberikan faktor resiko terjadinya kanker payudara dan kanker uterus (Barnes, 2003; Anderson, 2003).

Penelitian di Universitas Illinois dan Universitas HongKong menyimpulkan bahwa pemberian fitoestrogen dapat meningkatkan kepadatan tulang (*bone mass density*) dan kandungan mineral tulang (*bone mineral content*). Penelitian lain di Universitas Texas menyebutkan bahwa fitoestrogen juga merangsang pembentukan tulang (Gilbert, 2003).

Isoflavon merupakan salah satu kelompok fitoestrogen. Fitoestrogen ini terdiri dari genistein, daidzein dan glisitein. Fitoestrogen isoflavon mampu berikatan dengan reseptor estrogen β sebaik estrogen dan hanya berikatan lemah dengan reseptor α membentuk kompleks fitoestrogen-reseptor estrogen (Barnes, Kim, 2003; Wilgenburg, 2003).

Ipriflavon suatu isoflavon sintesis berasal dari isoflavon daidzein kedelai pernah dilaporkan efektif dalam menghambat terjadinya osteoporosis pada pemakaian kortikosteroid jangka panjang. Penelitian dengan hewan coba menunjukkan bahwa ipriflavon yang diberikan peroral setiap hari pada tikus (*rats*) yang mengalami pemberian kortikosteroid jangka panjang terbukti mampu

meningkatkan kepadatan tulang dan meningkatkan kekuatan mekanik tibia dan femur (Dipiro, Talbert, 2002; Head, 2003).



Estradiol

Genistein

Gambar 2.20 Rumus bangun estradiol dan genistein

Setelah ditelan fitoestrogen yang diberikan peroral akan dihidrolisis oleh enzim glukosidase intestinal sehingga terlepas aglikon, daidzein, genistein dan glisitein. Kesemuanya akan diabsorpsi atau dimetabolisme lebih lanjut menjadi banyak metabolit spesifik termasuk equol dan p-etilfenol. Variasi metabolisme sangat luas dipengaruhi oleh komponen-komponen diet lain. Lingkungan internal karbohidrat yang menyebabkan peningkatan fermentasi intestinal, menghasilkan biotransformasi fitoestrogen yang lebih banyak, mengakibatkan peningkatan pembentukan equol, suatu metabolit isoflavon mamalia yang lebih banyak.

Keberadaan mikroflora intestinal berperan penting dalam proses metabolisme fitoestrogen. Hal ini terbukti dengan diberikannya antibiotika akan menghambat proses tersebut.

Seperti halnya estrogen endogen, isoflavon juga mengalami sirkulasi enterohepatik dan disekresi dalam empedu. Dan absorpsi terjadi di sepanjang intestin melalui difusi pasif non-ionik. Konjugasi isoflavon menjadi asam glukoronat, suatu reaksi yang dikatalisasi oleh satu dari isoenzim UDP-glukoroniltransferase, terjadi pada

sirkulasi ini. Hal ini dapat terjadi di hepar atau kemungkinan di intestinal. Seperti halnya estradiol, isoflavon dijumpai dalam plasma sebagian besar dalam bentuk konjugat glukoronida dan sebagian kecil dalam bentuk sulfat.

Seperti halnya estrogen juga terikat pada protein serum yaitu albumin dan globulin, tetapi fitoestrogen terikat lebih lemah dibanding dengan estrogen. Equol memiliki afinitas sepuluh kali lebih lemah terhadap protein serum dibanding dengan estradiol, akan menyebabkan ketersediaan equol yang lebih banyak dalam keadaan bebas sehingga mampu berikatan dengan reseptor estrogen lebih banyak. Inilah yang secara hipotetik menyokong efektivitas isoflavon.

Waktu paruh isoflavon (daidzein dan genistein) berkisar 7.9 jam pada pasien dewasa yang ditentukan mulai dari kemunculan pertama hingga menghilangnya dalam plasma. Konsentrasi puncak terjadi 6 – 8 jam setelah ditelannya isoflavon. Konsentrasi plasma 50 – 800 ng / ml terjadi pada daidzein, genistein dan equol pada orang dewasa yang mengkonsumsi 50 mg / hari isoflavon.

Eliminasi isoflavon dari tubuh terjadi di ginjal, keluar bersama dengan urine dalam bentuk utama sebagai konjugat glukoronida. Sebagian kecil diekskresikan bersama dengan faeces (Setchell, 2003).

2.13 Kedelai Sebagai Sumber Fitoestrogen Yang Bergizi Tinggi

Salah satu sumber fitoestrogen adalah kedelai. Kedelai memiliki nama botani *Glycine max.*(Linn.) Merrill. (Latin) dan *Glycine soja*, (Linn.) Sieb dan Zucc (Latin). Kedelai masuk dalam familia *Leguminosae*, subfamilia *Papilionideae*, genus *Glycine* dan spesies *max* (Thomas, 1992; Rubatzky, 1997; Suprpto, 2002).



Gambar 2.21 Gambar tanaman kedelai (Suprpto, 2002)

Kedelai memiliki nilai gizi tinggi. Perbandingan jumlah kalori, protein dan lemak setiap 100 gram kedelai yang dibandingkan dengan bahan makanan lainnya dapat dilihat dalam tabel 4.

Tabel 2.4 Kandungan kalori, protein, lemak dan karbohidrat setiap 100 gram kedelai dan bahan makanan lainnya (Suprpto, 2002)

Bahan	Kalori	Protein (%)	Lemak (%)	CHO (%)	Air (%)
Beras	360	6,8	0,7	78,9	13
Jagung	355	9,2	3,9	73,7	12
Tepung ubikayu	363	1,1	0,5	88,2	9
Kedelai	330	35	18	35	8
Kacang hijau	345	22	1	63	10
Daging	190	19	12	0	68
Ikan segar	113	17	5	0	76
Telur ayam	162	13	12	1	74
Susu skim kering	360	36	1	52	4

Setiap 100 gram kedelai mengandung 35% (35 gram) protein bahkan beberapa varietas unggul kandungan proteinnya dapat mencapai 40-43% (Suprpto, 2002). Tabel berikut memberikan perbandingan kandungan asam amino kedelai dengan beberapa bahan makanan lain.

Tabel 2.5 Kandungan asam amino kedelai dan beberapa macam bahan makanan (mg/g) (Suprpto, 2002)

Sumber protein	Isoleucine	Leucine	Lysine	Phenylalaine	Tyrosine	Methionine	Cystine	Theonine	Tryptophan	Valine
Kedelai	340	480	400	310	200	80	110	250	90	330
Kacang tanah	260	380	220	320	220	60	90	170	70	310
Kacang hijau	350	560	430	300	100	70	40	200	50	370
Beras	320	535	236	307	269	142	80	241	65	415
Susu sapi	407	630	496	311	323	144	57	292	90	440
Telur ayam	415	553	403	365	262	197	149	317	100	454

Kedelai banyak dijumpai di Indonesia berupa bahan olahan yaitu tempe, tahu, kecap, susu kedelai, kecap, tepung kedelai, taucu, tofu dan lain-lain. Kedelai dalam bentuk olahan memiliki kandungan protein yang lebih rendah tetapi lebih mudah dicerna (Suprpto, 2002). Tabel berikut menunjukkan kandungan gizi bahan olahan yang berasal dari kedelai.

Tabel 2.6 Kandungan gizi bahan olahan yang berasal dari kedelai per 100 gram (Suprpto, 2002)

Bahan	Kalori (g)	Protein (gr)	Lemak	Karbohidrat (gr)	Calcium (mg)	P (mg)	Fe (mg)	Vit A (unit)	Thiamine (mg)	Air (g)
Kedelai putih	331	34,9	18,1	34,8	227	585	8,0	110	1,07	7,5
Tempe	149	18,3	4,0	10,7	129	154	10,0	50	0,17	64,0
Tahu segar	68	7,8	4,6	16,0	124	63	0,8	0	0,06	70,0
Kecap	46	5,7	1,3	9,0	123	96	5,7	0	0	83,0
Tauco	166	10,4	4,9	24,1	55	265	1,3	23	0,05	64,4

Kedelai dan produk-produknya mengandung fitoestrogen. Fitoestrogen yang banyak dijumpai adalah isoflavon. Isoflavon utama yang dijumpai pada kedelai adalah genistein (60%), daidzein (25%) dan glisetin (15%) (Anderson, 2003).

Beberapa bahan makanan kedelai dan produk-produknya merupakan sumber isoflavon (daidzein, genistein) dan kandungan isoflavon (daidzein, genistein) dalam 100 mg bahan makanan tersebut terdapat pada tabel di bawah ini (Anderson, 2003; Patterson, 2003).

Tabel 2.7 Beberapa bahan makanan kedelai dan produk-produknya yang merupakan sumber isoflavon dalam 100 mg bahan makanan tersebut

Sumber-sumber kedelai utama dari isoflavon		
	DAIDZEIN (mg/100 g)	GENISTEIN (mg/100 g)
Kacang kedelai	84	111
Kacang kedelai (olahan)	56	87
Tepung kedelai	23	81
Tempe	27	32
Tofu	15	16

Pemberian fitoestrogen berupa ekstrak kedelai dapat digunakan sebagai alternatif untuk terapi pengganti estrogen pada wanita pasca menopause menggunakan dosis 90 mg – 100 mg perhari (Sari, 2001; Dipiro, Talbert, 2002; Gilbert, 2003). Dosis tersebut terbukti setara dengan dosis estrogen konjugasi sebesar 0,625 mg (Sari, 2001).

Untuk mendapatkan ekstrak kedelai antara lain dengan cara maserasi. Caranya kedelai direndam dengan pelarut alkohol 96% selama 24 jam kemudian disaring. Setelah terpisah ampas direndam lagi dengan pelarut dan waktu yang sama. Perendaman dan penyaringan ini dilakukan sebanyak tiga kali 24 jam hingga diperoleh ekstrak kedelai encer. Ekstrak ini dipekatkan dengan *Rotary Evaporator* melalui penurunan tekanan pada suhu 40-45° C hingga diperoleh ekstrak kedelai. Ekstraksi merupakan peristiwa perpindahan massa. Zat aktif yang semula terdapat dalam sel tertarik oleh cairan penyari (pengekstraksi) sehingga terbentuk larutan zat aktif dalam cairan penyari tersebut (Sari, 2001).

2.14 DBM Sonic 1200

DBM Sonic 1200 merupakan alat untuk pemeriksaan kepadatan tulang secara kuantitatif menggunakan gelombang ultrasound (*Quantitative Ultrasound/QUS*). Alat ini banyak digunakan dalam penelitian-penelitian untuk mempelajari kepadatan tulang secara kuantitatif pada manusia maupun pada hewan coba (Sankaran, 2000; Tauchmanova, 2003).

Gelombang ultrasound akan makin cepat dirambatkan pada tulang yang memiliki massa tulang yang makin padat dengan satuan m/detik.

Kepadatan tulang (*bone mineral density*) adalah kepadatan massa mineral persatuan volume jaringan tulang diukur dengan satuan g/cm^2 atau mg/cm^2 (Resnick, 1995).

Keunggulan alat ini adalah praktis, relatif tidak mahal, tidak invasif, bebas radiasi ionisasi, relatif mudah dioperasikan, dan mudah dibawa ke mana-mana (Taxel, 1998; Hans, 2000; Sankaran, 2000).

Teknik pemeriksaan baku emas (*gold standar*) untuk mengukur kepadatan tulang adalah DEXA (*Dual Energy X-ray Absorpsiometry*) dan merupakan teknik yang paling luas digunakan (Taxel P, 1998; Sankaran, 2002).

Tidak semua tempat memiliki alat tersebut dan alat tersebut relatif mahal. Apabila alat ini tidak ada pemeriksaan lain dapat digunakan termasuk pemeriksaan ultrasound (DBM Sonic 1200).

DBM Sonic memiliki sensitivitas yang adekuat untuk membedakan keadaan tulang yang normal, osteopenia atau osteoporotik dan dapat mendeteksi pasien dengan fraktur vertebral. Alat ini dapat digunakan untuk pemeriksaan penapisan osteoporosis yang memerlukan pemeriksaan absorpsiometri sinar X (Hans, 2000).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Dasar Teori

3.1.1 Kortikosteroid jangka panjang menyebabkan penurunan kepadatan tulang melalui :

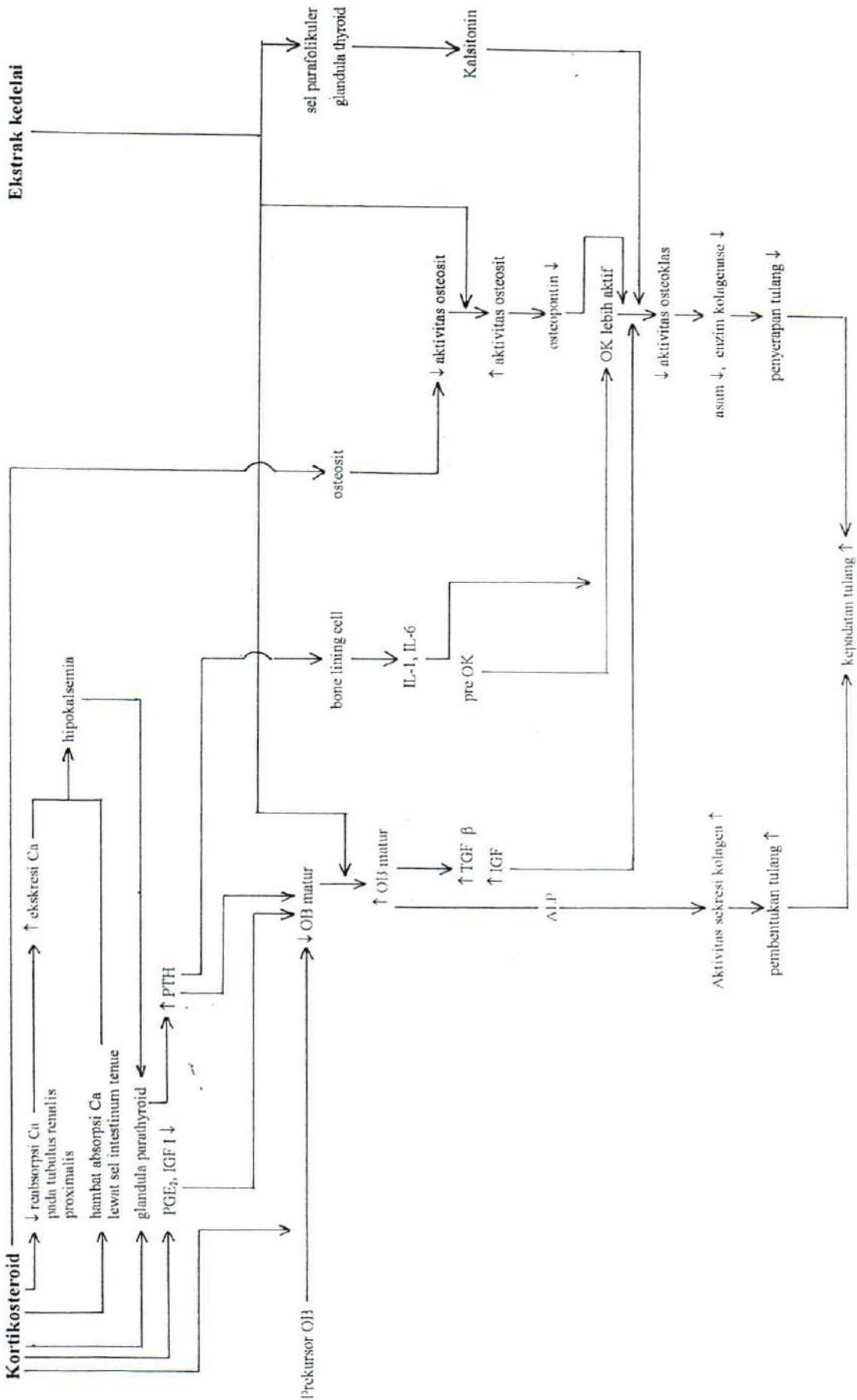
- a. Penurunan reabsorpsi kalsium pada tubulus renalis proksimalis ginjal sehingga menyebabkan peningkatan ekskresi kalsium bersama dengan urine.
- b. Penghambatan absorpsi kalsium melalui sel *intestinum tenue*.
- c. Kedua hal di atas menyebabkan keadaan hipokalsemia sehingga merangsang glandula parathyroid mensekresi PTH yang berakibat peningkatan kadar PTH dalam darah (*hiperparathyroidisme sekunder*).
- d. Perangsangan secara langsung glandula parathyroid untuk mensekresi PTH sehingga kadar PTH dalam darah meningkat (*hiperparathyroidisme*).
- e. *Hiperparathyroidisme* menyebabkan efek penekanan fungsi osteoblas matur sehingga menyebabkan penurunan aktivitas osteoblas.
- f. *Hiperparathyroidisme* juga berpengaruh pada *bone lining cell* sehingga produksi IL-1 dan IL-6 meningkat keadaan ini menyebabkan peningkatan rekrutmen osteoklas dan memacu aktivitas osteoklas.

- g. Penurunan efek autokrin Prostaglandin E₂ (PGE₂) dan *Insulin-like Growth Factor I* (IGF I) menyebabkan penurunan fungsi osteoblas untuk mensintesis matriks tulang.
 - h. Penghambatan secara langsung maturasi prekursor osteoblas menjadi osteoblas matur.
 - i. Penghambatan aktivitas osteosit yang menyebabkan naiknya sekresi osteopontin oleh osteosit. Osteopontin berpengaruh pada peningkatan motilitas dan keberadaan osteoklas.
- 3.1.2 Ekstrak kedelai banyak mengandung sekelompok campuran non-steroid yang disebut fitoestrogen. Fitoestrogen yang banyak dijumpai dalam ekstrak kedelai isoflavon. Isoflavon utama yang dijumpai pada ekstrak ini adalah genistein, daidzein dan glisetin. Disebut fitoestrogen karena mempunyai efek yang sama dengan estrogen untuk kesehatan tulang.
- 3.1.3 Ekstrak kedelai yang banyak mengandung fitoestrogen sebagaimana estrogen mempunyai efek :
- a. Meningkatkan aktivitas osteoblas sehingga terjadi peningkatan produksi matriks tulang ditandai dengan peningkatan alkali fosfatase dalam serum dan peningkatan jumlah osteoblas.
 - b. Meningkatkan produksi TGF- β dan IGF I, keduanya menyebabkan apoptosis osteoklas sehingga aktivitas osteoklas menurun.
 - c. Menurunkan sekresi osteopontin oleh osteosit. Osteopontin berpengaruh terhadap peningkatan motilitas dan keberadaan osteoklas sehingga hal ini menyebabkan penurunan aktivitas osteoklas.

d. Merangsang sel parafolikuler glandula thyroïd untuk memproduksi kalsitonin yang menurunkan aktivitas osteoklas.

3.1.4 Adanya penurunan aktivitas osteoklas menyebabkan penurunan proses penyerapan tulang.

3.1.5 Karena adanya peningkatan aktivitas osteoblas matur dan penurunan aktivitas osteoklas setelah pemberian ekstrak kedelai maka akan terjadi peningkatan kepadatan tulang.



3.3 Hipotesis

- 3.3.1 Pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang dapat menghambat terjadinya penurunan kepadatan tulang
- 3.3.2 Pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang dapat meningkatkan kadar alkali fosfatase dalam serum
- 3.3.3 Peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang dapat meningkatkan penghambatan terjadinya penurunan kepadatan tulang

Keterangan :

Pop = Populasi

R = Randomisasi

S = Sampel

K₁ = Kelompok kontrol yaitu kelompok yang tidak diberi prednisolon peroral dan tidak diberi perlakuan pemberian ekstrak kedelai peroral (P₁)

K₂ = Kelompok yang hanya diberi perlakuan ekstrak kedelai 1,8 mg / 200 g tikus peroral (P₂)

K₃ = Kelompok yang hanya diberi perlakuan kortikosteroid berupa prednisolon 0,54 mg / 200 g tikus / hari peroral (P₃)

K₄ = Kelompok perlakuan ekstrak kedelai 0,9 mg / 200 g tikus / hari p.o (P₄)

K₅ = Kelompok perlakuan ekstrak kedelai 1,8 mg / 200 g tikus / hari p.o (P₅)

K₆ = Kelompok perlakuan ekstrak kedelai 3,6 mg / 200 g tikus / hari p.o (P₆)

Kelompok K₄, K₅, K₆ diberi prednisolon sebesar 0,54 mg / 200 g tikus / hari peroral

O₁, O₂, O₃, O₄, O₅, O₆ = pengambilan data setelah perlakuan

4.2 Populasi Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih jantan yang memenuhi persyaratan sebagai berikut :

- a. *Rattus norvegicus* galur Wistar
- b. Berusia sekitar 3 bulan
- c. Berat badan sekitar 200 gram

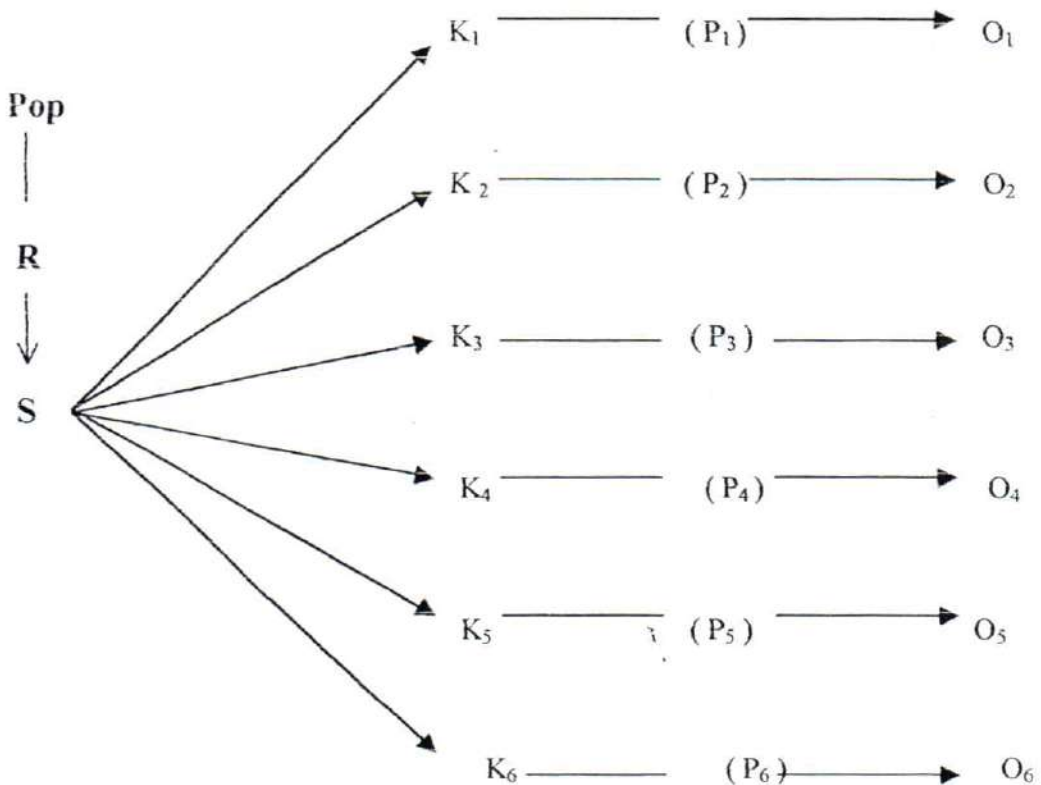
BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam penelitian eksperimental laboratoris menggunakan rancangan *The Post-Test Only Control Group Design* (Zainuddin, 2000).

Secara skematis rancangan penelitian tersebut digambarkan sebagai berikut :



- d. Jenis kelamin jantan
- e. Sehat fisik ditandai dengan gerakan aktif

Besar sampel yang digunakan sebanyak 8 ekor tikus untuk setiap kelompok.

Jumlah tersebut berdasar pada rumus Widodo (1993) dan Madiyono (1995) yaitu :

$$n = (Z\alpha + Z\beta)$$

n = perkiraan jumlah sampel masing-masing kelompok

$Z\alpha$ = simpang baku normal $\alpha = 1,65$ ($\alpha = 0,05$)

$Z\beta$ = simpang baku normal $\beta = 0,842$ (power = 80%)

(Lampiran 3)

Teknik pengambilan sampel secara *simple random sampling*.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi variabel

a. Variabel bebas (independen)

Pemberian ekstrak kedelai jangka panjang

Pemberian kortikosteroid jangka panjang

b. Variabel tergantung (dependen)

Kepadatan tulang tikus

Kadar alkali fosfatase serum

c. Variabel kendali

Jenis hewan coba

Jenis kelamin hewan coba

Kesehatan hewan coba

Pemeliharaan hewan coba

Keseragaman diet

d. Variabel moderator

Berat badan hewan coba

Usia hewan coba

4.3.2 Definisi operasional variabel

- a. Pemberian ekstrak kedelai adalah pemberian ekstrak kedelai kepada hewan coba; kelompok kedua (K_2) sebesar 1,8 mg / 2,5 ml CMC natrium 0,5% / 200 g tikus / hari (P_2), kelompok keempat (K_4) sebesar 0,9 mg / 2,5 ml CMC natrium 0,5 % / 200 g tikus / hari (P_4), kelompok kelima (K_5) dengan 1,8 mg / 2,5 ml CMC natrium 0,5 % / 200 g tikus / hari (P_5), kelompok keenam (K_6) dengan 3,6 mg / 2,5 ml CMC natrium 0,5% / 200 g tikus / hari (P_6) peroral menggunakan sonde selama 100 hari.

Perhitungan dosis berdasar pada hasil konversi Laurence dan Bacharach (1964) (Lampiran 1 dan 2b).

Volume larutan yang diberikan pada hewan coba setiap kelompok perlakuan adalah 5 ml untuk setiap 200 g tikus sesuai dengan aturan pemberian volume larutan obat menurut Ritchel (1974) (Lampiran 4).

- b. Pemberian kortikosteroid adalah pemberian prednisolon pada kelompok K_3 , K_4 , K_5 , K_6 hewan coba sebesar 0,54 mg / 200 g tikus / hari peroral selama 100 hari.

Perhitungan dosis berdasar pada hasil Konversi Perhitungan Dosis untuk Berbagai Jenis Hewan dan Manusia dari Laurence dan Bacharach (1964) (Lampiran 1 dan 2).

- c. Indikator kepadatan tulang dalam penelitian merupakan besarnya kecepatan hantaran gelombang suara melewati jaringan tulang dengan satuan meter / detik. Yang diukur adalah tulang metafisis femur hewan coba memakai alat ultrasound DBM Sonic 1200.
- d. Kadar alkali fosfatase diukur dari serum sampel darah hewan coba dari jantung menggunakan metode standar yang dioptimalisasikan sesuai rekomendasi *Deutsche Gessellschaft fur Chemie* satuan IU/L.
- e. Jenis hewan coba adalah *Rattus norvegicus* galur Wistar :
 - 1) Jenis kelamin hewan coba adalah jantan
 - 2) Usia hewan coba sekitar 3 bulan dengan berat badan sekitar 200 gram
 - 3) Sehat fisik ditandai dengan gerakan aktif
 - 4) Pemeliharaan dan perawatan hewan coba di kandang yang masing-masing berisi lima ekor hewan coba dengan pemberian makanan P3 CP 524-2 dan minum Aqua.
- f. Berat badan adalah berat badan hewan coba yang ditimbang dengan timbangan Torbal (*torsion balancing*) dengan satuan gram ketelitian satu angka di belakang koma. Penimbangan berat badan dilakukan saat awal adaptasi, awal perlakuan, tengah perlakuan dan di akhir perlakuan.

4.4 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.4.1 Bahan penelitian

a. Hewan coba

Hewan coba adalah tikus putih *Rattus norvegicus* galur Wistar berjenis kelamin jantan, usia sekitar 3 bulan, berat badan sekitar 200 gram, dalam keadaan sehat fisik.

b. Bahan untuk perlakuan

- 1) Kedelai yang diekstraksi dengan cara ekstraksi maserasi (lampiran 6) menggunakan pelarut alkohol 96%, diperoleh 181 gram ekstrak kedelai dari 1,5 kg kedelai mentah.
- 2) Preparat kortikosteroid yaitu prednisolon

c. Bahan untuk pemeriksaan

- 1) Ether untuk pembiusan
- 2) K-Y lubricating jeli
- 3) Kapas atau tisu
- 4) Kertas label

4.4.2 Instrumen penelitian

- 1) Kandang berukuran 40 x 30 x 15 cm sebanyak enam buah
- 2) Ultrasound DBM Sonic 1200 (*Digital Bone Measurement-Emsor*, SA, Madrid, Spanyol)
- 3) Timbangan torbal dan timbangan analitik Librar-Shimatzu
- 4) Stoples untuk pembiusan
- 5) Sonde bayi nomer 10

6) S spuit disposibel 5 cc

7) Pisau bedah

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Aklimatisasi

Aklimatisasi hewan coba selama tujuh hari untuk menyesuaikan diri dengan kondisi laboratorium

4.5.2 Pembagian kelompok hewan coba

Dilakukan randomisasi 48 ekor tikus menjadi enam kelompok (K_1 , K_2 , K_3 , K_4 , K_5 , K_6) yang masing-masing terdiri atas 8 ekor tikus.

4.5.3 Penimbangan berat badan sebelum perlakuan

Penimbangan dilakukan pada awal adaptasi dan pagi hari sebelum perlakuan pertama kali menggunakan timbangan torbal dengan ketelitian satu angka di belakang koma menggunakan satuan gram.

4.5.4 Pelaksanaan perlakuan

Kelompok pertama (K_1) merupakan kelompok kontrol yang tidak diberi prednisolon maupun ekstrak kedelai, hanya diberikan larutan CMC natrium 0,5% sebanyak 5 ml peroral menggunakan sonde.

Kelompok kedua (K_2) merupakan kelompok yang hanya diberi ekstrak kedelai sebesar 1,8 mg / 200 g tikus / hari peroral dalam 2,5 ml CMC natrium 0,5% menggunakan sonde dan 2,5 ml CMC natrium 0,5% menggunakan sonde.

Kelompok ketiga (K_3) merupakan kelompok yang hanya diberikan prednisolon sebesar 0,54 mg / 200 g tikus / hari secara peroral dalam

2,5 ml CMC natrium 0,5% menggunakan sonde dan 2,5 ml CMC natrium 0,5% menggunakan sonde.

Kelompok keempat (K_4) diberi prednisolon sebesar 0,54 mg / 200 g tikus / hari secara peroral dalam 2,5 ml CMC natrium 0,5% menggunakan sonde dan ekstrak kedelai sebesar 0,9 mg / 200 g tikus / hari secara peroral dalam 2,5 ml CMC natrium 0,5% menggunakan sonde.

Kelompok kelima (K_5) diberi prednisolon sebesar 0,54 mg / 200 g tikus / hari secara peroral dalam 2,5 ml CMC natrium 0,5% menggunakan sonde dan ekstrak kedelai sebesar 1,8 mg / 200 g tikus / hari secara peroral dalam 2,5 ml CMC natrium 0,5% menggunakan sonde.

Kelompok keenam (K_6) diberi prednisolon sebesar 0,54 mg / 200 g tikus / hari secara peroral dalam 2,5 ml CMC natrium 0,5% menggunakan sonde dan ekstrak kedelai sebesar 3,6 mg / 200 g tikus / hari diberikan peroral dalam 2,5 ml CMC natrium 0,5% menggunakan sonde.

Perlakuan dilakukan setiap hari pada jam yang sama dan dilakukan selama 100 hari.

4.5.5 Penimbangan berat badan di tengah dan akhir perlakuan

Penimbangan berat badan dilakukan di tengah perlakuan yaitu pagi hari setelah 50 hari perlakuan. Penimbangan di akhir perlakuan dilakukan hari berikutnya setelah perlakuan terakhir menggunakan timbangan torbal menggunakan satuan gram.

4.5.6 Pembiusan

Pembiusan dilakukan setelah penimbangan berat badan terakhir menggunakan ether di dalam stoples pembiusan. Sekitar 2 menit tikus tidak bergerak lagi ditandai dengan meredupnya mata dan tidak Bergeraknya lagi anggota badan (Smith, Mangkoewidjojo, 1988).

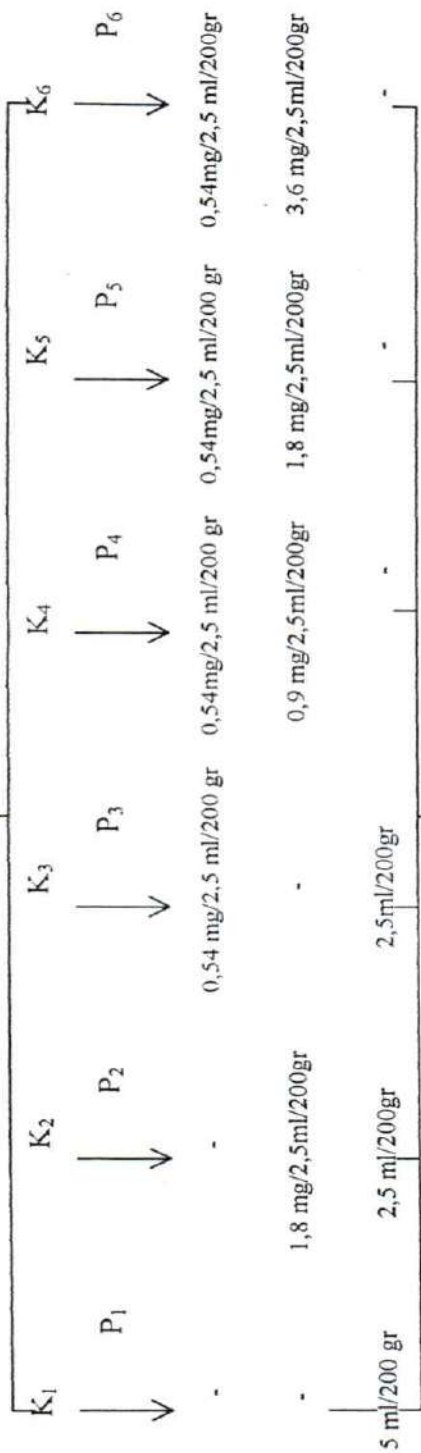
4.5.7 Pengukuran kepadatan tulang

Pengukuran kepadatan tulang dilakukan pada kaki bagian metafisis tulang femur setelah hewan coba dibius. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan alat Ultrasound DBM Sonic 1200 sebanyak empat kali dan hasil rata-ratanya dapat dilihat pada layar monitor kemudian dicatat.

4.5.8 Pemeriksaan kadar alkali fosfatase serum

Dilakukan pemeriksaan kadar alkali fosfatase (Lampiran 8) dalam serum menggunakan darah yang diambil dari jantung

Tikus putih jantan
48 ekor
dibagi 6 kelompok
Timbang berat badan



Prednisolon

Ekstrak kedelai

CMC Na 0,5%

Perlakuan setiap hari selama 100 hari
Timbang berat badan pada hari ke-50

Hari ke-101
Timbang berat badan

Bius

Ukur kepadatan tulang

Ambil darah untuk pemeriksaan alkali fosfatase serum

Analisis Data

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.6.1 Lokasi penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya

4.6.2 Waktu penelitian

Penelitian dilakukan selama 10 bulan

4.7 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan statistik deskriptif dan statistik parametrik {uji normalitas menggunakan *Kolmogorov-Smirnov* ($p > 0,05$), uji manova, uji analisis diskriminan dan uji korelasi regresi linier}.

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

Data hasil penelitian eksperimental mengenai efek pemberian ekstrak kedelai dalam menghambat penurunan kepadatan tulang pada terapi kortikosteroid jangka panjang merupakan data hasil pengukuran tulang metafisis femur hewan coba yang diukur menggunakan alat DBM Sonic 1200 dengan ketentuan bahwa makin cepat atau makin tinggi nilainya (m/detik) makin besar kepadatan tulangnya, pengukuran kadar alkali fosfatase serum dengan ketentuan bahwa makin aktif osteoblas akibat efek ekstrak kedelai makin tinggi kadar alkali fosfatase serum (IU/L) menggunakan metode standar yang dioptimalisasikan sesuai rekomendasi *Deutsche Gessellschaft fur Chemie*. Data yang sudah terkumpul dideskripsikan dan diolah dengan program SPSS 11,5 for windows.

5.1 Data Hasil Penelitian

Hasil pengukuran kepadatan tulang menggunakan alat DBM Sonic 1200 dan hasil pengukuran kadar alkali fosfatase dalam serum ini merupakan hasil yang telah dilakukan pada hewan coba yang dikelompokkan sebagai berikut :

1. Kelompok kontrol yang tidak diberi prednisolon peroral dan tidak diberi ekstrak kedelai peroral (P₁)
2. Kelompok yang hanya diberi perlakuan ekstrak kedelai 1,8 mg / 200 gram tikus / hari peroral (P₂)

3. Kelompok yang hanya diberi perlakuan kortikosteroid berupa prednisolon 0,54 mg / 200 gram tikus / hari peroral (P₃)
4. Kelompok yang diberi perlakuan kortikosteroid berupa prednisolon 0,54 mg / 200 gram tikus / hari peroral dan ekstrak kedelai 0,9 mg / 200 gram tikus / hari peroral (P₄)
5. Kelompok yang diberi perlakuan kortikosteroid berupa prednisolon 0,54 mg / 200 gram tikus / hari peroral dan ekstrak kedelai 1,8 mg / 200 gram tikus / hari peroral (P₅)
6. Kelompok yang diberi perlakuan kortikosteroid berupa prednisolon 0,54 mg / 200 gram tikus / hari peroral dan ekstrak kedelai 3,6 mg / 200 gram tikus / hari peroral (P₆)

Berat badan masing-masing hewan coba tiap-tiap kelompok ditimbang sebelum perlakuan. Penimbangan berat badan diperlukan untuk menyesuaikan dosis pemberian kortikosteroid (prednisolon) maupun ekstrak kedelai masing-masing hewan coba. Penimbangan berat badan juga dilakukan setelah perlakuan.

Data hasil penimbangan berat badan hewan coba sebelum dan setelah perlakuan terlihat tabel 5.1 (lampiran 10)

Tabel 5.1 Data hasil penimbangan berat badan (gram) hewan coba sebelum dan setelah perlakuan dari masing-masing kelompok

1. Berat badan sebelum perlakuan (gram)

No	Kelompok 1	Kelompok 2	Kelompok 3	Kelompok 4	Kelompok 5	Kelompok 6
1	178	237	195	214	195	214
2	243	230	216	175	206	119
3	147	230	218	272	200	200
4	183	165	236	220	220	119
5	218	195	210	210	235	198
6	217	245	204	217	218	218
7	179	204	203	225	210	215
8	174	177	193	207	165	180

2. Berat badan setelah perlakuan (gram)

No	Kelompok 1	Kelompok 2	Kelompok 3	Kelompok 4	Kelompok 5	Kelompok 6
1	219	250	160	205	230	230
2	267	233	220	165	205	205
3	155	250	200	295	205	210
4	185	182	220	225	210	225
5	223	210	192	180	190	190
6	220	275	200	219	205	200
7	190	210	185	210	215	220
8	185	185	200	205	172	195

Setelah mendapat perlakuan seperti tersebut di atas masing-masing kelompok didapat data kepadatan tulang sebagai berikut seperti pada tabel 5.2 (lampiran 12)

Tabel 5.2 Data hasil pengukuran kepadatan tulang (m/dtk) dari masing-masing kelompok

No	Kelompok 1	Kelompok 2	Kelompok 3	Kelompok 4	Kelompok 5	Kelompok 6
1	1630	1637	1618	1655	1644	1650
2	1647	1669	1616	1640	1625	1639
3	1639	1640	1613	1676	1637	1643
4	1642	1643	1611	1630	1655	1633
5	1634	1677	1601	1633	1685	1636
6	1654	1693	1619	1618	1624	1660
7	1613	1679	1631	1647	1650	1661
8	1637	1630	1603	1623	1637	1695

Sedangkan data hasil pengukuran kadar alkali fosfatase serum setelah mendapat perlakuan selama 100 hari seperti pada tabel 5.3 (lampiran 12)

Tabel 5.3 Data hasil pengukuran kadar alkali fosfatase dalam serum (IU/L) dari masing-masing kelompok

No	Kelompok 1	Kelompok 2	Kelompok 3	Kelompok 4	Kelompok 5	Kelompok 6
1	97	101	100	69	77	139
2	96	122	86	97	111	100
3	107	106	72	92	100	130
4	100	100	115	100	158	81
5	112	102	106	77	72	124
6	105	102	72	130	158	130
7	98	125	96	158	139	92
8	102	120	92	95	120	160

5.2 Hasil Uji Statistik Deskriptif

Data hasil penelitian di atas dianalisis secara statistik deskriptif yang bertujuan memperoleh gambaran yang lebih jelas mengenai distribusi data maupun simpangan baku dari data-data tersebut. Hasil statistik deskriptif terhadap hasil penimbangan berat badan, hasil pengukuran kepadatan tulang, respons perubahan kepadatan tulang, hasil pengukuran kadar alkali fosfatase dalam serum dan hasil pengukuran respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum tampak pada tabel 5.4, 5.5, 5.6, 5.7 dan tabel 5.8 (lampiran 11 dan lampiran 13)

Tabel 5.4 Statistik deskriptif hasil penimbangan berat badan (gram) sebelum dan setelah perlakuan masing-masing kelompok

Kelompok		BB awal	BB akhir	Perubahan BB
1	Rerata	192,3750	205,500	13,1250
	Simpangan baku	30,9282	34,0420	13,2173
2	Rerata	210,3750	224,3750	14,0000
	Simpangan baku	29,5873	33,1875	8,6520
3	Rerata	209,3750	197,1250	-12,2500
	Simpangan baku	13,9994	19,3571	13,8022
4	Rerata	217,5000	213,0000	-4,5000
	Simpangan baku	26,7742	38,6079	15,6114
5	Rerata	206,1250	204,0000	-2,1250
	Simpangan baku	20,8219	17,1380	22,6239
6	Rerata	182,8750	209,3750	26,5000
	Simpangan baku	41,2741	14,5006	44,7341

Tabel 5.5 Statistik deskriptif kepadatan tulang (m/dtk) dari masing-masing kelompok

	Kelompok 1	Kelompok 2	Kelompok 3	Kelompok 4	Kelompok 5	Kelompok 6
Kepadatan tulang terendah	1613	1630	1601	1618	1623	1633
Kepadatan tulang tertinggi	1654	1693	1631	1676	1685	1695
Rerata kepadatan tulang	1637,00	1658,50	1614,00	1640,25	1644,63	1652,13
Simpangan baku	12,26	23,66	9,52	18,87	19,62	20,23

Hasil tersebut di atas ditunjukkan dengan diagram batang seperti tampak di bawah ini berupa diagram rerata kepadatan tulang.

KEPADATAN



Gambar 5.1 Diagram yang menunjukkan rerata kepadatan tulang

Sedangkan hasil statistik deskriptif untuk respons perubahan kepadatan tulang masing-masing kelompok terlihat pada tabel 5.6

Tabel 5.6 Statistik deskriptif respons perubahan kepadatan tulang (m/dtk) dari masing-masing kelompok terhadap kelompok kontrol

	Kelompok 2	Kelompok 3	Kelompok 4	Kelompok 5	Kelompok 6
Rerata kepadatan tulang	21,5000	-23,0000	3,2500	7,6250	15,1250
Simpangan baku	23,6643	9,5169	18,8661	19,6173	20,2304

Hasil tersebut di atas ditunjukkan dengan diagram batang seperti tampak di bawah ini berupa diagram rerata respons perubahan kepadatan tulang.



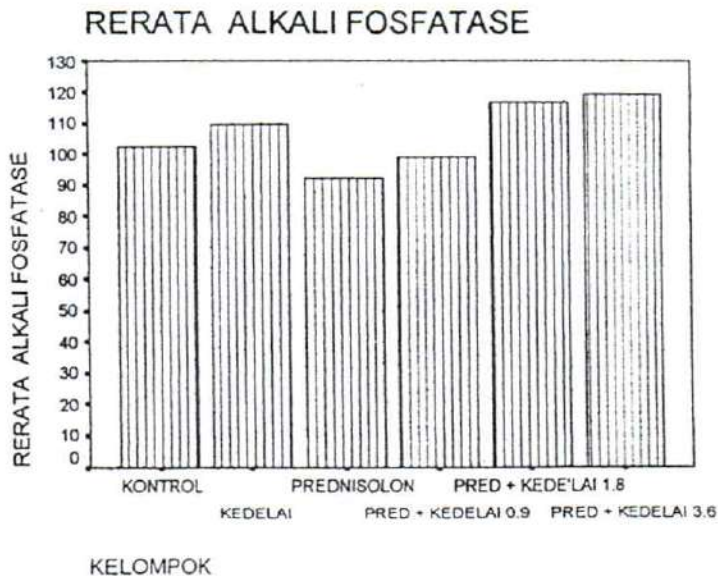
Gambar 5.2 Diagram yang menunjukkan rerata respons perubahan kepadatan tulang

Tabel 5.7 Statistik deskriptif hasil pengukuran kadar alkali fosfatase dalam serum (IU/L)

	Kelompok 1	Kelompok 2	Kelompok 3	Kelompok 4	Kelompok 5	Kelompok 6
Kadar alkali fosfatase rendah	96	101	72	69	72	81
Kadar alkali fosfatase tertinggi	112	125	115	158	158	160
Rerata kadar alkali fosfatase	102,13	109,75	92,38	98,88	116,87	119,50
Simpangan baku	5,54	10,65	15,31	26,59	33,39	26,40

Hasil tersebut di atas ditunjukkan dengan diagram batang seperti tampak di bawah ini berupa diagram rerata kadar alkali fosfatase serum

ALKALI FOSFATASE



Gambar 5.3 Diagram yang menunjukkan rerata kadar alkali fosfatase serum

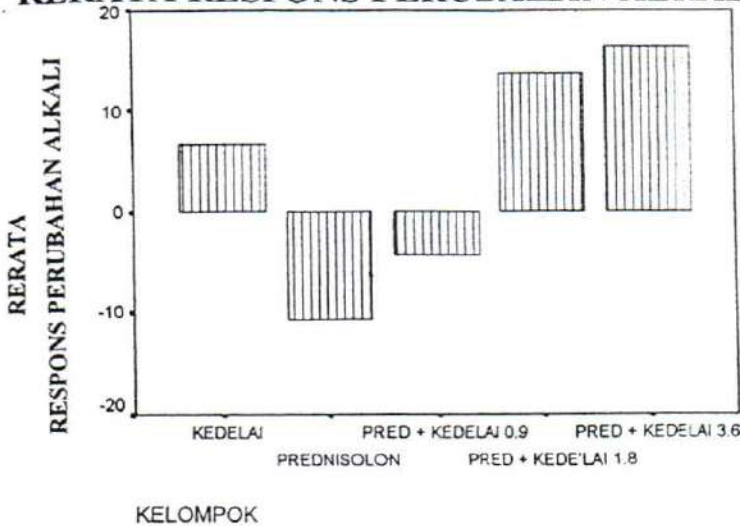
Hasil statistik deskriptif terhadap hasil pengukuran respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum terlihat pada tabel 5.8

Tabel 5.8 Statistik deskriptif hasil pengukuran respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum (IU/L) terhadap kelompok kontrol

	Kelompok 2	Kelompok 3	Kelompok 4	Kelompok 5	Kelompok 6
Rerata kadar alkali fosfatase	6,6200	-10,7550	-4,2550	13,7450	16,3700
Simpangan baku	10,6469	15,3058	26,5945	33,3913	26,4035

Hasil tersebut di atas ditunjukkan dengan diagram batang seperti tampak di bawah ini berupa diagram rerata respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum.

RESPONS PERUBAHAN ALKALI
RERATA RESPONS PERUBAHAN ALKALI



Gambar 5.4 Diagram yang menunjukkan rerata respons perubahan kadar alkali fosfatase serum

5.3 Hasil Uji Normalitas

Uji normalitas bertujuan untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis mempunyai distribusi normal atau tidak. Hal ini disebabkan pengujian menggunakan statistik parametrik mengharuskan data berdistribusi normal.

Uji normalitas terhadap data kepadatan tulang dan kadar alkali fosfatase dalam serum untuk semua kelompok dilakukan dengan menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov* (lampiran 14) seperti tampak pada tabel 5.9 di bawah ini.

Tabel 5.9 Hasil uji normalitas data masing-masing kelompok terhadap kepadatan tulang (m/dtk) dan kadar alkali fosfatase dalam serum (IU/L)

Nomer	Kelompok	p kepadatan tulang	p kadar alkali fosfatase serum
1	Kelompok 1	0,987	0,994
2	Kelompok 2	0,729	0,620
3	Kelompok 3	0,968	0,988
4	Kelompok 4	0,994	0,412
5	Kelompok 5	0,970	0,997
6	Kelompok 6	0,888	0,928

Hasil uji normalitas menggunakan *Uji Kolmogorov Smirnov* menunjukkan bahwa semua kelompok data kepadatan tulang dan data kadar alkali fosfatase dalam serum seperti tercantum pada tabel di atas berdistribusi normal ($p > 0,05$).

Sedangkan uji normalitas terhadap respons perubahan kepadatan tulang dan respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum untuk semua kelompok juga dilakukan dengan menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov* (lampiran 14) seperti tampak pada tabel 5.10 di bawah ini.

Tabel 5.10 Hasil uji normalitas data masing-masing kelompok terhadap respons perubahan kepadatan tulang (m/dtk) dan respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum (IU/L)

Nomer	Kelompok	p kepadatan tulang	p kadar alkali fosfatase serum
1	Kelompok 2	0,729	0,620
2	Kelompok 3	0,968	0,988
3	Kelompok 4	0,994	0,412
4	Kelompok 5	0,970	0,997
5	Kelompok 6	0,888	0,928

Hasil uji normalitas menggunakan *Uji Kolmogorov Smirnov* menunjukkan bahwa semua kelompok respons perubahan kepadatan tulang dan data respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum seperti tercantum pada tabel di atas berdistribusi normal ($p > 0,05$).

5.4 Hasil Analisis Multi Varians

Uji multi varians ini ditujukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan antar kelompok terhadap variabel tergantung. Ini dilakukan dengan menguji variabel

tergantug yaitu kepadatan tulang dan kadar alkali fosfatase serum menggunakan Tes Multivariat (*Multivariate Test*) (lampiran 15). Hasil uji multi varians ini terdapat pada tabel 5.11

Tabel 5.11 Hasil perhitungan uji multi varians untuk variabel kepadatan tulang (m/dtk) dan kadar alkali fosfatase dalam serum (IU/L)

Efek	F	P
Hotelling's Trace	3,629	0,001

Dari hasil perhitungan menggunakan uji multi varians menunjukkan bahwa secara bersama-sama rata-rata hasil pengukuran kepadatan tulang dan kadar alkali fosfatase dalam serum dipengaruhi oleh pemberian ekstrak kedelai dan prednisolon dengan $p < 0,05$.

Setelah diketahui ada pengaruh yang bermakna pada pemberian ekstrak kedelai dan prednisolon terhadap kepadatan tulang dan kadar alkali fosfatase dalam serum, kemudian akan dianalisis kelompok mana yang memberikan efek yang bermakna terhadap kepadatan tulang dan kadar alkali fosfatase dalam serum menggunakan uji beda pengaruh secara individu melalui Beda Nyata Terkecil (*pairwise comparisons*) (lampiran 16).

Hasil uji ini terlihat pada tabel 5.12 untuk kepadatan tulang (m/dtk) dan kadar alkali fosfatase dalam serum serta tabel 5.13 untuk respons perubahan kepadatan tulang dan respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum.

Tabel 5.12 Hasil perhitungan uji beda untuk kepadatan tulang (m/dtk) dan kadar alkali fosfatase dalam serum (IU/L)

Kelompok		p kepadatan	p kadar alkali fosfatase serum
Kontrol	Kedelai	0,022	0,492
	Prednisolon	0,014	0,380
	Pred+kedelai 0,9	0,720	0,769
	Pred+kedelai 1,8	0,402	0,187
	Pred+kedelai 3,6	0,101	0,121
Kedelai	Prednisolon	0,000	0,121
	Pred+kedelai 0,9	0,049	0,328
	Pred+kedelai 1,8	0,131	0,520
	Pred+kedelai 3,6	0,483	0,380
Prednisolon	Pred+kedelai 0,9	0,006	0,557
	Pred+kedelai 1,8	0,002	0,031
	Pred+kedelai 3,6	0,000	0,018
Pred+kedelai 0,9	Pred+kedelai 1,8	0,630	0,109
	Pred+kedelai 3,6	0,195	0,067
Pred+kedelai 1,8	Pred+kedelai 3,6	0,410	0,812

Pred = prednisolon

Tabel 5.13 Hasil perhitungan uji beda untuk respons perubahan kepadatan tulang (m/dtk) dan respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum (IU/L)

Kelompok		p kepadatan	p kadar alkali fosfatase serum
Kedelai	Prednisolon	0,000	0,156
	Pred+kedelai 0,9	0,063	0,370
	Pred+kedelai 1,8	0,153	0,556
	Pred+kedelai 3,6	0,506	0,421
Prednisolon	Pred+kedelai 0,9	0,009	0,591
	Pred+kedelai 1,8	0,003	0,048
	Pred+kedelai 3,6	0,000	0,030
Pred+kedelai 0,9	Pred+kedelai 1,8	0,648	0,142
	Pred+kedelai 3,6	0,219	0,094
Pred+kedelai 1,8	Pred+kedelai 3,6	0,435	0,828

Pred = prednisolon

Berdasar pada kepadatan tulang terdapat perbedaan rerata yang sangat bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok kedelai $p = 0,022$ ($p < 0,05$) dan dengan kelompok prednisolon $p = 0,014$ ($p < 0,05$). Sedangkan kelompok kontrol terhadap ketiga kelompok perlakuan pemberian prednisolon dan ekstrak kedelai tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna yaitu masing-masing terhadap kelompok prednisolon + ekstrak kedelai 0,9 dengan $p = 0,720$ ($p > 0,05$), terhadap kelompok prednisolon + ekstrak kedelai 1,8 dengan $p = 0,402$ ($p > 0,05$)

dan terhadap kelompok prednisolon + ekstrak kedelai 3,6 dengan $p = 0,101$ ($p > 0,05$).

Sementara itu antara kelompok kedelai dengan kelompok prednisolon dan antara kelompok kedelai dengan kelompok prednisolon + kedelai 0,9 terdapat perbedaan rerata yang sangat bermakna masing-masing dengan $p = 0,000$ ($p < 0,05$) dan $p = 0,049$ ($p < 0,05$). Tetapi tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna antara kelompok kedelai dengan kelompok prednisolon + kedelai 1,8 dan antara kelompok kedelai dengan kelompok prednisolon + kedelai 3,6 masing-masing dengan $p = 0,131$ ($p > 0,05$) dan $p = 0,483$ ($p > 0,05$).

Antara kelompok prednisolon dengan kelompok prednisolon + kedelai 0,9; kelompok prednisolon dengan kelompok prednisolon + kedelai 1,8 dan kelompok prednisolon dengan kelompok prednisolon + kedelai 3,6 terdapat perbedaan rerata yang bermakna dengan masing-masing $p = 0,006$ ($p < 0,05$); $p = 0,002$ ($p < 0,05$) dan $p = 0,000$ ($p < 0,05$).

Antara kelompok prednisolon + kedelai 0,9 dengan kelompok prednisolon + kedelai 1,8 tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna yaitu $p = 0,630$ ($p > 0,05$) demikian juga antara kelompok prednisolon + kedelai 0,9 dengan kelompok prednisolon + kedelai 3,6 yang memiliki harga $p = 0,195$ ($p > 0,05$).

Terakhir antara kelompok prednisolon + kedelai 1,8 dengan kelompok prednisolon + kedelai 3,6 tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna dengan $p = 0,195$ ($p > 0,05$).

Sedangkan berdasar pada kadar alkali fosfatase dalam serum tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok

kedelai harga $p = 0,492$ ($p > 0,05$), kelompok kontrol dengan kelompok prednisolon harga $p = 0,380$ ($p > 0,05$), kelompok kontrol dengan kelompok prednisolon + kedelai 0,9 harga $p = 0,769$ ($p > 0,05$), kelompok kontrol dengan kelompok prednisolon + kedelai 1,8 harga $p = 0,187$ ($p > 0,05$), kelompok kontrol dengan kelompok prednisolon + kedelai 3,6 harga $p = 0,121$ ($p > 0,05$).

Antara kelompok kedelai dengan kelompok prednisolon, kelompok kedelai dengan kelompok prednisolon + kedelai 0,9, kelompok kedelai dengan kelompok prednisolon + kedelai 1,8, kelompok kedelai dengan kelompok prednisolon + kedelai 3,6 tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna dengan masing-masing harga p adalah 0,121; 0,328; 0,520; 0,380 (semuanya $p > 0,05$).

Antara kelompok prednisolon dengan kelompok prednisolon + kedelai 0,9 tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna dengan harga $p = 0,557$ ($p > 0,05$), sedangkan antara kelompok prednisolon dengan kelompok prednisolon + kedelai 1,8 dan kelompok prednisolon dengan kelompok prednisolon + kedelai 3,6 terdapat perbedaan rerata yang bermakna dengan masing-masing harga p adalah 0,031 dan 0,018 (semuanya $p < 0,05$).

Antara kelompok prednisolon + kedelai 0,9 dengan kelompok prednisolon + kedelai 1,8 dan kelompok prednisolon + kedelai 0,9 dengan kelompok prednisolon + kedelai 3,6 juga tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna dengan masing-masing harga p adalah 0,109; 0,067 (semuanya $p > 0,05$).

Dan antara kelompok prednisolon + kedelai 1,8 dengan kelompok prednisolon + kedelai 3,6 juga tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna dengan harga p adalah 0,812 ($p > 0,05$).

Sementara itu berdasar pada respons perubahan kepadatan tulang terdapat perbedaan rerata yang sangat bermakna antara kelompok kedelai dengan kelompok prednisolon dengan $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Tetapi tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna antara kelompok kedelai dengan kelompok prednisolon + kedelai 0,9; antara kelompok kedelai dengan kelompok prednisolon + kedelai 1,8 dan antara kelompok kedelai dengan kelompok prednisolon + kedelai 3,6 masing-masing dengan $p = 0,063$ ($p > 0,05$), $p = 0,153$ ($p > 0,05$) dan $p = 0,506$ ($p > 0,05$). Antara kelompok prednisolon dengan kelompok prednisolon + kedelai 0,9, kelompok prednisolon dengan kelompok prednisolon + kedelai 1,8 dan kelompok prednisolon dengan kelompok prednisolon + kedelai 3,6 terdapat perbedaan rerata yang bermakna dengan masing-masing $p = 0,009$ ($p < 0,05$); $p = 0,003$ ($p < 0,05$) dan $p = 0,000$ ($p < 0,05$).

Antara kelompok prednisolon + kedelai 0,9 dengan kelompok prednisolon + kedelai 1,8 tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna yaitu $p = 0,648$ ($p > 0,05$) demikian juga antara kelompok prednisolon + kedelai 0,9 dengan kelompok prednisolon + kedelai 3,6 yang memiliki harga $p = 0,219$ ($p > 0,05$).

Terakhir antara kelompok prednisolon + kedelai 1,8 dengan kelompok prednisolon + kedelai 3,6 tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna dengan $p = 0,435$ ($p > 0,05$).

Sedangkan berdasar pada respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna antara kelompok kedelai dengan kelompok prednisolon, kelompok kedelai dengan kelompok prednisolon +

kedelai 0,9; kelompok kedelai dengan kelompok prednisolon + kedelai 1,8; kelompok kedelai dengan kelompok prednisolon + kedelai 3,6 dengan masing-masing harga p adalah 0,156; 0,370; 0,556; 0,421 (semuanya $p > 0,05$).

Antara kelompok prednisolon dengan kelompok prednisolon + kedelai 0,9 tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna dengan harga p adalah 0,591 ($p > 0,05$), sedangkan antara kelompok prednisolon dengan kelompok prednisolon + kedelai 1,8 dan antara kelompok prednisolon dengan kelompok prednisolon + kedelai 3,6 terdapat perbedaan rerata yang bermakna dengan masing-masing harga p adalah 0,048 dan 0,030 (semuanya $p < 0,05$).

Antara kelompok prednisolon + kedelai 0,9 dengan kelompok prednisolon + kedelai 1,8 dan kelompok prednisolon + kedelai 0,9 dengan kelompok prednisolon + kedelai 3,6 juga tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna dengan masing-masing harga p adalah 0,142; 0,094 (semuanya $p > 0,05$).

Dan antara kelompok prednisolon + kedelai 1,8 dengan kelompok prednisolon + kedelai 3,6 juga tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna dengan harga p adalah 0,828 ($p > 0,05$).

5.5 Hasil Uji Korelasi Regresi Linier

Uji Korelasi Regresi Linier adalah untuk mencari hubungan antara dua variabel dan dengan menggunakan uji korelasi ini dapat memprediksi variabel tergantung bila mengukur variabel bebasnya.

Persamaan regresi dinyatakan sebagai $y = a + bx$

y merupakan variabel tergantung, x adalah variabel bebas, a merupakan konstanta sedangkan b adalah koefisien regresi

Hubungan antara peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai dengan peningkatan efek penghambatan penurunan kepadatan tulang dan peningkatan kadar alkali fosfatase serum dapat diketahui melalui uji ini dan dapat dipakai untuk mengetahui seberapa besar pengaruh peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai terhadap peningkatan efek penghambatan penurunan kepadatan tulang dan peningkatan kadar alkali fosfatase serum.

Hasil uji korelasi regresi linier (Lampiran 17) antara peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai dengan peningkatan efek penghambatan penurunan kepadatan tulang dan peningkatan kadar alkali fosfatase serum terlihat pada tabel 5.14 di bawah ini.

Tabel 5.14 Hasil uji korelasi regresi linier antara peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai dengan peningkatan efek penghambatan penurunan kepadatan tulang dan peningkatan kadar alkali fosfatase serum.

Variabel	Konstanta regresi	Koefisien regresi	P
Kepadatan tulang	1636,50	4,365	0,000
Kadar ALP serum	97,5625	6,756	0,000

Dari hasil di atas didapat nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) untuk kepadatan tulang dan kadar alkali fosfatase serum. Hal ini berarti bahwa peningkatan dosis pemberian

ekstrak kedelai berpengaruh secara bermakna terhadap peningkatan efek penghambatan penurunan kepadatan tulang dan peningkatan kadar alkali fosfatase serum.

Dengan persamaan regresi yang didapat dari korelasi regresi linier di atas adalah sebagai berikut :

- a. Peningkatan penghambatan penurunan kepadatan tulang akibat peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai :

$$1636,50 + (4,365 \times \text{dosis ekstrak kedelai})$$

Kepadatan tulang dinyatakan dalam m/dtk sedangkan dosis ekstrak kedelai dalam mg.

Konstanta regresi sebesar 1636,50 menyatakan bahwa bila tidak dilakukan perlakuan berupa peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai maka hasil pengukuran kepadatan tulang yang diharapkan adalah 1636,50 m/dtk.

Sedangkan koefisien regresi sebesar 4,365 menyatakan bahwa setiap peningkatan dosis ekstrak kedelai sebesar 1 mg akan meningkatkan efek penghambatan penurunan kepadatan tulang sebesar 4,365 m/dtk.

- b. Peningkatan kadar alkali fosfatase akibat peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai:

$$97,5625 + (6,756 \times \text{dosis ekstrak kedelai})$$

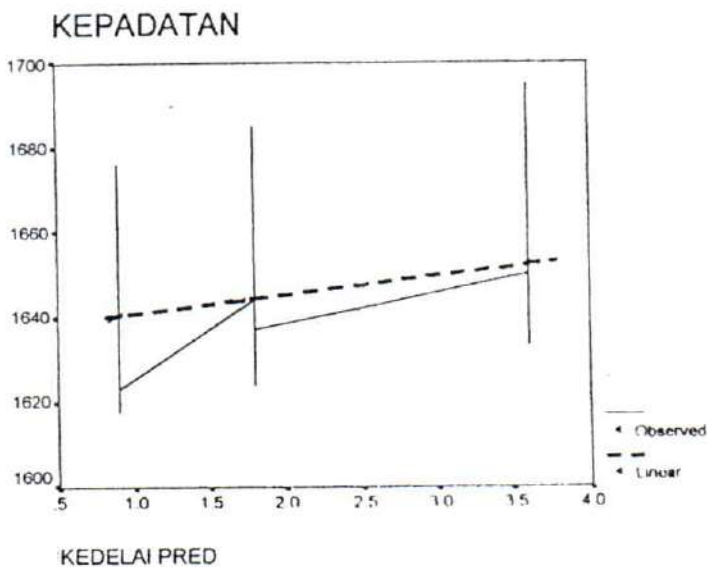
Kadar alkali fosfatase serum dinyatakan dalam IU/L dan dosis ekstrak kedelai dalam mg.

Konstanta sebesar 97,5625 menyatakan bahwa bila tidak ada perlakuan berupa peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai maka hasil

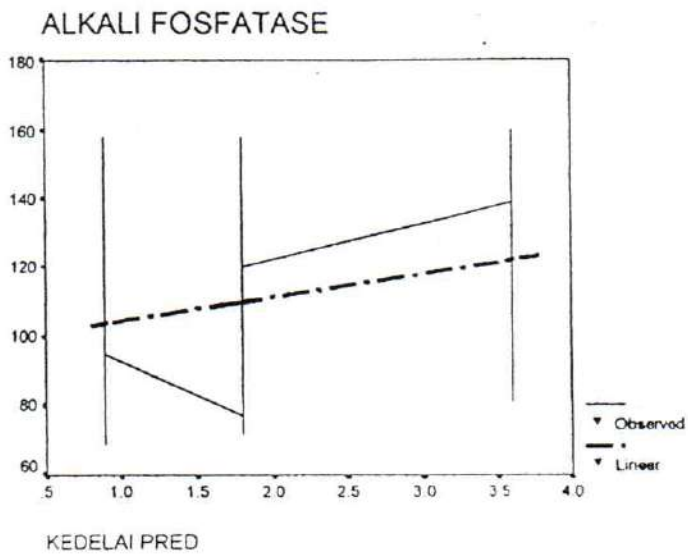
pengukuran kadar alkali fosfatase serum yang diharapkan adalah 97,5625 IU/L. Sedangkan koefisien regresi sebesar 6,756 menyatakan bahwa setiap peningkatan dosis ekstrak kedelai sebesar 1 mg akan meningkatkan kadar alkali fosfatase serum sebesar 6,756 IU/L.

Dari kedua persamaan regresi tersebut di atas terlihat bahwa setiap peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai menyebabkan peningkatan efek penghambatan penurunan kepadatan tulang dan peningkatan kadar alkali fosfatase serum.

Grafik yang menunjukkan hubungan antara peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai dengan peningkatan efek penghambatan penurunan kepadatan tulang dan peningkatan kadar alkali fosfatase serum terlihat pada gambar 5.5 dan 5.6 di bawah ini.



Gambar 5.5 Hubungan antara peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai dengan peningkatan efek penghambatan penurunan kepadatan tulang



Gambar 5.6 Hubungan antara peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai dengan peningkatan kadar alkali fosfatase serum

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Metode Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang dapat menghambat penurunan kepadatan tulang. Penelitian ini termasuk dalam penelitian eksperimental menggunakan hewan coba tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* galur wistar). Dipilihnya tikus putih berjenis kelamin jantan bertujuan agar estrogen endogen tidak mempunyai pengaruh terhadap hasil penelitian.

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *The Post-test Only Group Design*, diasumsikan bahwa dalam suatu populasi tertentu tiap populasi adalah homogen artinya semua karakteristik tiap unit populasi adalah sama. Pengukuran awal tidak dilakukan karena dianggap sama untuk semua kelompok. Hal ini disebabkan berasal dari satu populasi yang sama. Berdasar pada asumsi tersebut dikembangkan rancangan penelitian tanpa dilakukan pengukuran awal (*pre-test*) dan hanya dilakukan pengukuran akhir (*post-test*) (Zainuddin, 2000).

Jenis perlakuan yang diberikan pada hewan coba adalah pemberian prednisolon dan ekstrak kedelai yang diberikan secara oral. Dosis yang dipakai merupakan hasil konversi dari dosis yang digunakan pada manusia (30 mg prednisolon perhari dalam waktu 3 bulan dan 100 mg ekstrak kedelai). Semua kelompok diberikan perlakuan selama 100 hari menggunakan prednisolon, ekstrak kedelai dan

prednisolon + ekstrak kedelai dengan dosis yang berbeda-beda (0,9 mg; 1,8 mg dan 3,6 mg).

Hewan coba dikelompokkan menjadi enam kelompok. Kelompok satu merupakan kelompok yang hanya diberikan larutan CMC 0,5% dipakai sebagai kelompok kontrol kepadatan tulang dan kadar alkali fosfatase dalam serum tikus putih jantan.

Kelompok dua ditujukan untuk melihat efek pemberian ekstrak kedelai jangka panjang dalam meningkatkan kepadatan tulang dan meningkatkan kadar alkali fosfatase dalam serum akibat efek estrogenik fitoestrogen terhadap osteoblas.

Kelompok tiga bertujuan untuk melihat efek pemberian kortikosteroid (prednisolon) jangka panjang dalam menurunkan kepadatan tulang.

Setelah terbukti bahwa pemberian ekstrak kedelai jangka panjang mempunyai efek peningkatan kepadatan tulang dan pemberian kortikosteroid (prednisolon) jangka panjang menurunkan kepadatan tulang maka tiga kelompok berikutnya diberikan dua perlakuan tersebut dengan dosis prednisolon yang sama tetapi dosis ekstrak kedelai berlainan yaitu dosis fitoestrogen yang terbukti setara dengan estrogen konjugasi, dosis setengah dan dosis dua kali lipat.

Kepadatan tulang diukur menggunakan DBM Sonic 1200 yang merupakan alat untuk pemeriksaan kepadatan tulang secara kuantitatif menggunakan gelombang ultrasound (*Quantitative Ultrasound*). Alat ini sering digunakan dalam penelitian-penelitian guna mempelajari kepadatan tulang secara kuantitatif pada manusia maupun hewan coba. Gelombang ultrasound akan makin cepat dirambatkan pada tulang yang memiliki massa tulang makin padat dengan satuan m/detik.

Alat ini praktis, relatif tidak mahal, tidak invasif, bebas radiasi ionisasi, relatif mudah dioperasikan dan mudah dibawa ke mana-mana. Meskipun bukan teknik pemeriksaan baku emas, alat ini memiliki sensitivitas yang adekuat dalam membedakan keadaan tulang normal, osteopenia atau osteoporotik (Hans, 2000).

Kadar alkali fosfatase diukur dari serum sampel darah hewan coba menggunakan metode standar yang dioptimalisasikan dengan satuan IU/L sesuai rekomendasi *Deutsche Gessellschaft fur Chemie*. Keuntungan menggunakan enzim ini untuk menilai aktivitas osteoblas adalah relatif murah meskipun enzim ini tidak hanya dihasilkan oleh osteoblas.

6.2 Pembahasan Hasil Penelitian

Hasil penelitian merupakan data-data yang harus ditafsirkan dan harus dapat digeneralisasikan secara gamblang tentang arti hasil penelitian tersebut. Pembahasan merupakan penjelasan dari hasil penelitian yang dapat menjelaskan permasalahan di awal penelitian sehingga dapat dicapai tujuan penelitian.

6.2.1 Uji statistik deskriptif

Uji statistik deskriptif bertujuan untuk memperoleh gambaran yang lebih jelas mengenai distribusi data dan simpangan baku data-data yang didapat mengenai kepadatan tulang dan respons perubahan kepadatan tulang serta hasil pengukuran kadar alkali fosfatase dalam serum beserta respons perubahannya.

Dari hasil uji ini didapat bahwa rerata kepadatan tulang kelompok 2 lebih tinggi dibandingkan kelompok 1 menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kedelai mempunyai efek dalam meningkatkan kepadatan tulang. Rerata kepadatan tulang

kelompok 3 lebih rendah daripada kelompok 1 menunjukkan bahwa pemberian kortikosteroid jangka panjang dapat menurunkan kepadatan tulang. Sedangkan kelompok 4, 5 dan 6 memiliki rerata kepadatan tulang yang lebih tinggi daripada kelompok 3 menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kedelai dapat menghambat penurunan kepadatan tulang. Diantara kelompok 4, kelompok 5 dan kelompok 6; kelompok 6 memiliki rerata kepadatan tulang yang paling tinggi disusul kelompok 5 kemudian kelompok 4. Ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak kedelai yang diberikan memiliki kecenderungan meningkatkan penghambatan penurunan kepadatan tulang pada pemberian kortikosteroid jangka panjang.

Kalau diamati pada respons perubahan kepadatan tulang menunjukkan bahwa respons perubahan kelompok 2 terhadap kelompok 1 sebesar $21,5000 \pm 23,6643$ m/dtk (21,5000%) akibat pemberian ekstrak kedelai; sedangkan respons perubahan kelompok 3 terhadap kelompok 1 adalah minus $23,0000 \pm 9,5169$ m/dtk menunjukkan bahwa terjadi penurunan kepadatan tulang sebesar $23,0000 \pm 9,5169$ m/dtk (23,0000%) akibat pemberian kortikosteroid (prednisolon) jangka panjang. Sedangkan kelompok 4, 5 dan 6 menunjukkan respons perubahan terhadap kelompok 1 masing-masing sebesar $3,2500 \pm 18,8661$ m/dtk; $7,6250 \pm 19,6173$ m/dtk dan $15,1250 \pm 20,2304$ m/dtk. Ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kedelai mampu menghambat penurunan kepadatan tulang dan ada kecenderungan bahwa peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai meningkatkan penghambatan penurunan kepadatan tulang pada pemberian kortikosteroid jangka panjang. Kalau dilihat pada kelompok 3 pemberian kortikosteroid jangka panjang dapat menurunkan kepadatan tulang sebesar $23,0000 \pm 9,5169$ m/dtk; pada kelompok 4

respons perubahan kepadatan tulang menjadi $3,2500 \pm 18,8661$ m/dtk berarti respons perubahan kepadatan tulang sebesar 26,2500 (114,13043%), kelompok 5 memiliki respons perubahan kepadatan tulang menjadi $7,6250 \pm 19,6173$ m/dtk berarti respons perubahan kepadatan tulang menjadi sebesar 30,6250 (133,15217%), kelompok 6 respons perubahan kepadatan tulang menjadi $15,1250 \pm 20,2304$ m/dtk yang berarti respons perubahan kepadatan tulang menjadi sebesar 38,1250 (165,76087%).

Kalau mengamati statistik deskriptif hasil pengukuran kadar alkali fosfatase dalam serum terlihat bahwa rerata kadar alkali fosfatase kelompok 2 terhadap kelompok 1 menunjukkan kadar yang lebih tinggi. Sedangkan kelompok 3 terhadap kelompok 1 menunjukkan kadar yang lebih rendah. Sedangkan kelompok 4, 5 dan 6 memiliki rerata kadar alkali fosfatase yang lebih tinggi daripada kelompok 3. Diantara kelompok 4, kelompok 5 dan kelompok 6; kelompok 4 memiliki rerata kadar alkali fosfatase yang paling rendah disusul kelompok 5 kemudian kelompok 6. Ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak kedelai yang diberikan, memiliki kecenderungan peningkatan aktivitas osteoblas yang terlihat dengan meningkatnya kadar alkali fosfatase dalam serum.

Kalau mengamati respons perubahan kadar alkali fosfatase menunjukkan bahwa respons perubahan kelompok 2 terhadap kelompok 1 sebesar $6,6200 \pm 10,6469$ IU/L (6,6200%), hal ini menunjukkan bahwa aktivitas osteoblas meningkat akibat pemberian ekstrak kedelai; sedangkan respons perubahan kelompok 3 terhadap kelompok 1 adalah minus $10,7550 \pm 15,3058$ IU/L(-10,7550) akibat pemberian kortikosteroid jangka panjang. Ini menunjukkan bahwa

pemberian kortikosteroid jangka panjang menyebabkan penghambatan aktivitas osteoblas yang ditunjukkan dengan harga negatif respons perubahan rerata kadar alkali fosfatase dalam serum.

Sedangkan kelompok 4, 5 dan 6 menunjukkan respons perubahan terhadap kelompok 1 masing-masing sebesar $-4,2550 \pm 26,5945$ IU/L; $13,7450 \pm 33,3913$ IU/L dan $16,3700 \pm 26,4035$ IU/L. Ini menunjukkan bahwa peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai meningkatkan penghambatan penurunan kepadatan tulang pada pemberian kortikosteroid jangka panjang yang ditandai dengan peningkatan kadar alkali fosfatase serum akibat peningkatan aktivitas osteoblas. Kalau dilihat pada kelompok 3 pemberian kortikosteroid jangka panjang dapat menurunkan respons perubahan kadar alkali fosfatase sebesar $10,7550 \pm 15,3058$ IU/L ($-10,7550$), pada kelompok 4 penurunan respons perubahan kadar alkali fosfatase menjadi $4,2550 \pm 26,5954$ IU/L ($-4,2550$) yang berarti terjadi peningkatan respons perubahan kadar alkali fosfatase sebesar $6,5000$ ($60,43701\%$), kelompok 5 respons perubahan menjadi $13,7450$ berarti respons perubahan kadar alkali fosfatase menjadi sebesar $24,5000$ ($227,80102\%$), kelompok 6 respons perubahan menjadi $16,3700$ yang berarti respons perubahan kadar alkali fosfatase serum menjadi sebesar $27,1250$ ($252,20828\%$).

6.2.2 Uji normalitas

Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui bahwa data yang didapat berdistribusi normal, hal ini untuk memenuhi syarat pengujian menggunakan statistik parametrik. Uji ini dilakukan terhadap variabel tergantung yaitu kepadatan

tulang dan kadar alkali fosfatase dalam serum menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov*.

Dari hasil uji ini didapat semua kelompok data kepadatan tulang dan data kadar alkali fosfatase dalam serum adalah berdistribusi normal ($p > 0,05$). Sedangkan data respons perubahan kepadatan tulang dan data respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum juga memiliki distribusi normal ($p > 0,05$).

6.2.3 Uji Analisis Multi Varians

Uji ini digunakan untuk mengetahui pengaruh perlakuan antar kelompok terhadap variabel tergantung yaitu dengan mengujinya menggunakan Tes Multivariat (*Multivariate Test*).

Dari hasil uji ini didapat bahwa secara bersama-sama rerata hasil pengukuran kepadatan tulang maupun kadar alkali fosfatase dalam serum dipengaruhi oleh pemberian ekstrak kedelai dan prednisolon dengan $p = 0,001$ ($p < 0,05$).

Kemudian dengan uji beda menggunakan Uji Beda Nyata Terkecil (*Pairwise comparisons*) akan dianalisis kelompok mana yang memberikan efek bermakna terhadap kepadatan tulang dan kadar alkali fosfatase dalam serum.

Uji ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kedelai mempunyai nilai yang sangat bermakna dengan $p = 0,022$ ($p < 0,05$) yang berarti bahwa pemberian ekstrak kedelai dapat meningkatkan kepadatan tulang.

Demikian juga pemberian kortikosteroid (prednisolon) memiliki nilai yang sangat bermakna dengan $p = 0,014$ ($p < 0,05$) yang berarti bahwa pemberian kortikosteroid dapat menurunkan kepadatan tulang.

Sedangkan antara kelompok 1 (kelompok kontrol) dengan kelompok 4, 5 dan 6 tidak menunjukkan perbedaan rerata yang bermakna dengan harga p masing-masing 0,720; 0,420 dan 0,101 (semuanya $p > 0,05$); hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kedelai mampu menghambat penurunan kepadatan tulang pada pemberian kortikosteroid jangka panjang. Harga p yang semakin kecil menunjukkan bahwa dengan peningkatan dosis ekstrak kedelai memperlihatkan kecenderungan peningkatan penghambatan penurunan kepadatan tulang.

Antara kelompok 2 dengan kelompok 3 juga menunjukkan perbedaan rerata yang bermakna dengan harga $p = 0,000$ ($p < 0,05$) menunjukkan bahwa pemberian kedelai mempunyai pengaruh terhadap kepadatan tulang demikian juga pemberian kortikosteroid mempunyai juga memiliki pengaruh terhadap kepadatan tulang.

Antara kelompok 2 dengan kelompok 4 juga menunjukkan perbedaan rerata yang bermakna dengan $p = 0,049$ ($p < 0,05$). Sedangkan antara kelompok 2 dengan kelompok 5 dan kelompok 6 tidak menunjukkan perbedaan rerata yang bermakna dengan harga p masing-masing 0,131 dan 0,483 ($p > 0,05$). Artinya bahwa pemberian ekstrak kedelai pada saat memberikan kortikosteroid jangka panjang dapat menghambat penurunan kepadatan tulang.

Antara kelompok 3 dengan kelompok 4, kelompok 5 dan kelompok 6 menunjukkan perbedaan rerata yang bermakna dengan harga p masing-masing 0,006; 0,002 dan 0,000 ($p < 0,005$) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kedelai pada hewan coba tikus yang dilakukan pemberian kortikosteroid jangka panjang mampu menghambat penurunan kepadatan tulang. Dan dengan meningkatnya dosis pemberian ekstrak kedelai mempunyai kecenderungan meningkatkan

penghambatan penurunan kepadatan tulang ditandai dengan makin kecilnya harga p.

Dan kalau diamati antara kelompok 4 dengan kelompok 5 dan kelompok 6 mempunyai harga p masing-masing 0,630 dan 0,195 ($p > 0,05$), jadi tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna antara kelompok-kelompok tersebut. Harga p antara kelompok 4 dengan kelompok 5 lebih besar daripada harga p antara kelompok 4 dengan kelompok 6 menunjukkan bahwa terdapat kecenderungan peningkatan penghambatan penurunan kepadatan tulang dengan meningkatnya dosis pemberian ekstrak kedelai pada pemberian kortikosteroid jangka panjang.

Antara kelompok 5 dengan kelompok 6 tidak didapat perbedaan rerata yang bermakna dengan harga p = 0,410 ($p > 0,05$).

Sedangkan kalau mengamati hasil perhitungan uji beda nyata terkecil untuk perubahan respons kepadatan tulang didapat hasil seperti di bawah ini.

Antara kelompok 2 dengan kelompok 3 didapat harga p = 0,000 ($p < 0,005$) berarti bahwa terdapat perbedaan rerata yang bermakna. Ini berarti pemberian ekstrak kedelai mempunyai pengaruh terhadap kepadatan tulang demikian juga dengan pemberian kortikosteroid. Sedangkan antara kelompok 2 dengan kelompok 4, dengan kelompok 5 dan dengan kelompok 6 mempunyai harga p masing-masing 0,063; 0,153 dan 0,506 ($p > 0,05$), tidak terdapat perbedaan rata-rata kepadatan tulang yang bermakna; menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kedelai dapat menghambat penurunan kepadatan tulang pada pemberian kortikosteroid jangka panjang. Harga p yang semakin besar menunjukkan bahwa dengan meningkatnya

dosis pemberian ekstrak kedelai akan meningkatkan penghambatan penurunan kepadatan tulang pada pemberian kortikosteroid jangka panjang.

Antara kelompok 3 dengan kelompok 4, dengan kelompok 5 dan dengan kelompok 6 mempunyai harga p masing-masing 0,009; 0,003 dan 0,000 ($p < 0,05$). Ini berarti bahwa terdapat perbedaan rerata kepadatan tulang yang bermakna, jadi pemberian ekstrak kedelai mampu menghambat penurunan kepadatan tulang pada pemberian kortikosteroid jangka panjang dan harga p yang semakin kecil menunjukkan bahwa dengan peningkatan dosis memiliki kecenderungan meningkatkan penghambatan penurunan kepadatan tulang pada pemberian kortikosteroid jangka panjang.

Antara kelompok 4 dengan kelompok 5 dan dengan kelompok 6 mempunyai harga p masing-masing 0,648 dan 0,219 ($p > 0,05$) yang berarti tidak terdapat perbedaan rerata kepadatan tulang yang bermakna diantara ketiga kelompok tersebut. Harga p antara kelompok 4 dengan kelompok 5 lebih besar daripada harga p antara kelompok 4 dengan kelompok 6 menunjukkan bahwa terdapat kecenderungan peningkatan penghambatan penurunan kepadatan tulang dengan meningkatnya dosis pemberian ekstrak kedelai pada pemberian kortikosteroid jangka panjang.

Antara kelompok 5 dengan kelompok 6 mempunyai harga $p = 0,435$ ($p > 0,05$) yang berarti tidak terdapat perbedaan rerata kepadatan tulang yang bermakna diantara kedua kelompok tersebut.

Jadi pemberian ekstrak kedelai jangka panjang dapat meningkatkan kepadatan tulang sedangkan pemberian kortikosteroid (prednisolon) jangka panjang dapat menurunkan kepadatan tulang hewan coba. Kalau keduanya diberikan secara bersamaan yaitu ekstrak kedelai diberikan saat pemberian kortikosteroid jangka

panjang dilakukan, maka ekstrak kedelai mempunyai efek menghambat penurunan kepadatan tulang. Dengan peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai terdapat pula kecenderungan peningkatan penghambatan penurunan kepadatan tulang pada pemberian kortikosteroid jangka panjang.

Bila mengamati hasil perhitungan uji beda untuk kadar alkali fosfatase dalam serum hampir semua didapat harga $p > 0,05$ yang berarti tidak terdapat perbedaan rerata kadar alkali fosfatase dalam serum yang bermakna diantara kelompok-kelompok tersebut di atas; kecuali antara kelompok 3 dengan kelompok 5 dan antara kelompok 3 dengan kelompok 6 dengan p masing-masing 0,031 dan 0,018 ($p < 0,05$).

Demikian juga pada hasil perhitungan uji beda untuk respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum hampir semua didapat harga $p > 0,05$ yang berarti tidak terdapat perbedaan rerata respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum yang bermakna diantara kelompok-kelompok tersebut di atas, kecuali juga antara kelompok 3 dengan kelompok 5 dan antara kelompok 3 dengan kelompok 6 dengan p masing-masing 0,048 dan 0,030 ($p < 0,05$).

Kalau melihat hasil di atas mengenai kadar alkali fosfatase dalam serum, menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kedelai mempunyai pengaruh terhadap kadar alkali fosfatase dalam serum tetapi tidak bisa kiranya dikatakan bahwa dengan melihat kadar alkali fosfatase dalam serum dapat melihat keaktifan osteoblas akibat pemberian ekstrak kedelai dalam rangka menghasilkan matriks tulang untuk proses pembentukan tulang. Hal ini dikarenakan alkali fosfatase tidak hanya dihasilkan oleh osteoblas. Dengan kata lain kadar alkali fosfatase dalam

serum tidak dapat dipakai sebagai parameter meningkatnya proses pembentukan tulang yang dilakukan oleh osteoblas.

6.2.4 Korelasi regresi linier

Uji ini bertujuan untuk mencari hubungan antara dua variabel dan kemudian dapat memprediksi variabel tergantung bila mengukur variabel bebasnya. Dalam penelitian ini terbukti bahwa peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai berpengaruh secara bermakna terhadap peningkatan efek penghambatan penurunan kepadatan tulang dan peningkatan kadar alkali fosfatase dalam serum. Jadi terdapat hubungan antara peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai dengan peningkatan efek penghambatan penurunan kepadatan tulang dan peningkatan kadar alkali fosfatase serum.

6.3 Efek Pemberian Ekstrak Kedelai dalam Menghambat Penurunan Kepadatan Tulang

Menurut hasil di atas terbukti bahwa pemberian kortikosteroid (prednisolon) jangka panjang menyebabkan penurunan kepadatan tulang. Hal ini sesuai dengan penelitian Reginster, dkk (1999) bahwa pemberian kortikosteroid jangka panjang menyebabkan penurunan kepadatan tulang (Reginster, 1999). Pemberian prednisolon 30 mg / hari atau lebih selama 12 minggu atau lebih terbukti dapat menurunkan kepadatan tulang baik tulang trabekuler maupun tulang kortikal (Francis, 1990; Favus, 1993; Reginster et al, 1999). Demikian juga pemberian prednison 7,5 mg / hari atau lebih dalam jangka waktu 3 bulan atau lebih mempunyai resiko besar terjadinya penurunan kepadatan tulang (Niewoehner, 1999).

Dengan diberikannya kortikosteroid jangka panjang terjadi penurunan reabsorpsi kalsium pada tubulus renalis proksimalis ginjal sehingga menyebabkan peningkatan ekskresi kalsium bersama dengan urine, penghambatan absorpsi kalsium melalui sel *intestinum tenue*. Kedua hal di atas menyebabkan keadaan hipokalsemia sehingga merangsang glandula parathyroid mensekresi hormon parathyroid yang berakibat peningkatan kadar hormon ini dalam darah dikenal sebagai hiperparathyroidisme sekunder (Favus, 1993; Ziegler, 1998; Niewoehner, 1999; Patschan, 2001).

Selain itu juga akan terjadi perangsangan secara langsung glandula parathyroid untuk mensekresi PTH sehingga kadar PTH dalam darah meningkat disebut hiperparathyroidisme (Favus, 1993).

Keadaan hiperparathyroidisme menyebabkan efek penekanan fungsi osteoblas matur sehingga menyebabkan penurunan aktivitas osteoblas. Hiperparathyroidisme juga berpengaruh pada *bone lining cell* sehingga produksi IL-1 dan IL-6 meningkat sehingga menyebabkan peningkatan rekrutmen osteoklas dan memacu aktivitas osteoklas (Favus, 1993; Riggs, Melton, 1995; Tjokropawiro, 2000).

Pemberian kortikosteroid jangka panjang juga menyebabkan penurunan efek autokrin Prostaglandin E₂ (PGE₂) dan *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF 1) mengakibatkan penurunan fungsi osteoblas untuk mensintesis matriks tulang, penghambatan secara langsung maturasi prekursor osteoblas menjadi osteoblas matur (Favus, 1993; Niewoehner, 1999), penghambatan aktivitas osteosit yang menyebabkan naiknya sekresi osteopontin oleh osteosit. Osteopontin berpengaruh

pada peningkatan motilitas dan keberadaan osteoklas (Riggs, Melton, 1995; Chellaiah, 2003).

Sementara itu pemberian ekstrak kedelai terbukti dapat meningkatkan kepadatan tulang. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Anderson, 2003 bahwa pemberian isoflavon dalam jangka waktu lama dapat meningkatkan kepadatan tulang hewan coba (Anderson, 2003).

Seperti diketahui bahwa ekstrak kedelai yang banyak mengandung fitoestrogen (Anderson, 2003; Barnes, 2003; Gilbert, 2003; Head, 2003) sebagaimana estrogen mempunyai efek terhadap tulang sebagai berikut :

- a. Meningkatkan aktivitas osteoblas sehingga terjadi peningkatan produksi matriks tulang (Guyton, 1997) ditandai dengan peningkatan alkali fosfatase atau alkali fosfatase tulang dalam serum dan peningkatan jumlah osteoblas (Riggs, Melton, 1995; Roeshadi, 1997; Widijanti, Muchlison, 2003).
- b. Meningkatkan produksi TGF- β dan IGF I, keduanya menyebabkan apoptosis osteoklas sehingga aktivitas osteoklas menurun (Gowen, 1994; Prabowo, 1997).
- c. Menurunkan sekresi osteopontin oleh osteosit. Osteopontin berpengaruh terhadap peningkatan motilitas dan keberadaan osteoklas sehingga hal ini menyebabkan penurunan aktivitas osteoklas (Chellaiah, 2003).

- d. Merangsang sel parafolikuler glandula thyroid untuk memproduksi kalsitonin yang menurunkan aktivitas osteoklas (Bronner, 1991; Favus, 1993; Riggs, Melton, 1995).
- e. Adanya penurunan aktivitas osteoklas yang menurun menyebabkan penurunan proses penyerapan tulang.
- f. Karena adanya peningkatan aktivitas osteoblas matur dan penurunan aktivitas osteoklas setelah pemberian ekstrak kedelai maka akan terjadi peningkatan kepadatan tulang dan peningkatan berat tulang.

Bila ekstrak kedelai diberikan pada saat dilakukan pemberian kortikosteroid jangka panjang (prednisolon) terbukti mempunyai efek penghambatan penurunan kepadatan tulang hewan coba.

Hal ini sama dengan penelitian yang dilakukan menggunakan ipriflavon suatu turunan dari isoflavon, dengan dosis sebesar 600 mg / hari diberikan pada pasien-pasien yang menggunakan kortikosteroid jangka panjang. Setelah 6 bulan ternyata terdapat perbedaan antara kelompok yang diberikan ipriflavon dengan kelompok yang diberikan plasebo. Kelompok ipriflavon ternyata tidak terdapat perubahan densitas massa tulang yang bermakna (Head, 2003).

6.4 Perbedaan Efek Penghambatan Penurunan Kepadatan Tulang Akibat

Adanya Perbedaan Dosis

Menurut hasil di atas menunjukkan bahwa peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai meningkatkan efek penghambatan penurunan kepadatan tulang oleh ekstrak kedelai pada pemberian kortikosteroid jangka panjang. Hal ini

dimungkinkan karena akan semakin banyak ekstrak kedelai yang mampu berikatan dengan reseptor estrogen di osteoblas. Ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak kedelai yang diberikan, meningkatkan aktivitas osteoblas yang terlihat dengan meningkatnya kadar alkali fosfatase dalam serum. Dengan menggunakan tiga dosis yang berbeda* tampak adanya peningkatan proses penghambatan terhadap penurunan kepadatan tulang. Belum diketahui apakah dengan peningkatan selanjutnya dosis ekstrak kedelai akan terus meningkatkan penghambatan.

Pemberian fitoestrogen berupa ekstrak kedelai dengan dosis 90 – 100 mg / hari dapat dipakai sebagai alternatif terapi pengganti estrogen pada wanita pasca menopause (Sari, 2001; Dipiro, 2002; Gilbert, 2003) dan dosis ini terbukti setara dengan dosis estrogen konjugasi sebesar 0.625 mg (Sari, 2001). Ekstrak kedelai dengan dosis tersebut ternyata dapat meningkatkan kepadatan tulang; dan juga mempunyai efek penghambatan penurunan kepadatan tulang pada terapi kortikosteroid jangka panjang. Tetapi ternyata dengan dosis setengahnya sudah mampu menghambat penurunan kepadatan tulang. Dan apabila dosis ditingkatkan maka efek penghambatan ekstrak kedelai menjadi semakin besar. Dengan kata lain dosis berapapun pemberian ekstrak kedelai, terdapat efek penghambatan penurunan kepadatan tulang oleh ekstrak kedelai pada pemberian kortikosteroid jangka panjang; dan efek ini akan meningkat dengan meningkatnya dosis ekstrak kedelai yang diberikan.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang dapat menghambat terjadinya penurunan kepadatan tulang.
2. Pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang dapat meningkatkan kadar alkali fosfatase dalam serum.
3. Peningkatan dosis pemberian ekstrak kedelai pada terapi kortikosteroid jangka panjang dapat meningkatkan penghambatan terjadinya penurunan kepadatan tulang

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian serupa menggunakan pengukuran dengan histomorfometri dan pemeriksaan biokimia lainnya sebagai pembanding.
2. Perlu adanya penelitian lanjutan secara biomolekuler terhadap sel-sel tulang menggunakan perlakuan yang sama sehingga dapat dijelaskan lebih lanjut mengenai efek pemberian ekstrak kedelai dalam menghambat penurunan kepadatan tulang pada pemberian kortikosteroid jangka panjang.
3. Perlu dilakukan penelitian dengan dosis ekstrak kedelai yang lebih banyak sehingga dapat diketahui apakah peningkatan lebih lanjut dosis pemberian ekstrak kedelai dapat terus meningkatkan penghambatan penurunan kepadatan tulang pada pemberian kortikosteroid jangka panjang.

4. Perlu adanya penelitian lanjutan yang menerapkan hasil penelitian ini pada manusia sehingga diketahui efek penghambatan penurunan kepadatan tulang oleh ekstrak kedelai pada pemberian kortikosteroid jangka panjang secara langsung pada manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, 2000. Cytokines. In : Abbas AK, ed. **Cellular and Molecular Immunology**, 4th ed. WB Saunders company, Philadelphia. pp 235-242
- Anderson JB, 2003. **Dietary Phytoestrogen and Bone Health**. <http://www.Andrews.edu/NUFS/Phytoestrogen.htm>. tanggal akses 17 Juni 2003
- Anon. **Z.klin. Chem. u. klin. Biochem.** 1970. 8 : 658.
- Apley, 1993. Metabolic and Endocrine Disorders. In : Apley AG, ed. **Apley's System of Orthopaedics and Fractures**, 7th ed. Butterworth Heinemann, Oxford. pp 116-120.
- Baratawidjaja KG, 2000. Sitokin. **Imunologi Dasar**, edisi ke-4. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. hal. 93 - 96
- Barnes S, Kim H, 2003. **Soy Isof, Estrogens and Growth Factor Signaling**. http://reggiehea.donline.com/sixways_soy.html. Tanggal akses 7 Juni 2003
- Bostrom MP, 2000. Form and Function of Bone. In : Buckwater JA, Einhorn TA, Simon SR, eds. **Orthopaedic Basic Science : Biology and Biomechanics of The Musculoskeletal System**, 2nd ed. The American Academy of Orthopaedic Surgeons. pp 324-354
- Bronner F, Worrel RV, 1991. Calcium Metabolism. In : Bronner F, ed. **A BASIC SCIENCE PRIMER IN ORTHOPAEDICS**. pp 65-71.
- Chellaiah MA, Hruska KA, 2003. The Integrin (alpha)_v(beta)₃ dan CD44 Regulate the Actions of Osteopontin on Osteoclast Motility. **Calcified Tissue International**, Springer-Verlag New York, Vol 72, Number 3 / March 2003. pp 197-205
- Cook SD, Barrack RL, Skinner HB, 2000. Basic Science in Orthopedic Surgery. In : Skinner HB, ed. **CURRENT Diagnosis and Treatment in ORTHOPEDICS**, 2nd ed. Lange Medical Books / McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York. pp 3-8

- De Graaff KM, 1998. Skeletal System : Introduction and The Axial Skeleton. **Human Anatomy**, 5th ed. WCB McGraw-Hill, Boston. pp 131-133
- Dipiro JT, Talbert RL, 2002. Phytoestrogen. **Pharmacotherapy, A Pathophysiologic Approach**, 5th ed. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York. pp 1632-1633
- Favus MJ, 1993. Bone Resorbing Cells. In : Favus MJ, ed. **Primer on The Metabolic Bone Disease and Disorders of Mineral Metabolism**. 2nd ed. Raven Press New York. pp 25-35
- Francis RM, 1990. Oestrogen and Bone. **OSTEOPOROSIS PATOGENESIS AND MANAGEMENT**. Kluwer Academic Publisher Dordrecht, Boston, London. pp 87-94
- Ganong WF, 1999. **Review of Medical Physiology**, 19th ed. Stamford Appleton & Lange. pp 366-379
- Geneser F, 1994. Jaringan Rangka Tulang. **Buku Teks Histologi** jilid 1. Penerbit Binarupa Aksara, Jakarta. pp 234 - 236
- Gilbert MN, 2003. **The Healing Power of Soy's Isoflavones**. <http://reggiehealdonline.com/sixwayssoy.html>. Tanggal akses 7 Juni 2003
- Gowen M, 1994. Cytokines and Cellular Interactions in the Control of Bone Remodelling. **Bone and Mineral Research**. Elsevier Science, Amsterdam. pp 78-90
- Greenspan FS, Baxter JD, 2000. Glukokortikoid & Androgen Adrenal. **ENDOKRINOLOGI DASAR & KLINIK**, edisi 4. EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta. hal 409-417
- Greenspan FS, Baxter JD, 2000. Ovarium. **ENDOKRINOLOGI DASAR & KLINIK**, edisi 4. EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta. hal 545-555
- Guyton AC, 1997. Fisiologi Wanita Sebelum Kehamilan dan Hormon-Hormon Wanita. **Buku Ajar Fisiologi Kedokteran**, ed. 9. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta. hal 1289-1294.
- Hans D, 2000. Quantitative ultrasound and dual X-ray absorptiometry for discriminating vertebral fracture osteoporotic subjects from controls. **ECR 2000 Presentation 1127**.

- Head KA, 2003. Ipriflavone : **An Important Bone-Building Isoflavone.**
http://www.pillfreevitamins.com/flexostudy_2.htm. Tanggal akses 13 Juni 2003
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO, 1998. Tulang. **Histologi Dasar**, edisi ke-8. EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta. pp 136 – 150
- Katzung BG, 2002. Adrenocorticosteroid dan Antagonis Adrenokortikal. **FARMAKOLOGI Dasar dan Klinik**, buku 2, edisi ke-8. Penerjemah dan Editor Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Penerbit Salemba Medika, Jakarta. hal. 576 - 593
- Kresno SB, 2001. **IMUNOLOGI : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium**, edisi keempat. Balai Penerbit FKUI Jakarta. hal 63-83
- Laurence DR, Bennet PN, Brown MJ, 1997. Adrenal corticosteroids, antagonists, corticotropin. **Clinical Pharmacology**, 8th ed. CHURCHILL LIVINGSTONE New York. pp 599-604
- Madiyono B, Moeslichan S, Sastroasmoro S, Budiman I, Purwanto H, 1995. Perkiraan Besar Sampel. **Dasar-dasar Metodologi Penelitian Klinis**. Binarupa Aksara, Jakarta. hal. 188 - 191
- Merry K, Dodds R, Littlewood A and Gowen M, 1993. Expression of osteopontin mRNA by osteoclasts and osteoblasts in modeling adult human bone. **Journal of Cell Science**, Vol 104, Issue 4 1013-1020.
- Muir MM, Siva D, Dai D, Mason RS, 2002. The effect of isoflavones on human osteoblast proliferation, activity and life span in vitro. [http://www-unsa.joux.infrafr/nuts/pdf/clauidipdf](http://www.unsa.joux.infrafr/nuts/pdf/clauidipdf). Tanggal akses 8 Agustus 2003
- Niewoehner CB, Niewoehner DE, 1999. Steroid-induced osteoporosis. Are your asthmatic patients at risk ? **Postgraduate Medicine**. Maret 1999 Vol. 105 No. 3. pp 79-88
- Patschan, Loddenkemper, Buttgerfeit, 2001. Molecular Mechanism of Glucocorticoid-induced Osteoporosis. **BONE**. Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charite Hospital, Humboldt-Universitat, Berlin, Germany. Dec; 29(6) : 498-505

- Prabowo P, 1997. Osteoporosis Pada Wanita Posmenopause. **Majalah Obstetri Ginekologi**, vol. 6 no. 2 hal 5-9
- Pritchard DJ, 1996. **Instructional Courses Lectures**. American Academy of Orthopaedic Surgeons. vol. 45 pp 371-394
- Reginster JY et al, 1999. **Prophylactic Use of Alfacalcidol in Corticosteroid Induced Osteoporosis**. Original Article. International Osteoporosis Foundation and National Osteoporosis Foundation.
- Resnick, 1995. **Diagnosis of Bone And Joint Disorders**, 3rd ed. Philadelphia WB Saunders Company. pp 624-631, 633-634, 644-645
- Riggs BL, Melton LJ, 1995. Secondary Osteoporosis. In : Riggs BL, ed. **OSTEOPOROSIS, Etiology, Diagnosis and Management**, 2nd ed. Lippincott-Raven Philadelphia, New York. pp 183-185.
- Roeshadi D, 1997. Deteksi Dini Osteoporosis Pada Wanita Pasca Menopause. **Disertasi**, Program Pasca Sarjana, Universitas Airlangga, Surabaya. hal. 5.
- Rosier RN, Reynolds PR, O'Keefe RJ, 2000. Molecular and Cell Biology in Orthopedics. In : Buckwater JA, Einhorn TA, Simon SR, eds. **Orthopaedic Basic Science**, 2nd ed. American Academy of Orthopaedic Surgeon. pp 66-67
- Rubatzky VE, Yamaguchi M, 1997. KEDELAI, *Glycine max* (L) Merr. **Sayuran Dunia : Prinsip, produksi dan gizi**, edisi kedua, jilid 2. Penerbit ITB Bandung. hal. 262 –264.
- Salter RB, 1999. Generalized and Disseminated Disorders of Bone. **Textbook of Disorders and Injuries of the Musculoskeletal System**, 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp 190-194.
- Sankaran B, 2000. Osteoporosis Clinical, Radiological, Histological, Assessment and an Experimental Study.
- Sari GM, 2001. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kedelai (*Glycine max*) dibanding Estrogen Konjugasi Terhadap Kepadatan Tulang Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). **Thesis**, Program Pasca Sarjana, Universitas Airlangga, Surabaya. hal. 2-3
- Schimmer BP, Parker KL, 1996. Adrenocorticotrophic Hormone; Adrenocortical Steroids And Their Analogs; Inhibitors of The Synthesis And Actions of

- Adrenocortical Hormones. **Goodman & Gilman's The PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS**, 9th ed. McGraw-Hill, New York. pp 1462-1476
- Setchell K, 2003. Absorption and Metabolism of Isoflavones. <http://C:\My Documents\What is Isoflavone.htm>. Tanggal akses 8 Agustus 2003
- Smith JB, Mangkoewidjojo S, 1988. **PEMELIHARAAN, PEMBIAKAN DAN PENGGUNAAN HEWAN PERCOBAAN DI DAERAH TROPIS**. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta. hal 57
- Smith R, 1998. Bone in Health and Disease. **Oxford Textbook of Rheumatology**, 2nd ed vol. 1. Oxford University Press. pp 421-431
- Soehartono DS, 2003. Bagaimana Mencegah Terjadinya Osteoporosis Pada Wanita Menopause. **Symposium Osteoporosis, Current Understandings, Clinical Applications and Future Directions**. Hotel Sheraton Surabaya, Masyarakat Endokrin Indonesia Surabaya, Pusat Diabetes & Nutrisi FKUA/RSU dr. Soetomo Surabaya.
- Suherman SK, 1995. ADRENOKORTIKOTROPIN, ADRENOKORTIKOSTEROID, ANALOG-SINTETIK DAN ANTAGONISNYA. **FARMAKOLOGI DAN TERAPI**, edisi 4. Bagian Farmakologi FKUI, Jakarta. hal. 482-489
- Suherman SK, 1995. ESTROGEN, ANTIESTROGEN, PROGESTIN, DAN KONTRASEPSI HORMONAL. **FARMAKOLOGI DAN TERAPI**, edisi 4. Bagian Farmakologi FKUI, Jakarta. hal. 439-442
- Suprpto, 2002. **Bertanam Kedelai**. Penerbit Penebar Swadaya, Depok. hal. 1-6
- Tauchmanova L, Rossi R, Nuzzo V, del Puente et al, 2003. CLINICAL STUDY : Bone loss determined by quantitative ultrasonometry correlates inversely with disease activity in patients with endogenous glucocorticoid excess due to adrenal mass. **European Journal of Endocrinology**, July 2003.
- Taxel P, 1998. Osteoporosis : Detection, prevention, and treatment in primary care. **GERIATRICS Medicine for Midlife and Beyond**, August 1998 Vol. 53 No.8. pp 22-40

- Thibodeau, 1996. **Structure and Function of The Body**, 15th ed. Mosby Year Book, Inc. USA. pp 79-85
- Thomas ANS, 1992. **Tanaman Obat Tradisional**, jilid 2. Penerbit Kanisius Jogjakarta. hal 63-65
- Tjokroprawiro A, 2000. **Introduction with Osteoporosis**. Symposium on Osteoporosis, Graha BIK-IPTEKDOK FKUA, Surabaya. hal 1-35
- Vigorita VJ, 1999. Introduction. **Orthopaedic Pathology**. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp 1-20
- WHO Study group report, 1994. **Assessment of fractures risk and its application to screening for post menopausal osteoporosis**. WHO-Geneve. p. 2-5
- Widijanti A, Muchlisson S, 2003. **Pemeriksaan Laboratorium Osteoporosis**. MEDIKA No 4 Tahun XXIX, April 2003. hal 239-242
- Widodo JP, Poernomo H, Machfoed MH, 1993. **Metode Penelitian dan Statistik Terapan**. Airlangga University Press Surabaya. hal 57 - 58
- Wilgenburg HV, 2003. Therapeutical Possibilities of Phytoestrogens. **SEMINAR FITOESTROGEN**. Pusat Penelitian Obat Tradisional dan Fakultas Farmasi Universitas Katholik Widya Mandala Surabaya. Sabtu, 10 Mei 2003
- Williams JD, 1998. **Williams Textbook of Endocrinology**, 9th ed. WB Saunders Company, Philadelphia. pp 1221-1226
- Yuliati, 2002. Pengaruh Pemberian Tambahan Kalsium Dan Estrogen Terhadap Pertumbuhan Tulang Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus* strain Wistar). **Thesis**, Program Pasca Sarjana, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Zainuddin M, 2000. **Metodologi Penelitian**. Universitas Airlangga hal 53-54
- Ziegler R, Kasperk C, 1998. Glucocorticoid-induced osteoporosis : prevention and treatment. **STEROID**. Department of Internal Medicine I, Endocrinology and Metabolism, University of Heidelberg, Germany. May-Jun; 63 (5-6) : 344-8

Lampiran 1

Perhitungan dosis hewan coba menggunakan tabel konversi Laurence & Bacharach (1964) (Laurence dan Bacharach , 1964 *cit* Donatus dan Nurlaila, 1986) sebagai berikut :

	Mencit 20 gram	Tikus 200 gram	Marmot 400 gram	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 gram	1,0	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 gram	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmot 400 gram	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 2 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,1	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

Lampiran 2

Konversi perhitungan dosis pemberian kortikosteroid dan ekstrak kedelai sebagai berikut :

a. Perhitungan dosis prednisolon untuk hewan coba adalah

Berat badan tikus seperti pada tabel adalah 200 gram

Berat badan manusia standar seperti di tabel adalah 70 kg

Faktor konversi sesuai tabel adalah 0,018

Dosis prednisolon yang diketahui dapat menurunkan kepadatan tulang adalah 30 mg / hari

Dosis prednisolon untuk hewan coba adalah

$30 \text{ mg} \times 0,018 = 0,54 \text{ mg} / 200 \text{ g tikus} / \text{hari}$ diberikan secara oral dengan sonde.

Jadi pemberian prednisolon sebesar $0,54 \text{ mg} / 200 \text{ g tikus} / \text{hari}$

b. Perhitungan dosis ekstrak kedelai untuk hewan coba adalah

Berat badan tikus seperti pada tabel adalah 200 gram

Berat badan manusia standar seperti di tabel adalah 70 kg

Faktor konversi sesuai tabel adalah 0,018

Dosis ekstrak kedelai adalah 100 mg/hari

Dosis ekstrak kedelai untuk hewan coba adalah

$100 \text{ mg} \times 0,018 = 1,8 \text{ mg} / 200 \text{ gram tikus} / \text{hari}$ peroral

Jadi pemberian ekstrak kedelai sebesar $1,8 \text{ mg} / 200 \text{ g tikus} / \text{hari}$

Dosis ekstrak kedelai 1,8 mg tersebut adalah dosis standar, sebagai kelompok pembanding digunakan dosis yang lebih kecil yaitu 0,9 mg dan dosis yang lebih besar yaitu 3,6 mg.

Lampiran 3

Jumlah sampel didapat dari rumus (Widodo, 1993; Madiyono, 1995)

$$n = (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2$$

Keterangan

n = perkiraan jumlah sampel masing-masing kelompok

Z_{α} = simpang baku normal $\alpha = 1,65$ ($\alpha = 0,05$)

Z_{β} = simpang baku normal $\beta = 0,842$ (power = 80%)

Jumlah sampel sebesar

$$n = (1,65 + 0,842)^2$$

$$n = 6,210064$$

dibulatkan menjadi $n = 7$

Kemungkinan hewan coba mati didapat dari menghitung faktor resiko (f) sebesar 3% sehingga

$$1 / 1 - f \times 7 = 7,216 \Rightarrow 8 \text{ ekor}$$

Jadi jumlah sampel tikus tiap kelompok adalah 8 ekor

Lampiran 4

Pemberian maksimal volume larutan obat perlakuan pada hewan coba berdasar pada tabel Ritchel (1974) (Ritchel, 1974 *cit* Donatus dan Nurlaila, 1986) sebagai berikut :

HEWAN	volume	maksimum	sesuai	jalur	pemberian
	iv	i.m.	i.p	s.c	p.o
Mencit (20 – 30 gram)	0,5	0,05	1,0	0,5-1,0	1,0
Tikus (200 gram)	1,0	0,1	2,0-5,0	2,0-5,0	5,0
Hamster (50 gram)	-	0,1	1,0-2,0	2,5	2,5
Marmot (250 gram)	-	0,25	2,0-5,0	5,0	10,0
Merpati (300 gram)	2,0	0,5	2,0	2,0	10,0
Kelinci (2500 gram)	5,0-10,0	0,5	10,0-20,0	5,0-10,0	20,0
Kucing (3000 gram)	5,0-10,0	1,0	10,0-20,0	5,0-10,0	50,0
Anjing (5000 gram)	10,0-20,0	5,0	20,0-50,0	10,0	100,0

Lampiran 5

Jadwal Penelitian

No	Kegiatan	Bulan ke -									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.	Penelusuran pustaka	X	X	X							
2.	Penyusunan proposal penelitian		X	X	X						
3.	Seminar proposal				X						
4.	Pelaksanaan penelitian & ambil data				X	X	X				
5.	Olah data & Analisis hasil							X	X		
6.	Penyusunan laporan penelitian								X	X	
7.	Presentasi										X

Lampiran 6

Pembuatan ekstrak kedelai

Kedelai yang digunakan adalah kedelai putih yang banyak didapat di pasaran.

Cara pembuatan ekstrak kedelai

Pembuatan ekstrak kedelai antara lain dengan cara maserasi. Urut-urutannya sebagai berikut :

1. Kedelai direndam dengan pelarut alkohol 96% selama 24 jam
2. Setelah 24 jam kemudian disaring
3. Ampas yang didapat kemudian direndam lagi dengan pelarut dan waktu yang sama
4. Perendaman dan penyaringan dilakukan sebanyak tiga kali 24 jam sehingga diperoleh ekstrak kedelai yang encer
5. Ekstrak ini kemudian dipekatkan dengan *Rotary Evaporator* melalui penurunan tekanan pada suhu 40° - 45° C hingga diperoleh ekstrak kedelai

Lampiran 7**Pembuatan larutan / suspensi****1. Pembuatan larutan CMC natrium 0,5% (*CarboxyMethylCellulose*)**

Larutan CMC natrium 0,5% (0,5 gram / 100 ml aquades)

Timbang 0,5 gram CMC natrium dan larutkan dalam 100 ml aquades.

2. Pembuatan suspensi prednisolon 0,54 mg / 2,5 ml CMC natrium 0,5%

a. Timbang 0,54 mg prednisolon kemudian dilarutkan dalam 2,5 ml larutan CMC natrium 0,5% (atau 21,6 mg dalam 100 ml larutan CMC natrium 0,5%); atau

b. Satu tablet prednisolon 4 mg dilarutkan dalam

4

(----- X 2,5) ml larutan CMC natrium 0,5%

0,54

⇒ 18,52 ml larutan CMC natrium 0,5%

3. Pembuatan suspensi ekstrak kedelai

a. 0,9 mg / 2,5 ml CMC natrium 0,5%

Timbang 0,9 mg ekstrak kedelai kemudian dilarutkan dalam 2,5 ml larutan CMC natrium 0,5% atau 36 mg ekstrak kedelai dalam 100 ml larutan CMC natrium 0,5%

b. 1,8 mg / 2,5 ml CMC natrium 0,5%

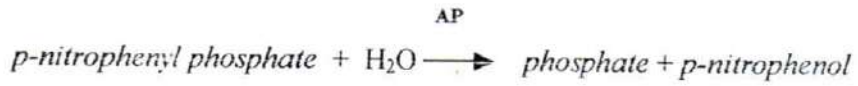
Timbang 1,8 mg ekstrak kedelai kemudian dilarutkan dalam 2,5 ml larutan CMC natrium 0,5% atau 72 mg ekstrak kedelai dalam 100 ml larutan CMC natrium 0,5%

c. 3,6 mg / 2,5 ml CMC natrium 0,5%

Timbang 3,6 mg ekstrak kedelai kemudian dilarutkan dalam 2,5 ml larutan CMC natrium 0,5% atau 144 mg ekstrak kedelai dalam 100 ml larutan CMC natrium 0,5%

Lampiran 8

Prinsip tes pemeriksaan kadar alkali fosfatase dalam serum (IU/L) dengan metode standar yang dioptimalisasi sesuai rekomendasi *Deutsche Gessellschaft fur Chemie* (Anon., 1970)



Lampiran 9**Pakan tikus (P3 CP 524-2)**

Kadar air	13,0%
Protein	17,0 – 18,0%
Lemak	3,0%
Serat	6,0%
Abu	12,0%
Kalsium	3,60%
Fosfor	0,60%

Bahan-bahan yang dipakai antara lain :

Jagung, dedak, tepung ikan, bungkil, kedelai, bungkil kelapa, tepung daging dan tulang, pecahan gandum, bungkil kacang tanah, canola, tepung daun, vitamin, kalsium, fosfat dan *trace mineral*.

Antibiotika Zinc Bacitracin

Lampiran 10**Tabel berat badan hewan coba****1. Berat badan sebelum perlakuan (gram)**

No	Kelompok 1	Kelompok 2	Kelompok 3	Kelompok 4	Kelompok 5	Kelompok 6
1	178	237	195	214	195	214
2	243	230	216	175	206	119
3	147	230	218	272	200	200
4	183	165	236	220	220	119
5	218	195	210	210	235	198
6	217	245	204	217	218	218
7	179	204	203	225	210	215
8	174	177	193	207	165	180

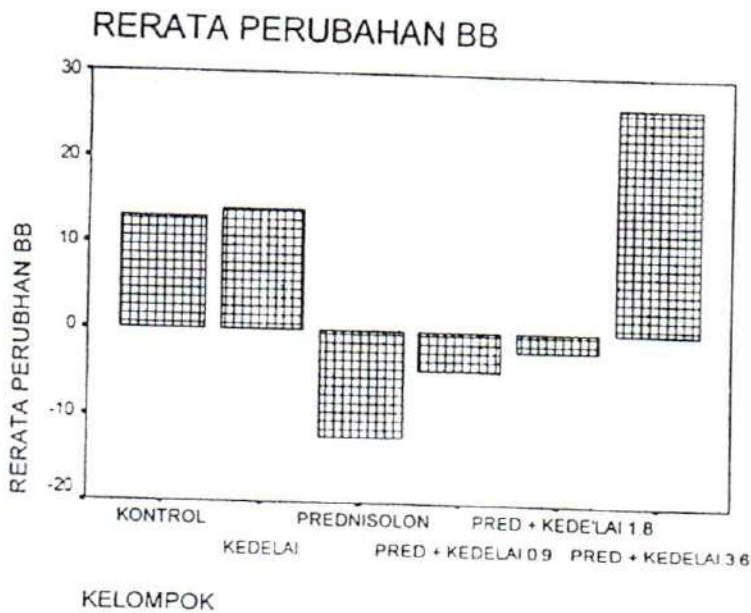
2. Berat badan setelah perlakuan (gram)

No	Kelompok 1	Kelompok 2	Kelompok 3	Kelompok 4	Kelompok 5	Kelompok 6
1	219	250	160	205	230	230
2	267	233	220	165	205	205
3	155	250	200	295	205	210
4	185	182	220	225	210	225
5	223	210	192	180	190	190
6	220	275	200	219	205	200
7	190	210	185	210	215	220
8	185	185	200	205	172	195

Lampiran II

Statistik deskriptif berat badan awal hewan coba (sebelum perlakuan) dan berat badan akhir hewan coba (setelah perlakuan).

KELOMPOK		BB AWAL	BB AKHIR	PERUBAHAN BB
KONTROL	RERATA	192.3750	205.5000	13.1250
	SIM. BAKU	30.9282	34.0420	13.2173
	N	8	8	8
KEDELAI	RERATA	210.3750	224.3750	14.0000
	SIM. BAKU	29.5873	33.1875	8.6520
	N	8	8	8
PREDNISOLON	RERATA	209.3750	197.1250	-12.2500
	SIM. BAKU	13.9994	19.3571	13.8022
	N	8	8	8
PRED + KEDELAI 0.9	RERATA	217.5000	213.0000	-4.5000
	SIM. BAKU	26.7742	38.6079	15.6114
	N	8	8	8
PRED + KEDELAI 1.8	RERATA	206.1250	204.0000	-2.1250
	SIM. BAKU	20.8219	17.1381	22.6239
	N	8	8	8
PRED + KEDELAI 3.6	RERATA	182.8750	209.3750	26.5000
	SIM. BAKU	41.2741	14.5006	44.7341
	N	8	8	8



Lampiran 12

Data hasil pengukuran kepadatan tulang dan kadar alkali fosfatase dalam serum setelah mendapat perlakuan masing-masing kelompok

1. Kepadatan tulang (m/dtk)

No	Kelompok 1	Kelompok 2	Kelompok 3	Kelompok 4	Kelompok 5	Kelompok 6
1	1630	1637	1618	1655	1644	1650
2	1647	1669	1616	1640	1625	1639
3	1639	1640	1613	1676	1637	1643
4	1642	1643	1611	1630	1655	1633
5	1634	1677	1601	1633	1685	1636
6	1654	1693	1619	1618	1624	1660
7	1613	1679	1631	1647	1650	1661
8	1637	1630	1603	1623	1637	1695
Σ	13096	13268	12912	13122	13157	13217

2. Kadar alkali fosfatase dalam serum (IU/L)

No	Kelompok 1	Kelompok 2	Kelompok 3	Kelompok 4	Kelompok 5	Kelompok 6
1	97	101	100	69	77	139
2	96	122	86	97	111	100
3	107	106	72	92	100	130
4	100	100	115	100	158	81
5	112	102	106	77	72	124
6	105	102	72	130	158	130
7	98	125	96	158	139	92
8	102	120	92	95	120	160
Σ	822	878	739	818	935	956

Lampiran 13

Hasil statistik deskriptif terhadap kepadatan tulang, respons perubahan kepadatan tulang, hasil pengukuran kadar alkali fosfatase dalam serum dan respons perubahan kadar alkali fosfatase dalam serum

KELOMPOK		KEPADATAN	ALKALI FOSFATASE
KONTROL	RERATA	1637.00	102.13
	SIM. BAKU	12.26	5.54
	N	8	8
KEDELAI	RERATA	1658.50	109.75
	SIM. BAKU	23.66	10.65
	N	8	8
PREDNISOLON	RERATA	1614.00	92.38
	SIM. BAKU	9.52	15.31
	N	8	8
PRED + KEDELAI 0.9	RERATA	1640.25	98.88
	SIM. BAKU	18.87	26.59
	N	8	8
PRED + KEDELAI 1.8	RERATA	1644.63	116.87
	SIM. BAKU	19.62	33.39
	N	8	8
PRED + KEDELAI 3.6	RERATA	1652.13	119.50
	SIM. BAKU	20.23	26.40
	N	8	8

KELOMPOK		MATURASI KEPADATAN	MATURASI ALKALI
KEDELAI	RERATA	21.5000	6.6200
	SIM. BAKU	23.6643	10.6469
	N	8	8
PREDNISOLON	RERATA	-23.0000	-10.7550
	SIM. BAKU	9.5169	15.3058
	N	8	8
PRED + KEDELAI 0.9	RERATA	3.2500	-4.2550
	SIM. BAKU	18.8661	26.5945
	N	8	8
PRED + KEDELAI 1.8	RERATA	7.6250	13.7450
	SIM. BAKU	19.6173	33.3913
	N	8	8
PRED + KEDELAI 3.6	RERATA	15.1250	16.3700
	SIM. BAKU	20.2304	26.4035
	N	8	8

Lampiran 14

Perhitungan statistik dengan menggunakan *Uji Kolmogorov-Smirnov* untuk semua kelompok

KELOMPOK = KONTROL**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		KEPADATAN	ALKALI FOSFATASE
N		8	8
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1637.00	102.13
	Std. Deviation	12.26	5.54
Most Extreme Differences	Absolute	.159	.149
	Positive	.100	.149
	Negative	-.159	-.134
Kolmogorov-Smirnov Z		.450	.422
Asymp. Sig. (2-tailed)		.987	.994

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data

c. KELOMPOK = KONTROL

KELOMPOK = KEDELAI**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		KEPADATAN	ALKALI FOSFATASE
N		8	8
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1658.50	109.75
	Std. Deviation	23.66	10.65
Most Extreme Differences	Absolute	.244	.267
	Positive	.244	.267
	Negative	-.171	-.207
Kolmogorov-Smirnov Z		.689	.754
Asymp. Sig. (2-tailed)		.729	.620

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = KEDELAI

KELOMPOK = PREDNISOLON**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		KEPADATAN	ALKALI FOSFATASE
N		8	8
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1614.00	92.38
	Std. Deviation	9.52	15.31
Most Extreme Differences	Absolute	.175	.158
	Positive	.175	.158
	Negative	-.126	-.115
Kolmogorov-Smirnov Z		.494	.448
Asymp. Sig. (2-tailed)		.968	.988

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = PREDNISOLON

KELOMPOK = PRED + KEDELAI 0.9**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		KEPADATAN	ALKALI FOSFATASE
N		8	8
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1640.25	98.88
	Std. Deviation	18.87	26.59
Most Extreme Differences	Absolute	.150	.313
	Positive	.150	.313
	Negative	-.119	-.148
Kolmogorov-Smirnov Z		.423	.886
Asymp. Sig. (2-tailed)		.994	.412

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = PRED + KEDELAI 0.9

KELOMPOK = PRED + KEDE'LAI 1.8**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		KEPADATAN	ALKALI FOSFATASE
N		8	8
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1644.63	116.88
	Std. Deviation	19.62	33.39
Most Extreme Differences	Absolute	.173	.141
	Positive	.173	.134
	Negative	-.147	-.141
Kolmogorov-Smirnov Z		.491	.399
Asymp. Sig. (2-tailed)		.970	.997

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = PRED + KEDE'LAI 1.8

KELOMPOK = PRED + KEDELAI 3.6**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		KEPADATAN	ALKALI FOSFATASE
N		8	8
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1652.13	119.50
	Std. Deviation	20.23	26.40
Most Extreme Differences	Absolute	.205	.193
	Positive	.205	.145
	Negative	-.172	-.193
Kolmogorov-Smirnov Z		.581	.545
Asymp. Sig. (2-tailed)		.888	.928

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = PRED + KEDELAI 3.6

Lampiran 15

Uji Tes Multivariat (*Multivariate Test*) terhadap variabel tergantung (kepadatan tulang dan kadar alkali fosfatase dalam serum)

Multivariate Tests^c

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	1.000	194280.8 ^a	2.000	41.000	.000
	Wilks' Lambda	.000	194280.8 ^a	2.000	41.000	.000
	Hotelling's Trace	9477.111	194280.8 ^a	2.000	41.000	.000
	Roy's Largest Root	9477.111	194280.8 ^a	2.000	41.000	.000
KEL	Pillai's Trace	.522	2.963	10.000	84.000	.003
	Wilks' Lambda	.509	3.299 ^a	10.000	82.000	.001
	Hotelling's Trace	.907	3.629	10.000	80.000	.001
	Roy's Largest Root	.836	7.026 ^b	5.000	42.000	.000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept+KEL

Lampiran 16

Uji beda pengaruh secara individu melalui uji beda nyata terkecil (*Pairwise Comparisons*)

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
KEPADATAN	KONTROL	KEDELAI	-21.500	9.016	.022
		PREDNISOLON	23.000	9.016	.014
		PRED + KEDELAI 0.5	-3.250	9.016	.720
		PRED + KEDELAI 1	-7.625	9.016	.402
		PRED + KEDELAI 3	-15.125	9.016	.101
	KEDELAI	PREDNISOLON	44.500	9.016	.000
		PRED + KEDELAI 0.5	18.250	9.016	.049
		PRED + KEDELAI 1	13.875	9.016	.131
		PRED + KEDELAI 3	6.375	9.016	.483
	PREDNISOLON	PRED + KEDELAI 0.5	-26.250	9.016	.006
		PRED + KEDELAI 1	-30.625	9.016	.002
		PRED + KEDELAI 3	-38.125	9.016	.000
	PRED + KEDELAI 0.5	PRED + KEDELAI 1	-4.375	9.016	.630
		PRED + KEDELAI 3	-11.875	9.016	.195
	PRED + KEDELAI 1	PRED + KEDELAI 3	-7.500	9.016	.410
ALKALI FOSFATAS	KONTROL	KEDELAI	-7.625	10.988	.492
		PREDNISOLON	9.750	10.988	.380
		PRED + KEDELAI 0.5	3.250	10.988	.769
		PRED + KEDELAI 1	-14.750	10.988	.187
		PRED + KEDELAI 3	-17.375	10.988	.121
	KEDELAI	PREDNISOLON	17.375	10.988	.121
		PRED + KEDELAI 0.5	10.875	10.988	.328
		PRED + KEDELAI 1	-7.125	10.988	.520
		PRED + KEDELAI 3	-9.750	10.988	.380
	PREDNISOLON	PRED + KEDELAI 0.5	-6.500	10.988	.557
		PRED + KEDELAI 1	-24.500	10.988	.031
		PRED + KEDELAI 3	-27.125	10.988	.018
	PRED + KEDELAI 0.5	PRED + KEDELAI 1	-18.000	10.988	.109
		PRED + KEDELAI 3	-20.625	10.988	.067
	PRED + KEDELAI 1	PRED + KEDELAI 3	-2.625	10.988	.812

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments)

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
respons perubahan kepadatan	KEDELAI	PREDNISOLON	44.500	9.488	.000
		PRED + KEDELAI 0.9	18.250	9.488	.063
		PRED + KEDELAI 1.1	13.875	9.488	.153
		PRED + KEDELAI 3.6	6.375	9.488	.506
	PREDNISOLON	PRED + KEDELAI 0.9	-26.250	9.488	.009
		PRED + KEDELAI 1.1	-30.625	9.488	.003
		PRED + KEDELAI 3.6	-38.125	9.488	.000
	PRED + KEDELAI 0.9	PRED + KEDELAI 1.1	-4.375	9.488	.648
		PRED + KEDELAI 3.6	-11.875	9.488	.219
		PRED + KEDELAI 1.1	PRED + KEDELAI 3.6	-7.500	9.488
respons perubahan alkali	KEDELAI	PREDNISOLON	17.375	11.973	.156
		PRED + KEDELAI 0.9	10.875	11.973	.370
		PRED + KEDELAI 1.1	-7.125	11.973	.556
		PRED + KEDELAI 3.6	-9.750	11.973	.421
	PREDNISOLON	PRED + KEDELAI 0.9	-6.500	11.973	.591
		PRED + KEDELAI 1.1	-24.500	11.973	.048
		PRED + KEDELAI 3.6	-27.125	11.973	.030
	PRED + KEDELAI 0.9	PRED + KEDELAI 1.1	-18.000	11.973	.142
		PRED + KEDELAI 3.6	-20.625	11.973	.094
		PRED + KEDELAI 1.1	PRED + KEDELAI 3.6	-2.625	11.973

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments)

Lampiran 17

Hasil perhitungan Uji Korelasi Regresi Linier

Correlations

Correlations

		KEDELAI PRED	KEPADATAN	ALKALI FOSFATASE
KEDELAI PRED	Pearson Correlation	1.000	.258	.265
	Sig. (2-tailed)		.223	.211
	N	24	24	24
KEPADATAN	Pearson Correlation	.258	1.000	.228
	Sig. (2-tailed)	.223		.119
	N	24	48	48
ALKALI FOSFATASE	Pearson Correlation	.265	.228	1.000
	Sig. (2-tailed)	.211	.119	
	N	24	48	48

Curve Fit

Dependent variable.. PADAT

Method.. LINEAR

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R .25843
 R Square .06679
 Adjusted R Square .02437
 Standard Error 19.13011

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	576.1905	576.19048
Residuals	22	8051.1429	365.96104

F = 1.57446 Signif F = .2227

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
PREDKED	4.365079	3.478777	.258431	1.255	.2227
(Constant)	1636.500000	8.283580		197.560	.0000

Dependent variable.. ALK

Method.. LINEAR

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R .26501
 R Square .07023
 Adjusted R Square .02797
 Standard Error 28.81939

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	1380.241	1380.2411
Residuals	22	18272.259	830.5572

F = 1.66183 Signif F = .2107

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
PREDKED	6.755952	5.240755	.265014	1.289	.2107
(Constant)	97.562500	12.479162		7.818	.0000