

**EFEK PEMBERIAN TEPUNG TULANG IKAN TUNA  
MADIDIHANG (*Thunnus albacares*) PADA TIKUS  
PUTIH (*Rattus norvegicus*) MODEL OVARIEKTOMI  
BERDASARKAN HISTOPATOLOGIS  
TULANG *FEMUR* DAN  
EKSPRESI TNF- $\alpha$**

**SKRIPSI**

Oleh

**FAIZAL AGUNG PRATOMO**

**0911310011**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN  
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
2013**

**EFEK PEMBERIAN TEPUNG TULANG IKAN TUNA  
MADIDIHANG (*Thunnus albacares*) PADA TIKUS  
PUTIH (*Rattus norvegicus*) MODEL OVARIEKTOMI  
BERDASARKAN HISTOPATOLOGIS  
TULANG *FEMUR* DAN  
EKSPRESI TNF- $\alpha$**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

oleh :

**FAIZAL AGUNG PRATOMO**

**0911310011**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN  
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
2013**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**EFEK PEMBERIAN TEPUNG TULANG IKAN TUNA MADIDIHANG**

**(*Thunnus albacares*) PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)**

**MODEL OVARIKTOMI BERDASARKAN HISTOPATOLOGIS**

**TULANG FEMUR DAN EKSPRESI TNF- $\alpha$**

oleh :

**FAIZAL AGUNG PRATOMO**

**0911310011**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 17 September 2013  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

**Pembimbing I**

**Pembimbing II**

**drh. Masdiana C. Padaga, M.App.Sc**  
NIP. 19560210 198403 2 001

**Dr. Drs. Agung Pramana W. M., MS.**  
NIP. 19650616 199111 1 001

Mengetahui,

Ketua Program Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan  
Program Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh., MS**  
NIP. 19480615 197702 2 001

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 1898802 2 001



**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Faizal Agung Pratomo

NIM : 0911310011

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Efek Pemberian Tepung Tulang Ikan Tuna Madidihang (*Thunnus albacares*) Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Ovariektomi Berdasarkan Histopatologis Tulang Femur dan Ekspresi TNF- $\alpha$

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 19 September 2013  
Yang Menyatakan,

**Faizal Agung Pratomo**  
NIM. 0911310011

**EFEK PEMBERIAN TEPUNG TULANG IKAN TUNA MADIDIHANG  
(*Thunnus albacares*) PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL  
OVARIEKTOMI BERDASARKAN HISTOPATOLOGIS  
TULANG FEMUR DAN EKSPRESI TNF- $\alpha$**

**ABSTRAK**

Osteoporosis adalah kondisi terjadinya penurunan kepadatan tulang karena remodeling tulang yang tidak seimbang dan ini terjadi pada kondisi menopause. Metode penyembuhan untuk osteoporosis hingga saat ini hanya dengan terapi pemberian kalsium. Salah satu cara untuk menambah konsentrasi kalsium dapat dikompensasi dari kalsium yang berasal dari tepung tulang ikan tuna madidihang yang memiliki kandungan kalsium sampai 13,19%. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian tepung tulang ikan tuna madidihang berdasarkan kepadatan tulang femur dan ekspresi TNF- $\alpha$ . Penelitian ini menggunakan 16 tikus betina dengan dosis 400 mg/kg BB, 800 mg/kg BB dan 1600 mg/kg BB. Pemberian tepung tulang pada tikus model ovariektomi dilakukan selama 30 hari melalui sonde. Analisa kepadatan tulang menggunakan metode pewarnaan HE dan analisa ekspresi TNF- $\alpha$  menggunakan metode imunohistokimia. Penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian tepung tulang ikan tuna madidihang berpengaruh nyata pada hewan model ovariektomi. Kesimpulan dari penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian tepung tulang dengan dosis 1600 mg/kg BB menunjukkan penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  dan kepadatan tulang meningkat pada dosis 800 mg/kg BB.

**Kata Kunci :** Osteoporosis, Tepung tulang ikan tuna madidihang, Tulang Femur, TNF- $\alpha$ .

**The Effect of Yellow Fin Tuna (*Thunnus albacares*) Bone Meal In Ovariectomy Rats (*Rattus norvegicus*) Model Based On Femur Bone Histopathologic And TNF- $\alpha$  Expression**

**ABSTRACT**

Osteoporosis is a condition of decreased bone density because bone remodeling are not balanced and this occurred in the conditions of menopause. Today, healing methods for osteoporosis by giving calcium therapy. One way to increase the calcium concentration can be compensated from calcium derived from yellowfin tuna bone meal that contains calcium up to 13,19%. This study aimed to determine the effect of yellowfin tuna bone meal based femur bone density and expression of TNF- $\alpha$ . This study uses 16 female rats at a dose of 400 mg/kg BW, 800 mg/kg BW and 1600 mg/kg BW. Giving bone meal in rats models of ovariectomy carried out for 30 days through sonde. Analysis of bone density using HE (Hematoxylen Eosin) staining and analysis of TNF- $\alpha$  expression using immunohistochemistry methods. This study showed that effect yellowfin tuna bone meal in ovariectomy animal models significantly. The conclusion of this study showed that administration of bone meal at a dose of 1600 mg/kg BW showed reduced expression of TNF- $\alpha$  and increased bone density at the dose of 800 mg/kg BW.

**Keywords:** Osteoporosis, yellowfin tuna Bone Meal, Femur Bone, TNF- $\alpha$ .



## KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Wr. Wb.

Alhamdulillah, segala puji bagi Allah SWT. yang senantiasa memberikan nikmat dan rahmat-Nya yang luar biasa bagi penulis untuk bisa menyelesaikan penelitian dan skripsi yang berjudul Efek Pemberian Tepung Tulang Ikan Tuna Madidihang (*Thunnus albacares*) pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Ovariektomi Berdasarkan Histopatologis Tulang Femur dan Ekspresi TNF- $\alpha$ . Tidak lupa penulis ucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES dan drh. Handayu Untari yang sudah memberikan fasilitas dan kesempatan bagi penulis untuk bisa ambil bagian dalam penelitian dan menjadikannya skripsi sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan. Terima kasih teramat besar kepada orang tua dan keluarga yang sudah memberi kesempatan bagi penulis untuk bisa menjalani studi di program studi Kedokteran Hewan hingga saat ini.

Tidak lupa penulis ucapkan terima kasih kepada pihak – pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini :

1. drh. Masdiana C. Padaga, M.App.Sc., selaku Dosen Pembimbing 1 atas bimbingan, motivasi, kesabaran, fasilitas dan waktu.
2. Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, MS, selaku Dosen Pembimbing II yang telah membimbing dengan kesabaran, ketelitian, motivasi dan waktu dalam berdiskusi demi penyelesaian tugas akhir ini.
3. drh. Analis Wisnu Wardhana, M.Biomed selaku Dosen Penguji I atas koreksi, kritik, saran, kesabaran dan waktu.
4. Dyah Kinasih Wuragil S.Si., MP., MS, selaku Dosen Penguji II atas ketelitian, koreksi, kesabaran dan waktu serta semua bantuan atas kesempatan dalam penelitian dan dalam penyelesaian tugas akhir ini.
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES, dan jajaran tim di akademik PKH UB yang sudah memotivasi penulis dalam penyelesaian tugas akhir ini.
6. Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh., MS selaku Ketua Program Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan demi kemajuan PKH UB.

7. Analis dan Staf Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Laboratorium Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Malang Universitas Brawijaya, yang telah membantu penulis dalam penelitian.
8. Bapak Ahmad Thalib, selaku mahasiswa S-3 Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya yang sudah berkenan memberi kesempatan penulis ikut berperan aktif dalam penelitian ini.
9. Rekan-rekan yang juga sahabat dan saudara seperjuangan di tim "OSTEOPOROSIS" Yulinar, Rendy, Paura dan Galuh yang saling bahu membahu dan bekerja keras dalam proses penelitian.
10. Teman-teman KELUARGA BESAR ANGKATAN 2009 PKH UB dan keluarga kecilku di angkatan (Bundo dan duo mbakyu) yang selalu memberikan dorongan, semangat, inspirasi dan keceriaan.
11. Bapak dan Ibu yang tiada henti berdo'a untuk kesuksesan dan kelancaran urusan anak-anaknya. Adikku, yang memberikan dorongan dan motivasi.
12. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu per satu.

Pada akhirnya, penulis hanya bisa mengucapkan syukur alhamdulillah kepada Allah SWT dan berharap kebaikan-kebaikan yang sudah penulis terima bisa dibalas oleh-Nya. Semoga tulisan ini bisa bermanfaat bagi pembaca maupun masyarakat dan penulis berharap adanya kritik dan saran yang membangun. Mohon maaf jika ada kesalahan yang disengaja maupun tidak disengaja dalam proses penulisan ini.

Wassalamualaikum Wr. Wb.

Malang, 19 September 2013

Penulis

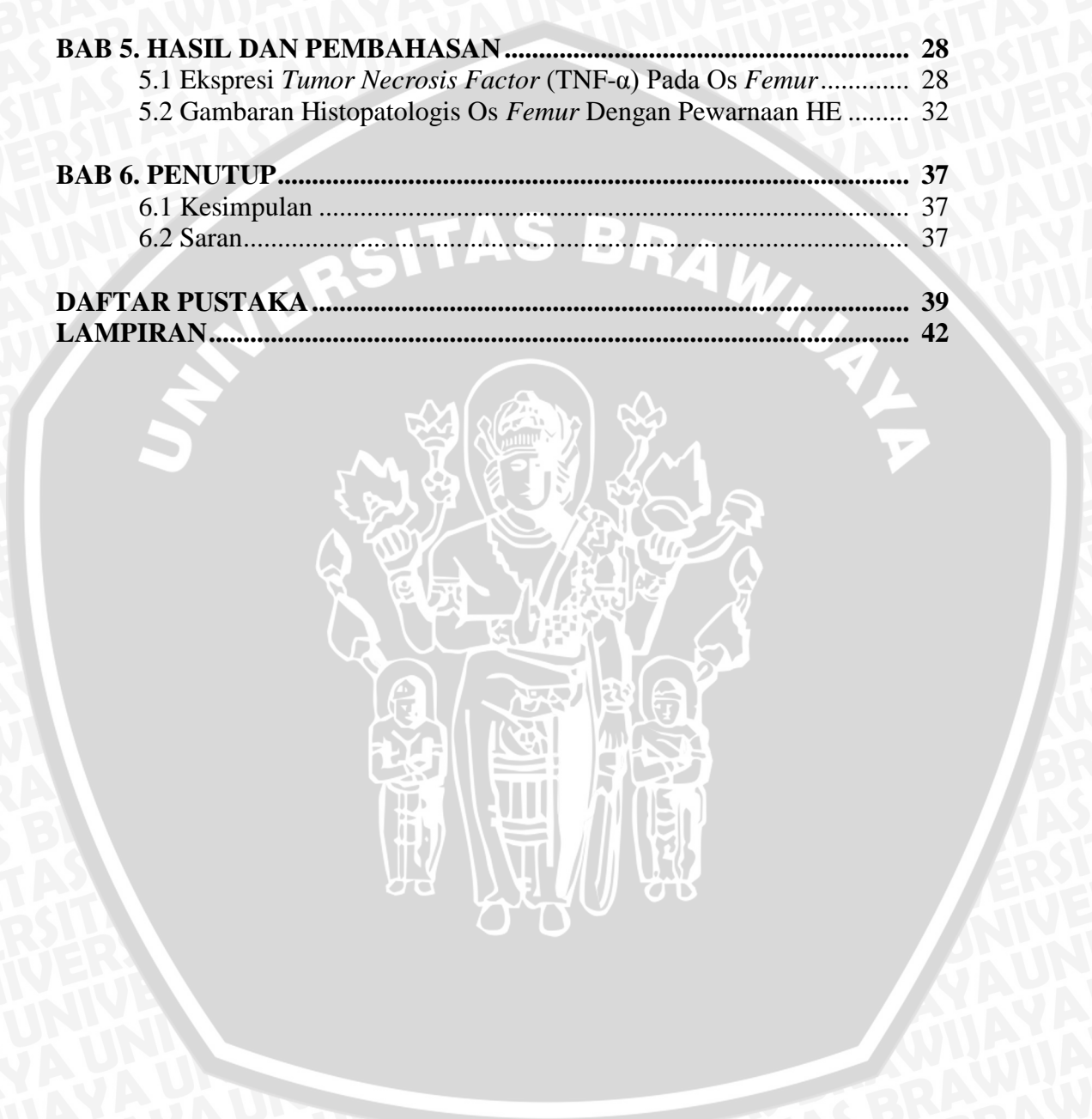


DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG .....</b>	<b>xiv</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian .....	4
1.5 Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>6</b>
2.1 Tepung Tulang Ikan Tuna Madidihang.....	6
2.2 Tulang Femur .....	7
2.2.1 Struktur Tulang Femur .....	7
2.2.1 Proses Remodelling Tulang .....	9
2.3 Tindakan Ovariektomi Pada Hewan Coba .....	11
2.3.1 Ovariektomi Pada Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	11
2.3.2 Patomekanisme Osteoporosis.....	14
<b>BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA PENELITIAN .</b>	<b>17</b>
3.1 Kerangka Konsep Penelitian .....	17
3.2 Hipotesis Penelitian.....	19
<b>BAB 4. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>20</b>
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	20
4.2 Alat dan Bahan .....	20
4.2.1 Alat.....	20
4.2.2 Bahan.....	20
4.3 Tahapan Penelitian .....	22
4.3.1 Rancangan penelitian dan Persiapan Hewan Coba .....	22
4.3.2 Pembuatan Tepung Tulang Ikan Tuna Madidihang.....	24
4.3.3 Ovariektomi Pada Hewan Coba .....	25

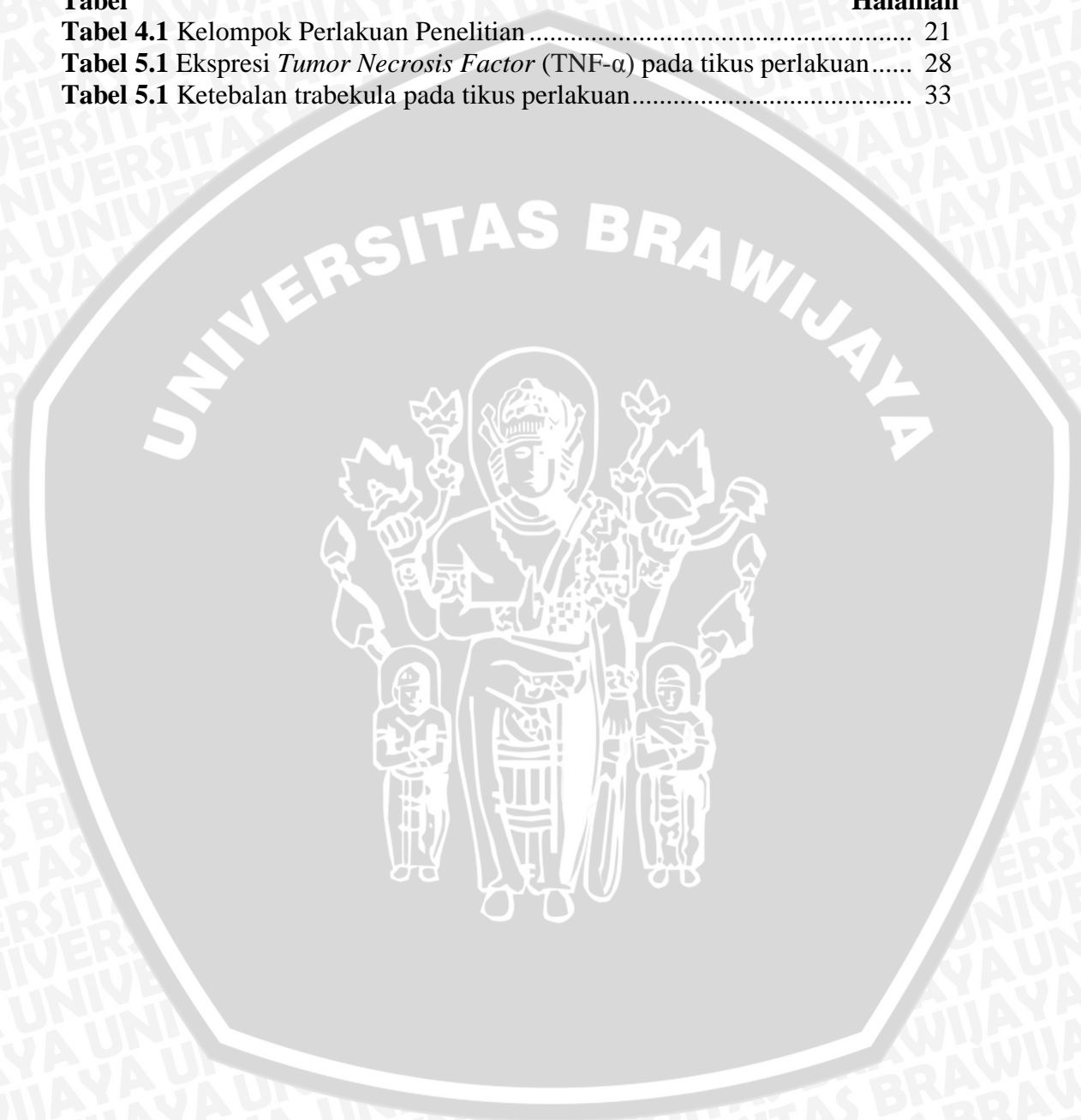


4.3.4 Pemberian Terapi Terhadap Hewan Coba .....	26
4.3.5 Pembuatan Preparat Histopatologis Os Femur .....	26
4.3.6 Pewarnaan Imunohistokimia.....	27
4.3.7 Analisa Data.....	28
<b>BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>28</b>
5.1 Ekspresi <i>Tumor Necrosis Factor</i> (TNF- $\alpha$ ) Pada Os Femur.....	28
5.2 Gambaran Histopatologis Os Femur Dengan Pewarnaan HE .....	32
<b>BAB 6. PENUTUP.....</b>	<b>37</b>
6.1 Kesimpulan .....	37
6.2 Saran.....	37
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>39</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>42</b>



## DAFTAR TABEL

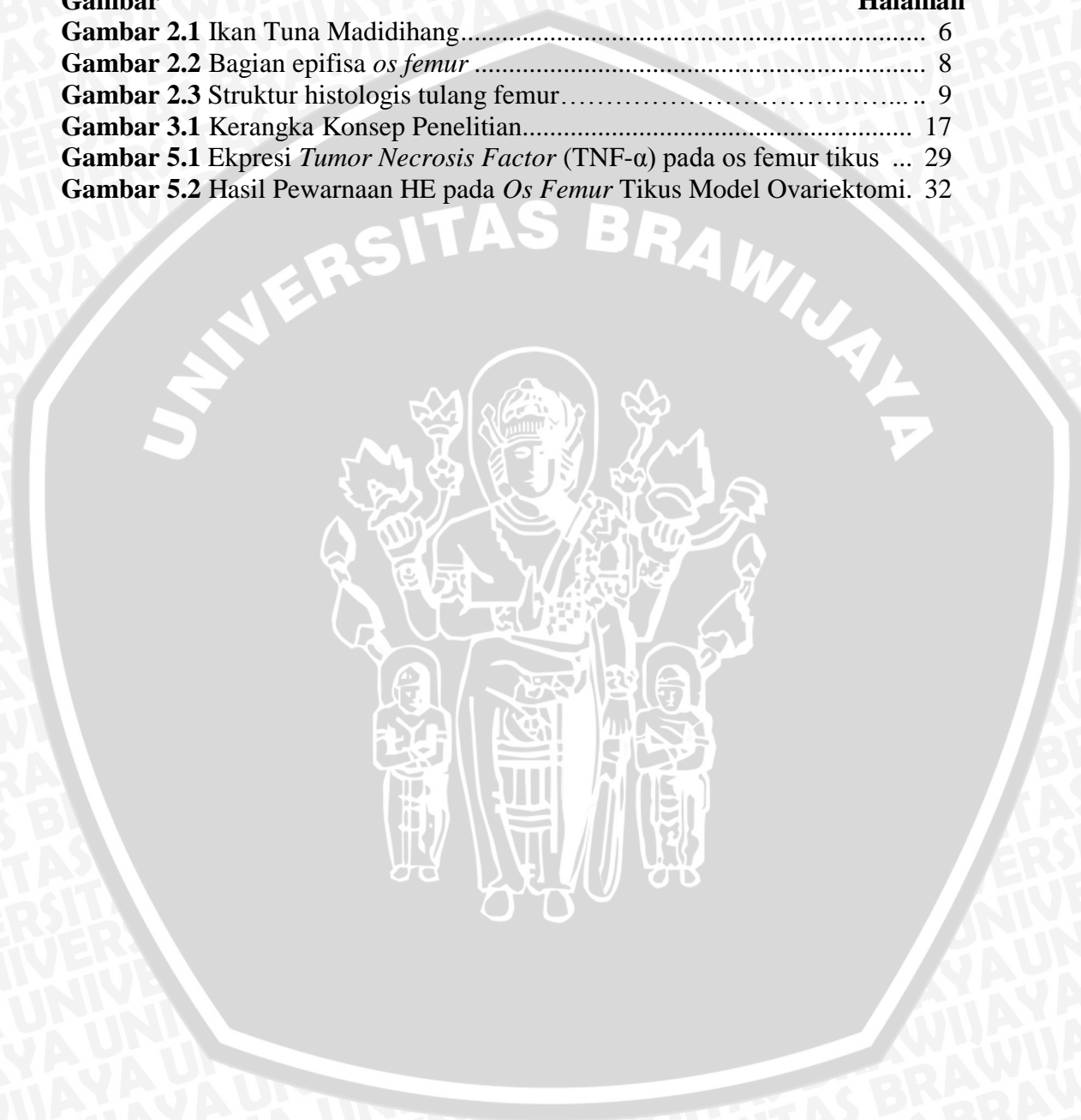
<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
<b>Tabel 4.1</b> Kelompok Perlakuan Penelitian .....	21
<b>Tabel 5.1</b> Ekspresi <i>Tumor Necrosis Factor</i> (TNF- $\alpha$ ) pada tikus perlakuan.....	28
<b>Tabel 5.1</b> Ketebalan trabekula pada tikus perlakuan.....	33





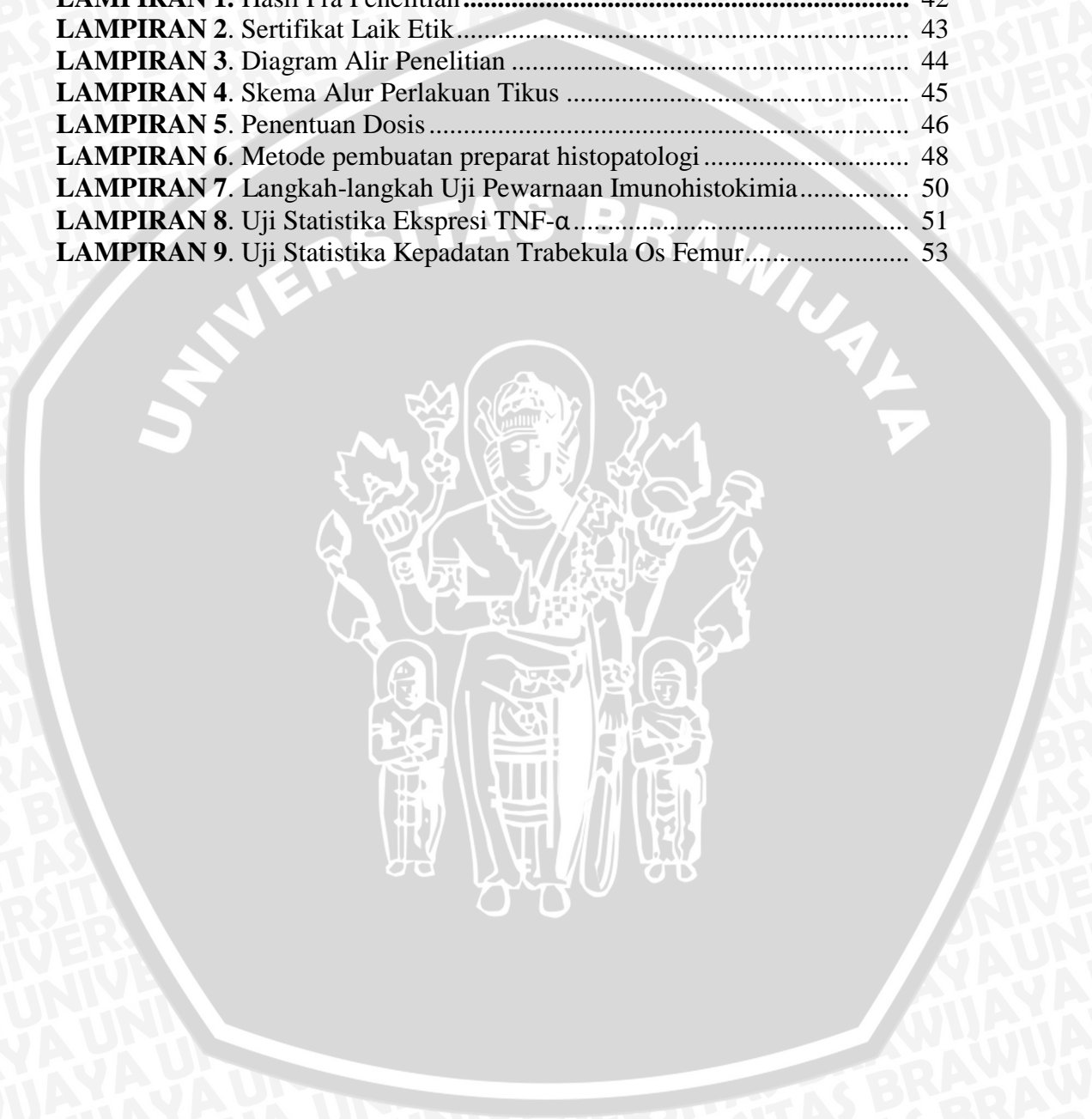
## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
<b>Gambar 2.1</b> Ikan Tuna Madidihang.....	6
<b>Gambar 2.2</b> Bagian epifisa <i>os femur</i> .....	8
<b>Gambar 2.3</b> Struktur histologis tulang femur.....	9
<b>Gambar 3.1</b> Kerangka Konsep Penelitian.....	17
<b>Gambar 5.1</b> Ekpresi <i>Tumor Necrosis Factor</i> (TNF- $\alpha$ ) pada os femur tikus ...	29
<b>Gambar 5.2</b> Hasil Pewarnaan HE pada <i>Os Femur</i> Tikus Model Ovariektomi.	32



DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
LAMPIRAN 1. Hasil Pra Penelitian.....	42
LAMPIRAN 2. Sertifikat Laik Etik.....	43
LAMPIRAN 3. Diagram Alir Penelitian.....	44
LAMPIRAN 4. Skema Alur Perlakuan Tikus.....	45
LAMPIRAN 5. Penentuan Dosis.....	46
LAMPIRAN 6. Metode pembuatan preparat histopatologi.....	48
LAMPIRAN 7. Langkah-langkah Uji Pewarnaan Imunohistokimia.....	50
LAMPIRAN 8. Uji Statistika Ekspresi TNF- $\alpha$ .....	51
LAMPIRAN 9. Uji Statistika Kepadatan Trabekula Os Femur.....	53



## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

### Simbol / Singkatan

Ca

P

IL-1

IL-6

PTH

TNF $\alpha$

OPG

TGF- $\beta$

PFA

FBS

DAB

BB

FGF

M-CSF

RANK-L

PGE

### Keterangan

*Calcium*

*Phospor*

*Interleukin – 1*

*Interleukin – 6*

*Paratyroid hormon*

*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*

*osteoprotegerin*

*transforming growth factor-  $\beta$*

*paraformaldehid*

*Fetal Bovine Serum*

*Diamino benzidine*

*Berat Badan*

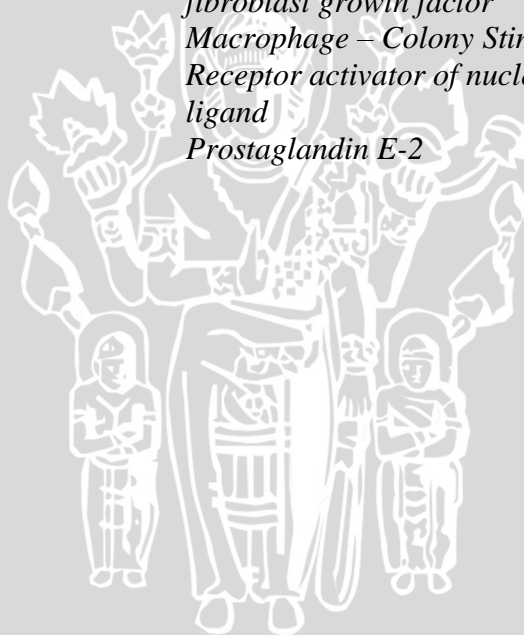
*fibroblast growth factor*

*Macrophage – Colony Stimulating Factor*

*Receptor activator of nuclear factor kappa B*

*ligand*

*Prostaglandin E-2*





## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tulang kerangka secara garis besar dapat diklasifikasikan menjadi ossa longa (tulang panjang), ossa plana (tulang pipih), ossa brevia (tulang pendek) dan ossa irregularia (tulang tidak beraturan). Salah satu tulang yang sering terkena osteoporosis adalah tulang panjang pada bagian tulang femur. Tulang femur merupakan tulang panjang yang memiliki proporsi substansia kompakta dan spongiosa masing-masing sekitar 80% dan 20% (Goldberg, 2004). Bagian korpus sebagian besar terdiri atas bagian tulang kompakta yang mengelilingi sumsum tulang dan pada kedua ujungnya (metafisis) mengandung bagian spongiosa. Tulang trabekular terdiri dari spikula tipis tulang yang meluas dari korteks menuju ruang medula. Jaring-jaring spikula tulang terlihat sebagai garis yang muncul pada beberapa daerah yang terdapat osteoblas dan osteoklas serta sel-sel yang terlibat pada *remodeling* tulang. *Remodeling* adalah proses yang berlangsung terus-menerus secara aktif dengan membangun dan memperbaiki pembentukan tulang yang dilakukan oleh osteoklas untuk resorpsi tulang dan osteoblas untuk formasi tulang. Ketidakseimbangan *remodeling* menyebabkan kehilangan tulang yang muncul sebagai osteoporosis (Smith, 1993). Proses osteoporosis terjadi karena berkurangnya kadar estrogen pasca *menopause* pada wanita. Penurunan estrogen mengakibatkan penurunan absorpsi Ca usus dan peningkatan ekskresi Ca melalui ginjal, meningkatkan resorpsi Ca tulang dan hilangnya massa tulang individu pascamenopause, sehingga efek utamanya menurunnya kalsium dalam darah.

Estrogen mempengaruhi kehilangan massa tulang baik secara langsung dengan mengikat reseptor pada tulang dan secara tidak langsung dengan memengaruhi hormon pengatur kalsium (PTH dan Vitamin D) dan sitokin interleukin (IL-1, IL-6 dan TNF- $\alpha$ ) (Potu *et al.*, 2009). TNF- $\alpha$  dan IL-1 keduanya diketahui beraksi pada sel-sel endotel untuk meningkatkan perlekatan polimorfonuklear neutrofil dan monosit, sehingga membantu untuk mengumpulkan sel-sel tersebut masuk ke dalam lokasi inflamasi (Triskayani, 2010). *Tumor necrosis factor* (TNF) merupakan sitokin yang mempunyai berbagai efek biologik. Molekul-molekul TNF- $\alpha$  menstimulasi resorpsi tulang dengan menginduksi proliferasi dan diferensiasi progenitor-progenitor osteoklas dan mengaktifkan formasi osteoklas secara tidak langsung. Resorpsi tulang oleh osteoklas, pada kondisi osteoporosis, terjadi peningkatan dan menyebabkan pengeroposan tulang, yang merupakan tanda osteoporosis.

Pengobatan untuk osteoporosis sampai saat ini hanya menggunakan pemberian kalsium digunakan sebagai terapi bagi penderita osteoporosis. Kalsium dibutuhkan untuk pertumbuhan normal dan perkembangan kerangka tubuh (Ott, 2002). Salah satu alternatif yaitu dengan cara pemberian tepung tulang ikan madidihang (*Thunnus albacares*). Tepung tulang ikan ini mempunyai kandungan mineral Ca dan P yang cukup tinggi (Thalib, 2009). Pemberian tepung tulang ikan diharapkan dapat menambah konsentrasi Ca dalam tubuh sehingga penurunan penyerapan Ca dari usus akibat turunnya kadar estrogen dalam tubuh dapat dikompensasi dengan Ca yang berasal dari tepung tulang ikan. Peningkatan kadar Ca dalam tubuh diharapkan akan mengurangi absorpsi Ca dari tulang berkurang



sehingga tulang tidak mengalami keropos. Pengeroposan tulang dapat diamati dari kepadatan tulang yang dapat diperiksa di hampir semua tulang, seperti di tulang panjang (*collum femuris*) dan tulang vertebrae (lumbalis) (Hartiningsih, 2012).

Berdasarkan hal tersebut, diperlukan adanya penelitian mengenai efek tepung tulang ikan pada tubuh individu yang menderita osteoporosis. Tikus putih yang diovariectomi merupakan hewan coba yang dapat digunakan sebagai model untuk menunjukkan kondisi menopause alamiah (Suhargo, 2008), yang menyebabkan kondisi osteoporosis. Dengan demikian, efek pemberian tulang ikan pada hewan coba bisa dilihat berdasarkan kepadatan tulangnya, yaitu melalui gambaran histopatologi dan dengan mengamati ekspresi TNF- $\alpha$  tulang femur.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan berikut:

1. Bagaimana gambaran histopatologis tulang femur hewan model ovariektomi setelah mendapat terapi tepung tulang ikan madidihang?.
2. Bagaimana ekspresi TNF-a hewan model ovariektomi setelah mendapat terapi tepung tulang ikan madidihang?

## 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka penelitian yang dilakukan dibatasi pada:



- 1) Hewan coba yang digunakan adalah tikus betina galur *Wistar (Rattus norvegicus)* dewasa berusia 8-12 minggu dengan berat badan 180-200 gram yang telah mendapatkan persetujuan laik etik dengan nomor 142-KEP-UB.
- 2) Hewan model osteoporosis dilakukan dengan melakukan tindakan ovariectomi pada hewan coba.
- 3) Variabel tergantung yang diamati adalah gambaran histopatologis tulang femur dan ekspresi TNF- $\alpha$ .

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui gambaran histopatologis tulang femur hewan model ovariectomi setelah mendapat terapi tepung tulang ikan madidihang.
2. Untuk mengetahui ekspresi TNF- $\alpha$  hewan model ovariectomi setelah mendapat terapi tepung tulang ikan madidihang.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi tentang efek pemberian tepung tulang ikan tuna madidihang pada terapi hewan coba model ovariectomi yang dilihat dari gambaran histologis tulang femur dan ekspresi TNF- $\alpha$

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tepung Tulang Ikan Tuna Madidihang

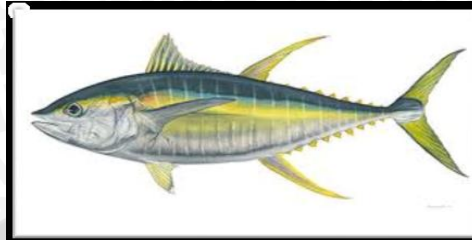
Tulang ikan merupakan salah satu limbah hasil pengolahan perikanan yang dapat dimanfaatkan sebagai tepung untuk bahan pangan. Tulang ikan banyak mengandung kalsium dalam bentuk kalsium fosfat sebanyak 14 % dari total susunan tulang. Bentuk kompleks kalsium fosfat ini terdapat pada tulang dan dapat diserap oleh tubuh dengan baik sekitar 60-70 % (Subangsihe, 1996).

Unsur utama yang menyusun tulang ikan adalah kalsium, fosfat dan karbonat, sedangkan yang terdapat dalam jumlah kecil yaitu magnesium, sodium, stronsium, sitrat, fluorida, hidroksida dan sulfat (Lovell, 1989). Kandungan mineral pada ikan bergantung pada spesies, jenis kelamin, siklus biologis, dan bagian tubuh ikan yang dianalisis. Kandungan mineral juga tergantung pada faktor ekologis seperti musim, tempat pengembangan, jumlah nutrisi yang tersedia, suhu dan salinitas air (Martinez *et al.*, 1998).

Menurut Ditjen (1990) ikan tuna sirip kuning atau madidihang dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Pisces
Ordo	: Percomorphi
Famili	: Scombridae
Genus	: <i>Thunnus</i>

Spesies : *Thunnus albacares*



**Gambar 2.1** Ikan tuna madidihiang (*Thunnus albacares*)

Ikan tuna sirip kuning atau madidihiang (*Thunnus albacares*) merupakan ikan pengembara samudera, mengarungi samudera dengan bergerombol. Madidihiang merupakan perenang cepat karena bentuk tubuhnya yang dinamis. Ikan tuna memiliki kecepatan renang mencapai 50 km/jam. Kemampuan renang ikan ini merupakan salah satu faktor yang menyebabkan penyebarannya dapat meliputi skala ruang (wilayah geografis) yang cukup luas, termasuk di antaranya beberapa spesies yang dapat menyebar dan bermigrasi lintas samudera (Diniah *et al.*, 2001).

Tepung tulang ikan tuna merupakan sumber kalsium dan fosfor yang baik, yang dapat diperoleh dengan berbagai cara sebagai berikut (Anggorodi, 1985) :

1. Pengukusan. Tulang dikukus kemudian dikeringkan dan digiling untuk menghasilkan tepung tulang.
2. Pemasakan dengan uap di bawah tekanan. Tulang dimasak dengan tekanan kemudian diarangkan dalam bejana tertutup sehingga didapat tulang dalam bentuk lunak dan dapat digiling menjadi tepung.



### 3. Abu tulang yang diperoleh dari pembakaran tulang.

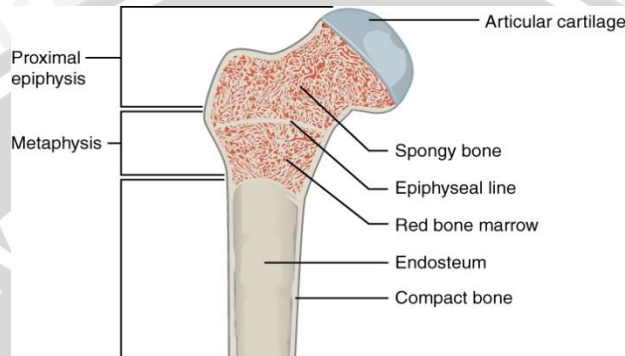
Tepung tulang ikan merupakan produk pengolahan dari limbah tulang ikan, yang diproses dengan melakukan perebusan, pencucian, pemanasan dengan autoklaf dan pengeringan, sehingga dihasilkan tepung tulang ikan yang berwarna kecoklatan dan berbau seperti ikan kering (Thalib, 2009). Tepung tulang ikan tuna madidihang memiliki kandungan air 2,98 %, abu 56,65 %, lemak 6,36 %, protein 20,98 %, kalsium 238,61 mg/g berat kering, fosfor 152,25 mg/g berat kering (Thalib, 2009).

## 2.2 Tulang Femur

### 2.2.1 Struktur Tulang Femur

Berdasarkan konfigurasinya, tulang dibagi ke dalam dua tipe yaitu spongiosa (trabekular) dan tipe kompakta (kortikal) (Samuelson, 2007). Tulang kompak (kortikal) menempati 80% dari keseluruhan massa tulang dan merupakan lapisan terluar (korteks) tulang. Tulang kompakta terdiri atas jaringan kolagen dan hidroksiapatit yang membentuk 3 lapisan, yaitu lapisan periosteum, intrakompakta, dan endosteum (Rachman, 1999). Periosteum adalah selubung fibrosa yang membungkus tulang, kecuali pada permukaan sendi (Leeson *et al.*, 1996). Sel tulang kortikal terdiri dari jaringan padat yang sebagian besar tersusun dari mineral tulang dan elemen matriks ekstraseluler, terpisahkan oleh penetrasi pembuluh darah dan sekumpulan osteosit yang ada di dalam tulang. Osteosit ini saling berhubungan satu sama lain dengan osteoblas pada permukaan tulang yang disebut kanalikuli dimana terjadi proses penyebaran osteosit seluler.

Hubungan ini memungkinkan perpindahan  $\text{Ca}^{2+}$  dari dalam tulang ke permukaan. Kepadatan tulang kortikal menghasilkan suatu kekuatan terhadap beban yang berat yang mengenai tulang-tulang panjang (Baron & Emile, 2003).

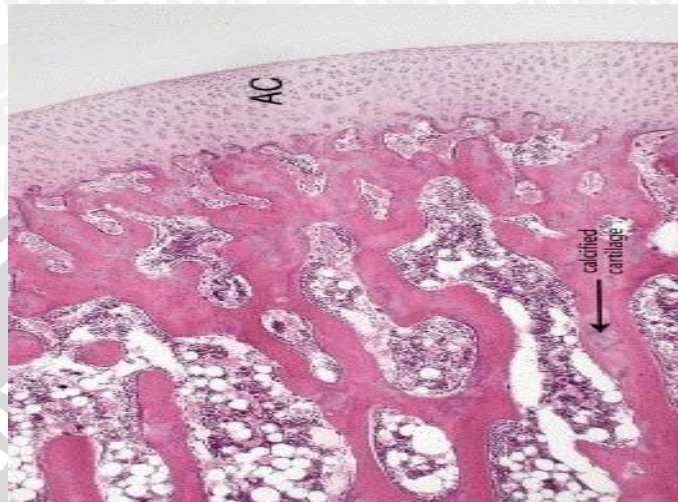


**Gambar 2.2** Bagian epifisa *os femur*

Tulang trabekular memiliki berat 20% dari keseluruhan massa tulang. Terdiri dari spikula tipis tulang yang meluas dari korteks menuju ruang medula. Menurut Kalfas (2001), *cancellous bone (trabecular bone)* terletak di antara permukaan bagian dalam tulang kompak. *Cancellous bone* berisi elemen hematopoietik dan *bony trabeculae*. *Bony trabeculae* (trabekula tulang) merupakan spikula tulang yang saling berhubungan membentuk jaring-jaring yang saling berhubungan (Dorland, 2002). Jaring-jaring yang saling berhubungan tersebut terisi oleh sum sum tulang. Trabekula terutama terdapat pada bagian ujung tulang panjang. Trabekula secara berkelanjutan akan mengalami *remodeling* pada permukaan internal lapisan endosteum tulang. Bagian trabekula mengandung lempeng-lempeng yang saling berhubungan dengan pola tertentu yang membentuk garis trayektori spesifik menurut fungsi mekanis tulang tersebut. Tulang trabekula terdiri atas lamel lamel, di dalamnya terdapat lakuna yang



mengandung osteosit dan sistem kanalikuli yang saling berhubungan (Leeson *et al.*, 1996)



Gambar 2.3 Struktur histologis tulang femur

### 2.2.2 Proses *Remodeling* Tulang

Tulang memiliki fungsi penting bagi tubuh yaitu melindungi dan menyokong organ-organ internal dan sebagai tempat melekatnya otot dan tendon. Tulang juga berperan dalam fungsi metabolik dengan menyediakan sumber kalsium untuk memelihara keseimbangan kadar kalsium dalam darah serta menyediakan beberapa faktor pertumbuhan (*growth factor*) seperti *transforming growth factor* (TGF- $\beta$ ) yang berperan dalam *remodeling* (Dellmann dan Eurell, 1998).

Pada tulang dapat dibedakan tiga jenis sel tulang, yaitu osteoblas, osteosit, dan osteoklas (Rachman, 1999). Osteoblas merupakan sel berinti tunggal yang terdapat di permukaan luar (periosteum) dan di dalam tulang (endosteum). Sitoplasmanya bersifat basofil karena mengandung nukleoprotein. Apabila sel ini berada dalam keadaan aktif berbentuk kuboid, sedangkan dalam keadaan tidak



aktif, osteoblas berbentuk pipih (Einhorn, 1996). Dalam proses perbaikan kondisi tulang setelah adanya perombakan tulang oleh osteoklas, ditemukan adanya osteoblas untuk mensintesis matriks tulang baru yang diawali dengan proses mineralisasi dan kolagenasi matriks tulang (Price, 1995; Lian dan Stein, 1996). Osteoblas berfungsi menghasilkan kolagen, proteoglikan, dan glikoprotein untuk pembuatan dan pertumbuhan tulang baru pada daerah permukaan tulang dan juga untuk pembentukan tulang pada kartilago (Telford dan Bridgman, 1995).

Proses perkembangan dan pembentukan tulang oleh osteoblas dipengaruhi oleh faktor yang bersifat lokal maupun sistemik. Faktor lokal yang berpengaruh dalam meningkatkan pembentukan tulang adalah BMP (*bone morphogenic protein*), TGF- $\beta$ , IGF (*insulin-like growth factor-1*), estrogen, triiodotironin ( $T_3$ ), tetraiodotironin ( $T_4$ ), kalsitriol [ $1,25-(OH)_2D_3$ ], dan prostaglandin E2 (PGE2). Faktor sistemik yang meningkatkan pembentukan tulang adalah fluorida, PTH (hormon paratiroid), nutrisi, vitamin D, sitokin, kortisol, dan aktivitas individu. Faktor sistemik lainnya yang bekerja dengan menghambat formasi tulang adalah hormon kortikosteroid yang dihasilkan oleh korteks adrenal (Ott, 2002).

Tipe sel tulang yang kedua adalah osteosit, yaitu osteoblas yang sudah menetap dalam lakuna pada saat pembentukan lapisan permukaan tulang berlangsung (Puzas, 1993).

Sel ketiga pada tulang adalah osteoklas yang bertanggung jawab terhadap resorpsi kalsium tulang dan kartilago (Ott, 2002). Osteoklas memiliki progenitor yang berbeda dari sel tulang lainnya karena tidak berasal dari sel mesenkim, melainkan dari jaringan mieloid, yaitu monosit atau makrofag pada sumsum

tulang (Ott, 2002). Osteoklas ini bersifat mirip dengan sel fagositik lainnya dan berperan aktif dalam proses resorpsi tulang. Osteoklas merupakan sel fusi dari beberapa monosit sehingga bersifat multinukleus (10-20 nuklei) dengan ukuran besar dan berada di tulang kortikal atau tulang trabekular (Marcus *et al.*, 1996).

*Remodeling* adalah proses yang berlangsung terus-menerus secara aktif dengan membangun dan memperbaiki pembentukan tulang yang dilakukan oleh osteoklas dan osteoblas. Proses *remodeling* pada kondisi normal adalah massa tulang yang diresorpsi seimbang oleh osteoklas dengan jumlah massa tulang yang diformasi oleh osteoblas, terutama pada individu berusia sekitar 30- 40 tahun (Goldberg, 2004). *Remodeling* juga berfungsi untuk mempertahankan keseimbangan biokimia tulang, memelihara dan memperbaiki kerusakan tulang (Rachman, 1999). *Remodeling* tulang dipengaruhi oleh beberapa hormon seperti hormon paratiroid (PTH), kalsitonin, sitokin, kalsitriol dan faktor-faktor lokal nutrisi, faktor pertumbuhan, TGF $\beta$ , *fibroblast growth factor* (FGF), IL, prostaglandin, dan aktivitas individu. Beberapa tahun setelah puncak massa tulang terjadi, proses *remodeling* tulang masih berjalan normal dengan jumlah massa tulang yang masih stabil. Memasuki usia 40 tahun atau tepatnya memasuki usia menopause, proses *remodeling* mulai berjalan tidak seimbang (Rachman, 1999).

## 2.3 Tindakan Ovariektomi Pada Hewan Coba

### 2.3.1 Ovariektomi Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Wistar* merupakan salah satu hewan percobaan yang biasa digunakan dalam berbagai penelitian. Hewan ini telah



banyak diketahui baik sifat, karakteristik, serta struktur anatominya dan zat gizi yang diperlukannya hampir sama dengan manusia (Smith, 1998). Klasifikasi tikus putih menurut Myres & Armitage (2004) adalah

Kingdom : Animalia  
Filum : Chordata  
Kelas : Mamalia  
Ordo : Rodentia  
Subordo : Sciurognathi  
Famili : Muridae  
Sub-Famili : Murinae  
Genus : *Rattus*  
Spesies : *Rattus norvegicus*

Tikus betina memasuki usia dewasa pada umur 40-60 hari, masa bunting selama 23 hari dan disapih pada umur 21 hari dengan berat badan rata-rata 190 gram (Sirois, 2005). Jadi, tikus ini dipergunakan sebagai hewan coba, karena memiliki usia dewasa yang cepat dan pemeliharaan yang mudah.

Ovariectomi adalah suatu tindakan pembedahan atau teknik laparatomi untuk pengambilan ovarium bilateral. Secara luas pada bidang biomedis, tikus ovariectomi merupakan model osteopenia dan dapat menjadi model wanita pascamenopause (Shirwaikar *et al.*, 2003; Devareddy *et al.*, 2008). Arjmandi *et al.* (1996) membuktikan bahwa ovariectomi kedua ovarium pada tikus percobaan akan menginduksi osteoporosis pada trabekula tulang rahang karena ovariectomi akan menstimulasi kerja osteoklas. Ovariectomi menyebabkan kehilangan massa



tulang di daerah trabekula tetapi tidak terjadi pada tulang kortikal. Selain itu, tindakan ovariectomi dapat segera menimbulkan gejala menopause tanpa menimbulkan gejala lain.

Ovariectomi menyebabkan peningkatan kadar kalsium darah, yang merupakan salah satu indikator terjadinya peningkatan proses resorpsi tulang (Nurdin, 2002). Hilangnya fungsi ovarium dalam memproduksi hormon seks steroid, seperti estradiol akan menimbulkan kondisi hipoestrogenis yang merupakan faktor utama kehilangan massa tulang. Histerektomi dengan ovariectomi bilateral banyak dihubungkan dengan tingginya risiko osteoporosis (Lee dan Kanis, 1994). Kalu *et al.* (1993) dan Dempster *et al.* (1995) menyatakan bahwa ovariectomi akan menyebabkan perubahan dan penurunan volume tulang, peningkatan jumlah osteoklas, serta peningkatan kadar enzim serum alkalin fosfatase.

### 2.3.2 Patomekanisme Osteoporosis

Osteoporosis berasal dari kata *osteo* dan *porous*, *osteo* artinya tulang, dan *porous* berarti berlubang-lubang atau keropos. Osteoporosis merupakan penyakit yang mempunyai sifat khas berupa massa tulangnya rendah atau berkurang, disertai gangguan mikro-arsitektur tulang dan penurunan kualitas jaringan tulang, yang dapat menimbulkan kerapuhan tulang (Tandra, 2009).

Terjadinya osteoporosis secara seluler disebabkan oleh karena jumlah dan aktivitas sel osteoklas melebihi dari jumlah dan aktivitas sel osteoblas (sel pembentuk tulang). Keadaan ini mengakibatkan penurunan massa tulang. Ada

beberapa teori yang menyebabkan diferensiasi sel osteoklas meningkat dan meningkatkan aktivitasnya, antara lain adalah karena defisiensi estrogen, munculnya faktor sitokin dan pembebanan mekanik pada tulang (Kawiyana, 2009).

Estrogen merupakan inhibitor resorpsi kalsium di tulang yang potensial karena keberadaannya dapat menunjang sekresi dan meningkatkan produksi kalsitonin serta menurunkan sekresi hormon paratiroid. Penurunan produksi estrogen dapat menghambat proses pembentukan osteoblas untuk membentuk jaringan matriks (osteoid) (Stevenson dan Marsh, 1992). Estrogen bertanggung jawab pada fase pertumbuhan dan menutup perkembangan epifisis pada tulang panjang masa pubertas (Greenspan dan Strewler, 1993). Defisiensi estrogen akan menyebabkan terjadinya osteoklastogenesis yang meningkat dan berlanjut dengan kehilangan tulang.

Akibat defisiensi estrogen ini akan terjadi peningkatan produksi dari IL-1, IL-6, dan TNF- $\alpha$ . Estrogen juga merangsang ekspresi dari *osteoprotegerin* (OPG) dan *transforming growth factor*- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) oleh sel osteoblas dan sel stroma, sehingga estrogen berfungsi menghambat penyerapan tulang dengan cara mempercepat atau merangsang apoptosis sel osteoklas (Oursler, 2003). Pada wanita pasca *menopause*, kadar estrogen mulai menurun. Akibat dari penurunan hormon estrogen ini, maka proses resorpsi tulang terganggu (Rachman, 2004). Estrogen mempengaruhi kehilangan tulang baik secara langsung dengan mengikat reseptor pada tulang dan secara tidak langsung dengan memengaruhi hormon pengatur kalsium (PTH dan Vitamin D) dan sitokin interleukin (IL-1, IL-6 dan





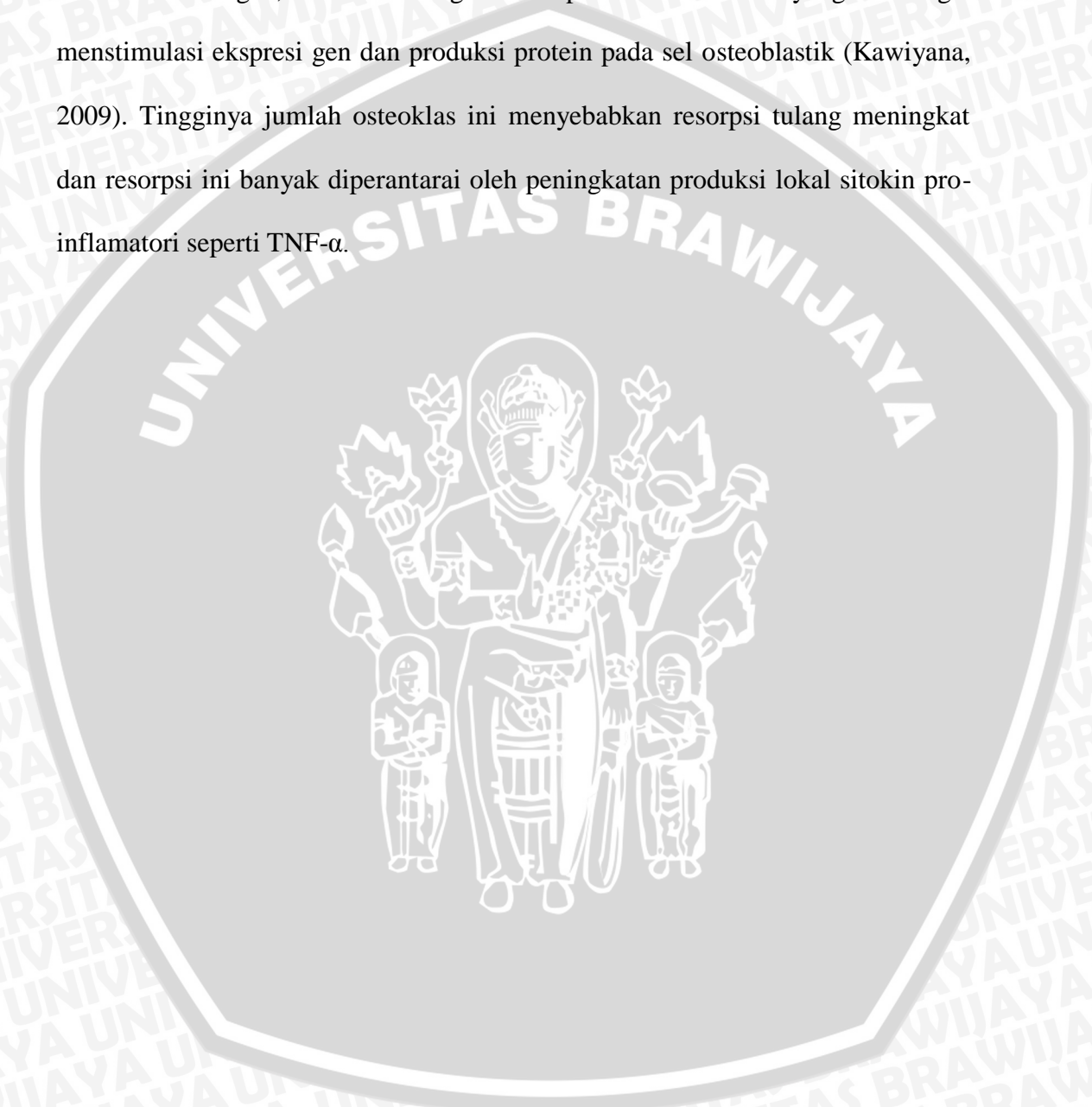
TNF $\alpha$ ) (Potu *et al.*, 2009). Peningkatan kadar dan aktivitas sitokin proinflamasi (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) terjadi secara spontan apabila fungsi ovarium menurun, misalnya pada masa *menopause* (Kawiyana, 2009).

### Sitokin TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  diproduksi terutama oleh makrofag sebagai respon terhadap antigen seperti lipolisakarida. TNF- $\alpha$  dan IL-1 keduanya diketahui berperan untuk meningkatkan perlekatan polimorfonuklear neutrofil dan monosit, sehingga membantu untuk mengumpulkan sel-sel tersebut masuk ke dalam lokasi inflamasi. Molekul-molekul TNF- $\alpha$  menstimulasi resorpsi tulang dengan menginduksi proliferasi dan diferensiasi progenitor-progenitor osteoklas dan mengaktifkan formasi osteoklas secara tidak langsung. TNF- $\alpha$  memiliki peranan yang besar dalam aktivasi sistem imun dibandingkan dengan sitokin yang lainnya berperan dalam sistem imun alami dan spesifik, merangsang sel-sel endotel untuk mengekspresikan molekul adhesi, mendukung proses kemotoksis sel-sel inflamasi, mengaktifkan sel-sel inflamasi (Suk *et al.*, 2001). *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- $\alpha$  juga dapat teraktivasi oleh faktor-faktor lain seperti faktor eksogen dan endogen. Faktor eksogen meliputi molekul yang berhubungan dengan proses infeksius seperti enterotoksin, protein dinding sel jamur, virus dan komponen dari parasit. Selain itu zat pemacu kimia non spesifik seperti *phorbol ester* dan kalsium ionosfor juga dapat sebagai pemacu yang efektif untuk memproduksi TNF- $\alpha$ . (Green dan Flavel, 2000). Pada tulang, jika terjadi *remodeling* tulang berlebihan yang mengakibatkan osteoklas berdiferensiasi

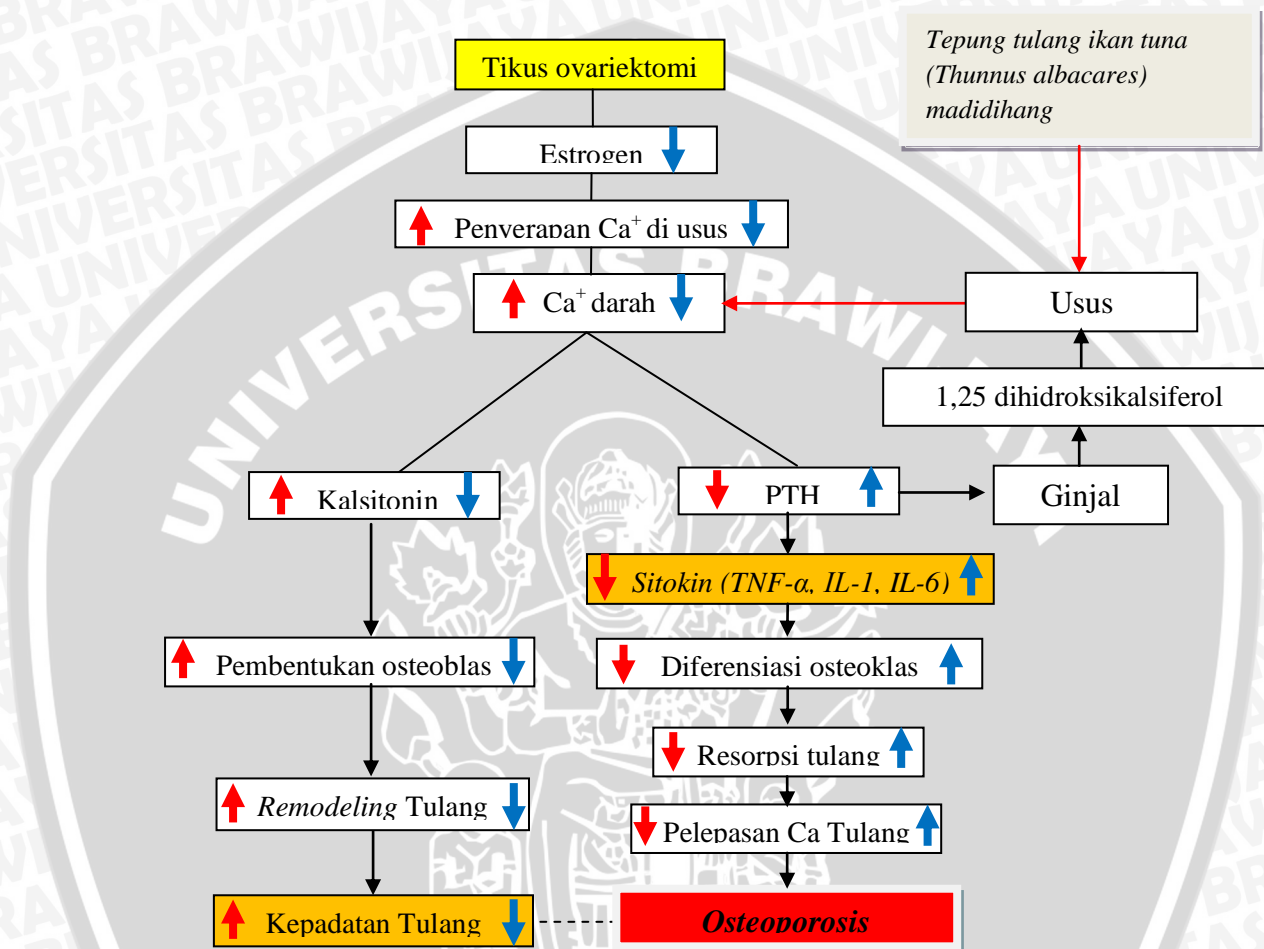


dengan cepat, maka akan terjadi inflamasi. Proses diferensiasi osteoklas ini meningkat karena menurunnya pembentukan osteoblas karena menopause atau defisiensi estrogen, karena estrogen merupakan salah satu yang berfungsi menstimulasi ekspresi gen dan produksi protein pada sel osteoblastik (Kawiyana, 2009). Tingginya jumlah osteoklas ini menyebabkan resorpsi tulang meningkat dan resorpsi ini banyak diperantarai oleh peningkatan produksi lokal sitokin pro-inflamatori seperti  $\text{TNF-}\alpha$ .



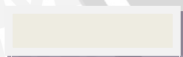
### BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1. Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan Gambar :



: Variabel bebas



: Variabel yang diamati



: Menstimulasi



: Efek pemberian terapi tepung tulang ikan tuna madidihang



: Perlakuan ovariektomi

Tindakan ovariektomi pada hewan coba tikus menimbulkan hilangnya ovarium sebagai penghasil estrogen terbesar pada tubuh dan menimbulkan penurunan estrogen pada tubuh. Penurunan estrogen pada tubuh menyebabkan penyerapan kalsium dalam usus berkurang dan reabsorpsi kalsium di ginjal menurun, sehingga menyebabkan kalsium dalam darah turun. Turunnya kalsium dalam darah direspon oleh tubuh dengan meningkatnya PTH (*Parathyroid hormone*) dan kalsitonin menurun. PTH memiliki reseptor yang berkaitan dengan tulang dan ginjal. Pada ginjal, akan dihasilkan reseptor 1,25 dihidroksikalsiferol yang kemudian ditransfer ke usus, sehingga terjadi penyerapan kalsium.

Meningkatnya PTH juga menyebabkan meningkatnya sitokin (TNF- $\alpha$ , IL-1 dan IL-6) pada tulang sehingga menyebabkan diferensiasi osteoklas meningkat. Dengan osteoklas meningkat bisa menyebabkan tingginya resorpsi tulang, sehingga muncul pelepasan kalsium. Turunnya kalsium bisa menyebabkan pengeroposan tulang, sehingga menyebabkan osteoporosis pada tulang. Pemberian terapi tepung tulang ikan madidihang pada masa menopause diharapkan dapat meningkatkan kadar kalsium dalam darah. Kadar kalsium darah yang meningkat ini diharapkan dapat meningkatkan kalsitonin yang merupakan faktor pembentukan osteoblas di tulang, sehingga proses *remodeling* tulang akan stabil. Proses *remodeling* yang kembali berjalan diharapkan dapat memperbaiki kepadatan tulang pada tikus model ovariektomi yang mengalami osteoporosis.



### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah tersebut, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah pemberian terapi tepung tulang ikan tuna madidihang (*Thunnus albacares*) pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) ovariektomi dapat meningkatkan kepadatan tulang pada os femur dan dapat menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada os femur.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian di laboratorium berlangsung selama 5 bulan, yaitu bulan Januari sampai dengan Mei 2013. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan dan Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Universitas Brawijaya serta di Rumah Sakit dr. Soetomo Surabaya.

### 4.2 Alat dan Bahan

#### 4.2.1 Alat

Alat yang digunakan adalah kandang hewan, sonde lambung, spuit 1 cc, timbangan, kapas, seperangkat alat bedah (*scalpel handle, blade, gunting, needle holder*), seperangkat alat gelas (gelas objek, cawan petri, labu takar, gelas ukuran 100 ml, pipet tetes, pengaduk kaca, tabung mikro, tabung polipropilen), panci presto, blender, oven, ayakan dengan ukuran 100 mesh, vortex, sentrifuse, autoklaf, mortar, penangas air, *water bath*, neraca analitik, mikropipet, *tube eppendorf, dispossable syringe*, oven, pH meter, botol semprot, tabung reaksi, timer, tabung mikro, lemari pendingin, pengaduk kaca, mikropipet, corong, pisau, inkubator, *sliding microtome* dan mikroskop.

#### 4.2.2 Bahan

Bahan yang diperlukan adalah tikus betina galur Wistar sebagai hewan model ovariektomi yang diberi pakan standart AIN 93, tepung tulang ikan tuna Madidihang, aquades, alkohol 70%, NaCl-fisiologis, antibodi poliklonal *rabbit*

TNF- $\alpha$ , Paraformaldehid (PFA) 4%, Fetal Bovine Serum (FBS) Dakon, Strep Avidin Horse Radish Peroxidase (SA-HRP), Diamino Benzidine (DAB), Mayer Hematoxylen, Eosin, Entellan, Etanol, Propylene murni, Gliserin, Parafin, Xylol, Formaldehid 37%.

### 4.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini terbagi menjadi 7 tahap utama, yaitu: (1) Rancangan Penelitian Dan Persiapan Hewan Coba, (2) Pembuatan Tepung Tulang, (3) Ovariektomi pada Hewan Coba, (4) Perlakuan Pada Hewan Coba, (5) Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histopatologis Os Femur, (6) Pewarnaan Imunohistokimia (IHK) Untuk Ekspresi TNF- $\alpha$  dan (7) Analisis Data.

#### 4.3.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Subyek diambil secara acak ke dalam kelompok-kelompok. Hewan coba dibagi menjadi empat kelompok :

**Tabel 4.1** Kelompok perlakuan penelitian

Kelompok A	Kontrol Positif
Kelompok B	Perlakuan 1 (400 mg/kg BB/hari)
Kelompok C	Perlakuan 2 (800 mg/ kg BB/hari)
Kelompok D	Perlakuan 3 (1600 mg/ kg BB/hari)

Semua kelompok merupakan kelompok hewan coba tikus model ovariektomi dan diberikan terapi tepung tulang ikan tuna madidihang kecuali kelompok kontrol



(kelompok A). Kelompok A adalah kelompok tanpa pemberian terapi tepung tulang tuna madidihang (*Thunnus albacares*), kelompok B yaitu kelompok hewan model yang diberikan terapi dengan dosis 400 mg/kg BB, kelompok C yaitu kelompok hewan model yang diberikan terapi dengan dosis 800 mg/kg BB, dan kelompok D yaitu kelompok hewan model yang diberikan terapi dengan dosis 1600 mg/kg BB. Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari empat ekor tikus sebagai ulangan. Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Dosis terapi tepung tulang Ikan Tuna Madidihang (*Thunnus albacares*).

Variabel tergantung : Histopatologi Os Femur dan Ekspresi TNF- $\alpha$ .

Variabel kontrol : Jenis kelamin, umur, berat badan, *Rattus norvegicus* galur Wistar

Sampel penelitian menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar berumur 8-12 minggu. Berat badan tikus berkisar antara 180-200 gram. Hewan coba sebelumnya diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2010):

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

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 15+4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

t= jumlah kelompok (terdiri dari lima macam perlakuan)

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk perlakuan sejumlah 4 macam diperlukan jumlah sampel atau ulangan paling sedikit 5 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup (namun tidak ada jendela terbuka).

#### **4.3.2 Pembuatan Tepung Tulang Ikan Tuna Madidihang**

Tahapan pembuatan tepung tulang ikan dilakukan berdasarkan metode Thalib (2009), yaitu tulang ikan segar yang terdiri dari bagian tulang punggung sampai tulang ekor kemudian dicuci dengan air mengalir. Tulang ikan dikukus selama 10 menit. Tulang dibersihkan dari sisa daging yang menempel dan bagian lainnya yang tidak dibutuhkan kemudian dicuci dengan air mengalir. Tulang ikan yang telah dibersihkan dimasukkan ke dalam air mendidih dan direbus selama 30 menit pada suhu 100°C. Tulang dipotong dengan ukuran 5 cm. Potongan tulang dimasukkan ke dalam panci presto lalu dipanaskan sampai matang, kemudian dilanjutkan dipresto selama 2 jam dengan api yang lebih kecilkan. Potongan tulang dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 120 C selama 35 menit. Potongan tulang yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender hingga halus. Tepung yang dihasilkan diayak menggunakan ayakan dengan ukuran 100 mesh sehingga didapatkan tepung tulang ikan yang homogen.

### 4.3.3 Ovariektomi Pada Hewan Coba

Proses ovariektomi pada hewan coba tikus putih dilakukan berdasarkan metode Hartiningsih (2012), dilakukan melalui sayatan kulit daerah flank bagian kiri dan kanan. Tikus terlebih dahulu dibius menggunakan dosis 1-4 mg/kg BB secara intravena melalui vena *coccygeal*. Setelah tikus terbius, kulit daerah flank disayat dengan panjang sayatan lebih kurang 1-1,5 cm. Selanjutnya jaringan subkutan dikuakkan, lalu *musculus abdomen* disayat, kemudian bantalan lemak ditarik sehingga ovarium beserta saluran tuba *Fallopian* (tuba uterina) dan kornua uteri ikut terbawa keluar rongga abdomen. Ovarium bisa ditemukan, kemudian diikat bagian penggantung ovariumnya dengan benang *cat gut*. Ovarium yang telah diikat dilakukan pemotongan kemudian kornua uteri dan tuba *Fallopian* diposisikan kembali ke dalam rongga abdomen. Ovarium kanan diambil dengan cara serupa. Setelah itu *musculus* dijahit dengan benang *cat gut chromic* dengan tipe jahitan sederhana terputus dan kulit dijahit dengan benang *silk* dengan tipe jahitan sederhana terputus. Setiap *musculus* dan kulit yang selesai penjahitan diberikan iodine sebagai antiseptik. Setelah dilakukan ovariektomi, hewan coba dirawat hingga 3 bulan di kandang, hingga hewan tersebut mengalami osteoporosis. Kondisi osteoporosis dipastikan dengan melakukan foto *rontgen* untuk menunjukkan adanya penurunan densitas tulang pada tikus putih setelah perlakuan ovariektomi (lampiran 1). Kemudian dimulai perlakuan pemberian terapi tepung tulang ikan tuna madidihang (*Thunnus albacares*) sesuai dengan kelompok perlakuan masing-masing.



#### 4.3.4 Pemberian Terapi Terhadap Hewan Coba

Pemberian perlakuan dimulai 3 bulan setelah ovariektomi, melalui mulut dengan disonde selama 1 bulan (Listijani, 2009). Pemberian terapi tepung tulang ikan Tuna Madidihang (*Thunnus albacares*) kepada tikus penelitian dilakukan per oral langsung ke lambung tikus sebanyak 2 ml per ekornya dengan konsentrasi tepung yang berbeda yaitu kelompok kontrol tidak diberi perlakuan, kelompok 2 dengan konsentrasi 400 mg/kg BB, kelompok 3 dengan konsentrasi 800 mg/kg BB dan kelompok 4 dengan konsentrasi 1600 mg/kg BB, diberikan satu kali per hari setiap pukul 06.00 (Abkar, 2009).

#### 4.3.5 Pembuatan Preparat Histopatologis Os Femur

Pembuatan preparat histologi dilakukan dengan pengambilan tulang femur hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*). Pengamatan histopatologi dengan pewarnaan HE bertujuan untuk pengamatan terhadap struktur umum jaringan. Tikus didislokasi pada bagian leher kemudian dilakukan pembedahan pada bagian kaki belakang tikus yang diletakkan dengan posisi ventrodorsal. Kemudian diambil bagian kaki belakang, diisolasi bagian *femur* dan dipotong. Os *femur* mula-mula dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9%. Kemudian tulang dimasukkan dalam larutan PFA (Paraformaldehid) 4%. Kemudian tulang tersebut direndam dalam larutan dekalsifikasi (asam format). Kelunakan tulang terus dipantau sampai benar-benar terdekalsifikasi. Ciri-ciri tulang terdekalsifikasi ialah

strukturnya menjadi fleksibel, transparan, dan mudah ditusuk/digores. Setelah itu, tulang tersebut diproses secara histologi.

Pembuatan preparat histopatologi (lampiran 4) ini dilakukan berdasarkan metode Sabri (2009). Sediaan preparat yang telah dideparafinasi dan rehidrasi ditetesi dengan pewarnaan Hematoksilen, selanjutnya dibilas dengan air kran mengalir kemudian dimasukkan ke dalam *aquadest*. Sediaan diwarnai dengan pewarna *Eosin* kemudian dibilas dengan air kran mengalir. Tahap selanjutnya adalah dilakukan proses dehidrasi dengan mencelupkan sediaan ke dalam serial larutan alkohol 70, 80, 90 dan 95%, alkohol absolut I, II, dan III. Tahap berikutnya adalah penjernihan (*clearing*), sediaan dimasukkan ke dalam xylol I, II dan III. Tahap terakhir dari pewarnaan ini adalah *mounting* yaitu penempelan gelas penutup pada sediaan dengan bantuan perekat entelan. Sediaan yang telah diwarnai lalu diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100 x dan 400 x.

#### 4.3.6 Pewarnaan Imunohistokimia

Langkah-langkah dalam metode pewarnaan imunohistokimia yaitu preparat dicuci dengan PBS dengan pH 7,4 selama 1x15 menit selanjutnya ditetesi 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit selama 3 kali dan diblok dengan 5% FBS (*Fetal Bovine Serum*) selama 1 jam. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali selanjutnya diinkubasi dengan antibodi primer, yaitu selama 1 jam dengan suhu ruang dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Berikutnya

diinkubasi dengan antibodi sekunder selama 1 jam dengan suhu ruang. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali.

Ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radish Peroxidase*) selama 40 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Ditetesi dengan DAB (*Diamino Benzidine*) selama 10 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Selanjutnya *counter staining* menggunakan Mayer *Hematoxylen* selama 10 menit. Dicuci dengan air mengalir. Dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Tahapan terakhir *mounting* dengan entellan dan ditutup dengan *cover glass*. Hasil diamati menggunakan mikroskop elektron dengan perbesaran 400 x (Calnek, 1997).

#### 4.3.7 Analisis Data

Data kuantitatif yang diperoleh dari analisa kualitatif ekspresi TNF- $\alpha$  dan pengamatan preparat histopatologis tulang femur dengan *axiovision* ditabulasi dengan menggunakan *Microsoft Office Excel* diamati dengan mikroskop perbesaran 100 x dan 400 x. Data yang diperoleh dilakukan analisis menggunakan SPSS 16,0 *for Windows* dengan analisis ragam ANOVA. Apabila terdapat perbedaan nyata uji dilanjutkan dengan perbandingan berganda uji *Tukey* atau Beda Nyata Jujur (BNJ) pada taraf 5 % untuk memperoleh hasil yang terbaik (Sutoyo, 2003).



## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Ekspresi *Tumor Necrosis Faktor* (TNF- $\alpha$ ) Pada *Os Femur*

Ekspresi TNF- $\alpha$  pada tikus dengan berbagai perlakuan ditunjukkan dengan hasil analisa ANOVA menunjukkan adanya perbedaan nyata antar perlakuan (Tabel 5.1). Uji statistika ekspresi TNF- $\alpha$  secara lengkap dijelaskan pada lampiran 8.

**Tabel 5.1** Ekspresi *Tumor Necrosis Faktor* (TNF- $\alpha$ ) pada tikus perlakuan **Kelompok Perlakuan** **Rata-rata Ekspresi TNF- $\alpha$**

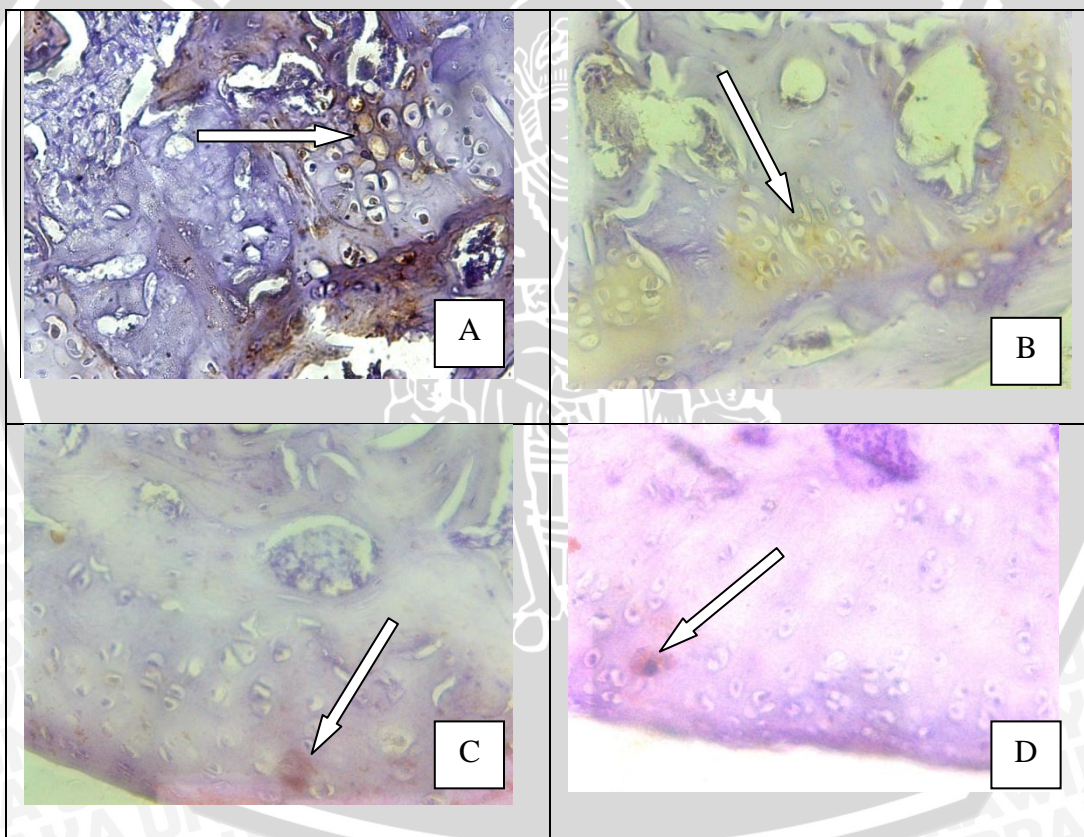
Kelompok Perlakuan	Rata-rata Ekspresi TNF- $\alpha$
Kontrol (A)	17,11 $\pm$ 0,062 <sup>a</sup>
Terapi dosis 400 mg/kg BB (B)	14,11 $\pm$ 0,062 <sup>b</sup>
Terapi dosis 800 mg/kg BB (C)	4,09 $\pm$ 0,058 <sup>c</sup>
Terapi dosis 1600 mg/kg BB (D)	1,75 $\pm$ 0,049 <sup>d</sup>

Keterangan: Notasi berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata antar perlakuan ( $p < 0,05$ ).

Pemberian terapi tepung tulang ikan tuna madidihang (*Thunnus albacares*) dapat menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada os femur. Pada hewan model kontrol menunjukkan ekspresi TNF- $\alpha$  yang paling tinggi dari yang lain, ditunjukkan dari warna coklat yang muncul pada preparat (Gambar 5.1), yaitu dengan rata-rata 17,11  $\pm$  0,062, dibandingkan tikus dengan dosis terapi 400 mg/kg BB ekspresi TNF- $\alpha$  menurun, yaitu 14,11  $\pm$  0,062 dan semakin menurun pada dosis terapi 800 mg/kg BB, 4,09  $\pm$  0,058, serta penurunan paling rendah yaitu pada hewan model yang diberikan perlakuan dosis 1600 mg/kg BB, yang memiliki rata-rata 1,75  $\pm$  0,049. Ada perbedaan yang nyata pada keempat kelompok perlakuan tersebut (lampiran 8). Hal ini menunjukkan adanya pengaruh pada masing-masing

kelompok perlakuan yang ditunjukkan dengan perbedaan nilai rata-rata ekspresi TNF- $\alpha$ , dengan penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  tertinggi adalah pada perlakuan dosis 1600 mg/kg BB.

Data ini didukung dengan hasil pewarnaan imunohistokimia (Gambar 5.1). Hasil pewarnaan dengan metode imunohistokimia (IHK) menunjukkan bahwa adanya ekspresi TNF- $\alpha$  pada setiap perlakuan yang terlihat dengan munculnya warna coklat. *Diaminobenzidine* memvisualisasikan warna coklat terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  yang bereaksi dengan antibodi.



**Gambar 5.1** Ekspresi *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) pada *os femur* tikus, ditandai adanya warna coklat.

Keterangan: A = *Os Femur* Tikus Kontrol; B = *Os Femur* Tikus dengan terapi dosis 400 mg/kg BB; C = *Os Femur* Tikus dengan terapi dosis 800 mg/kg BB dan D = *Os Femur* Tikus dengan terapi dosis 1600 mg/kg BB). Perbesaran 400x. Anak panah menunjukkan adanya ekspresi TNF- $\alpha$ .



Penurunan ekspresi yang tampak terlihat wana coklat pada tulang femur, seperti pada hewan model kontrol yang terdapat warna coklat paling mencolok. Hewan model dengan perlakuan dosis 400, 800 dan 1600 mg/kg BB menunjukkan penurunan pada rata-rata ekspresi dan adanya penurunan warna coklat (Gambar 5.1). Warna coklat ini terlihat pada bagian di antara sel-sel osteosit pada tulang femur. Triskayani (2010), menyatakan bahwa ekspresi TNF- $\alpha$  ini muncul secara ekstraseluler karena TNF- $\alpha$  merupakan sitokin yang bekerja pada reseptor pada sistem ekstraseluler. Tingkat TNF- $\alpha$  meningkat setelah *menopause*, ini ditandai dengan peningkatan resorpsi tulang dan hilangnya massa tulang (Balga *et al.*, 2006). Di saat keadaan osteoklas tulang yang meningkat, menyebabkan penghambatan produksi osteoblas yang berperan dalam formasi tulang, sehingga *remodeling* tulang terganggu dan resorpsi tulang menjadi meningkat. *Remodeling* tulang yang terganggu menyebabkan pengeroposan tulang dan ini merupakan salah satu tanda dari osteoporosis. Ketika terjadi osteoporosis dengan keadaan osteoklas meningkat ini ditandai oleh meningkatnya ekspresi TNF- $\alpha$ .

Pada hewan model ovariektomi, terjadi penurunan kalsium darah pada tubuh. Penurunan ini direspon tubuh dengan menaikkan produksi PTH. PTH ini mengambil kalsium dari tulang dengan demineralisasi tulang. Ketika terjadi demineralisasi tulang maka akan terjadi akumulasi kalsium dalam darah sehingga mengakibatkan peningkatan level kalsium pada darah. Sel-sel osteoklas menangkap partikel-partikel matriks tulang dan kristal melalui fagositosis yang akhirnya melarutkan benda-benda tersebut dan melepaskannya ke dalam darah. Kemudian darah akan menuju ke ginjal, secara normal ginjal akan melepas atau



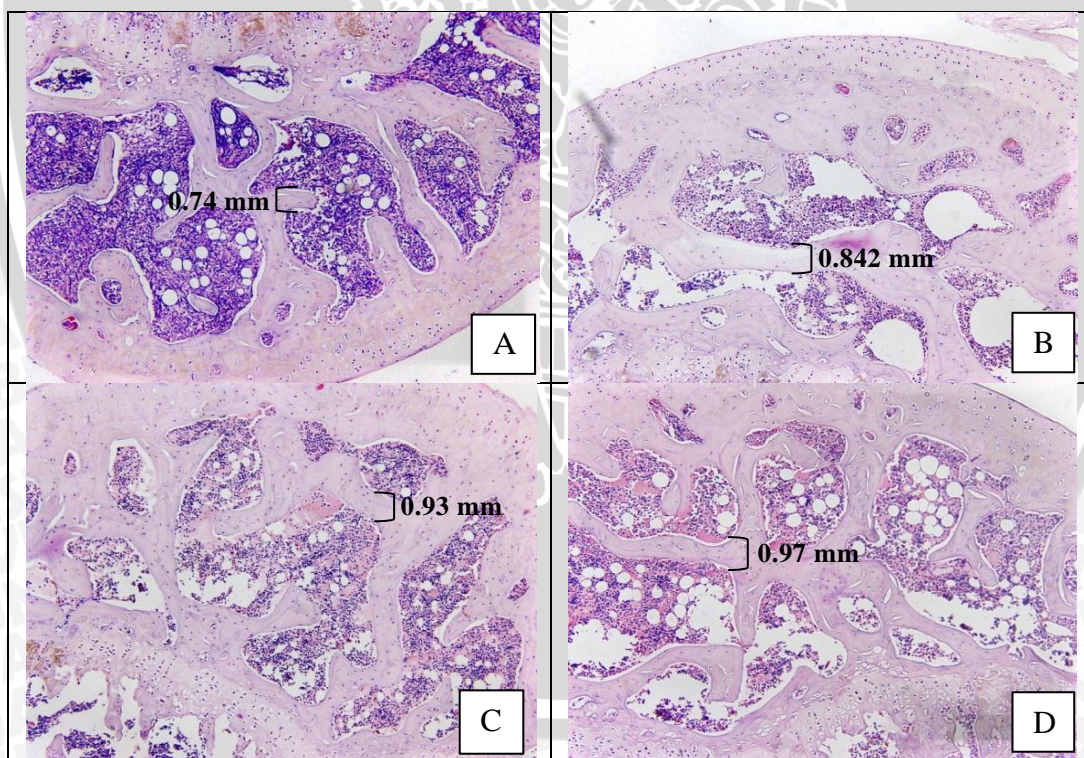
mengeluarkan segala sesuatu yang berlebih dari dalam tubuh melalui urin (Yuniarti *et al.*, 2008). Maka kalsium akan dikeluarkan dari dalam tubuh melalui urin (hiperkalsiuria). Sehingga mengakibatkan penurunan kadar kalsium pada darah yang akan menimbulkan respon hipotalamus untuk menstimulasi hormon paratiroid untuk kembali meningkatkan level kalsium pada darah. PTH akan meningkatkan kerja ginjal dalam mereabsorpsi kalsium yang digunakan untuk pembentukan protein 25-hidroksikalsiferol. Kemudian PTH juga akan mempengaruhi sitokin TNF- $\alpha$  yang merupakan prekursor osteoklas untuk meningkatkan aktifitas dalam proses pengeroposan tulang, sehingga kalsium dari tulang akan digunakan untuk produksi 25-hidroksikalsiferol. 25-hidroksikalsiferol akan ditransport menuju usus (jejunum) untuk diubah menjadi 1,25-dihidroksikalsiferol. Seperti diungkapkan Murray *et al.* (2003), 1,25-dihidroksikalsiferol ini bekerja pada usus halus untuk merangsang penyerapan kalsium makanan dan bersama dengan PTH mendukung mobilisasi kalsium dari tulang. Pada saat yang sama 1,25-dihidroksikalsiferol dan PTH menyebabkan ginjal mereabsorpsi lebih banyak ion kalsium, sehingga pada plasma dan kalsium ekstraseluler akan meningkat ke level normal (normokalsemia). Namun, ketika tanpa disertai oleh adanya kompensasi kalsium, maka akan terus terjadi pelepasan kalsium tulang dan akan terus terjadi osteoporosis.

Pemberian terapi tepung tulang ikan tuna madidihang (*Thunnus albacares*) pada tikus menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  secara tidak langsung. Tepung tulang ikan tuna madidihang (*Thunnus albacares*) yang diberikan pada tikus model ovariektomi bisa meningkatkan kadar kalsium dalam tubuh yang masuk melalui

usus dengan diikat oleh protein 1,25 dihidroksikalsiferol dan akan terjadi transport aktif yang membawa kalsium menuju darah, sehingga kalsium dalam darah akan meningkat. Dalam kondisi ini, tubuh merespon penurunan PTH dan menurunkannya sitokin TNF- $\alpha$ , sehingga aktivitas osteoklas menjadi normal dan proses *remodeling* akan berjalan normal. Proses *remodeling* yang berjalan normal akan mengurangi terjadinya kejadian osteoporosis pada tulang (Murray *et al.*, 2003).

## 5.2 Gambaran Histopatologis Os Femur Dengan Pewarnaan HE

Perubahan histopatologis os femur yang diberi perlakuan terapi tepung tulang ikan tuna madidihang (*Thunnus albacares*) ditunjukkan pada gambar 5.2.



**Gambar 5.2** Hasil Pewarnaan HE pada *Os Femur* Tikus Model Ovariektomi

Keterangan: A = *Os Femur* Tikus Kontrol; B = *Os Femur* Tikus dengan terapi dosis 400 mg/kg BB; C = *Os Femur* Tikus dengan terapi dosis 800 mg/kg BB dan D = *Os Femur* Tikus dengan terapi dosis 1600 mg/kg BB. Pada perbesaran 100x, bar ( ) menunjukkan ketebalan trabekula.



Pada tikus kontrol, struktur tulang trabekula terlihat tipis dan terputus (Gambar 5.2 A). Dengan dosis terapi mulai dari 400 mg/kg BB sampai 1600 mg/kg BB terlihat struktur tulang trabekula semakin tebal, padat dan mulai tersambung dari satu cabang ke cabang yang lain. Terutama pada dosis terapi 1600 mg/kg BB menunjukkan bagian trabekula yang lebih tebal dari yang lain dan mulai menyambung serta membentuk garis trayektori yang terlihat menuju arah proksimal dari femur. Hal ini menunjukkan bahwa pada semakin tinggi dosis terapi menunjukkan adanya perbaikan struktur trabekula dan dosis terapi 1600 mg/kg BB merupakan dosis yang menunjukkan perubahan struktur yang paling baik, lebih padat dan searah dengan bagian tulang kompakta (Gambar 5.2 D).

**Tabel 5.2** Ketebalan trabekula pada tikus perlakuan

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Ketebalan Trabekula (mm)
Kontrol (A)	0,748 ± 0,029 <sup>a</sup>
Terapi dosis 400 mg/kg BB (B)	0,842 ± 0,032 <sup>b</sup>
Terapi dosis 800 mg/kg BB (C)	0,936 ± 0,021 <sup>c</sup>
Terapi dosis 1600 mg/kg BB (D)	0,968 ± 0,019 <sup>c</sup>

Keterangan: Notasi berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata antar perlakuan ( $p < 0,05$ ).

Pemberian terapi tepung tulang ikan tuna madidihang (*Thunnus albacares*) memberikan hasil berupa peningkatan ketebalan trabekula pada os femur. Hasil perlakuan menunjukkan penurunan dari hewan model kontrol hingga tikus dengan terapi. Pada hewan model kontrol menunjukkan ketebalan yang lebih tipis dari yang lain, yaitu dengan rata-rata  $0,748 \pm 0,029$ , dibandingkan tikus dengan dosis terapi 400 mg/kg BB ketebalan yang meningkat, yaitu  $0,842 \pm 0,032$  dan semakin



meningkat pada dosis terapi 800 mg/kg BB,  $0,936 \pm 0,021$  serta peningkatan paling tinggi yaitu pada hewan model yang diberikan perlakuan dosis 1600mg/kg BB, yang memiliki rata-rata  $0,968 \pm 0,019$ . Analisa statistika menunjukkan bahwa pemberian tepung tulang ikan dengan dosis 800 mg/kgBB telah memberikan perbaikan yang nyata pada ketebalan trabekula, yaitu  $0,936 \pm 0,021$ , karena ketika dibandingkan dengan dosis perlakuan terapi dosis 1600 mg/kg BB tidak berbeda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa dengan pemberian dosis 800 mg/kgBB telah mampu memberikan hasil yang baik.

Menurut Kawiyana (2009), penurunan kadar hormon estrogen dalam tubuh dapat menimbulkan peningkatan penyerapan kalsium pada tulang dan akan mengakibatkan pengeroposan tulang. Ketika terjadi defisiensi estrogen, maka monosit tidak bisa menghentikan kerja dari faktor-faktor aktivasi osteoklas, yaitu pengeluaran sitokin IL- $1\beta$  dan TNF- $\alpha$ . Kemudian pengeluaran M-CSF, IL-6, RANK-L dan PGE oleh sel osteoblas tidak dapat terhenti sehingga akan terus terjadi diferensiasi osteoklas dan tanpa adanya apoptosis osteoklas. Osteoklas akan mengalami peningkatan aktifitas sehingga akan mengalami diferensiasi dan akan teraktivasi. Kemudian akan melakukan fagosit sel tulang oleh osteoklas sehingga tulang akan menjadi keropos dan terjadi penurunan kepadatan tulang (Tabel 5.2).

Pada kondisi tikus model ovariektomi, menyebabkan penurunan hormon estrogen, yang mengakibatkan terjadinya penurunan kalsium dalam tubuh. Menurut Stevenson dan Marsh (1992), estrogen merupakan inhibitor resorpsi kalsium di tulang yang potensial karena keberadaannya dapat menunjang sekresi

dan meningkatkan produksi kalsitonin serta menurunkan sekresi hormon paratiroid. Penurunan produksi estrogen dapat menggagalkan osteoblas mendeposit jaringan matriks (osteoid). Jika terjadi defisiensi estrogen akan menyebabkan terjadinya osteoklastogenesis yang meningkat dan berlanjut dengan kehilangan tulang. Selanjutnya, akibat defisiensi estrogen ini akan terjadi peningkatan produksi dari IL-1, IL-6, dan TNF- $\alpha$ . Estrogen juga merangsang ekspresi dari osteoprotegerin (OPG) dan *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) oleh sel osteoblas dan sel stroma, sehingga estrogen berfungsi menghambat penyerapan tulang dengan cara mempercepat atau merangsang apoptosis sel osteoklas (Oursler, 2003). Akibat dari penurunan hormon estrogen ini, maka proses resorpsi tulang terganggu (Rachman, 2004). Penurunan kalsium akibat penurunan estrogen ini menimbulkan peningkatan pada PTH, menurut Guyton (1999) meningkatnya aktivitas kelenjar paratiroid dapat meningkatkan absorpsi garam-garam kalsium dari tulang, dan masuk ke darah sehingga kadar kalsium dalam tulang menurun. Sehingga mengakibatkan terjadinya keropos pada tulang yang ditunjukkan dari kepadatan struktur tulang menurun.

Pemberian tepung tulang ikan tuna madidihang bisa meningkatkan kalsium dalam darah melalui penyerapan pada organ pencernaan. Ketika kompensasi kalsium diperoleh dari pemberian tepung tulang ikan tuna madidihang, maka demineralisasi tulang bisa dikurangi dan level kalsium pada darah bisa meningkat. Hal ini menyebabkan meningkatnya kalsitonin, sehingga produksi osteoblas bisa meningkat dan proses *remodeling* berjalan normal. Ketika proses *remodeling* berjalan normal, maka proses resorpsi dan formasi tulang bisa

berjalan normal. Menurut Murray *et al.* (2003), proses *remodeling* yang berjalan normal akan mengurangi terjadinya kejadian osteoporosis. Hal ini ditunjukkan dengan mulai ada perbaikan kepadatan struktur tulang trabekula.





## BAB VI PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

- 1) Pemberian terapi tepung tulang ikan tuna madidihang (*Thunnus albacares*) dengan dosis 800 mg/kg BB pada tikus (*Rattus norvegicus*) model ovariektomi bisa memperbaiki kepadatan tulang berdasarkan kepadatan struktur trabekula.
- 2) Pemberian terapi tepung tulang ikan tuna madidihang (*Thunnus albacares*) 1600 mg/kg BB pada tikus (*Rattus norvegicus*) model ovariektomi mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada tulang femur.

### 6.2 Saran

Perlu ada penambahan kontrol negatif sebagai pembanding antar perlakuan pada penelitian dan diperlukan pengamatan lebih detail tentang osteoporosis yang dialami hewan model ovariektomi dengan cara melakukan rontgen pra dan pasca perlakuan untuk memastikan kondisi osteoporosis pada hewan model.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anggorodi R. 1985. Ilmu Makanan Ternak Umum. Jakarta: PT Gramedia.
- Arjmandi, B.H., Alekel, L., Hollis, B.W., Amin, D., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Guo, P., Kukreja, S.C. 1996. *Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis*. *J Nutr* 126:161-167.
- Astawan, T.W. 2002. Jaringan Tulang. Bogor: Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Bonjour, P., Rizzoli, P., 1999. *Peak bone mass*. Dalam : Rizzoli, R. *The pathophysiology of osteoporosis and bone disease, The 2nd International Training Course on Osteoporosis*. Denpasar
- Delman, H.D. dan Eurell, J. 1998. *Text Book Of Veterinary Histology*. Ed ke-5. USA: Williamson and Wilkins.
- Dempster, D.W., Birehman, R., Xu, R., Lindsay, R., Shen, V. 1995. *Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy*. *Bone* 16 (1):157-161.
- Devareddy L, Hooshmand S, Collins JK, Lucas EA, Chai SC, Arjmandi BH. 2008. *Blueberry prevents bone loss in ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis*. *J Nutr Biochem* 10:694-9.
- Diniah. 2001. Pemanfaatan Sumberdaya Tuna–Cakalang Secara Terpadu. (Makalah). Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Einhorn. 1996. *Cellular control of bone homeostasis*. Di dalam: *Mishell's Textbook of infertility, Contraception and Reproductive Endocrinology*. 4<sup>th</sup> Ed. New York: Blackwell Science. hlm.8-16.
- Fitzpatrick LA. 2003. *Phytoestrogens-mechanism of action and effect on bone markers and bone mineral density*. *Endocrin Metab Clin* 32(1):233-52.
- Goldberg G. 2004. *Nutrition and bone*. *Women's Health Medicine* 1(1):25-29.
- Green EA & Flavell RA (2000). The temporal importance of TNF- $\alpha$  expression in the development of arthritis reumatoid. *Immunity*, 12: 459-469.
- Greenspan FS, Stewler GJ. 1993. *Basic and clinical endocrinology*. Fifth Ed. Appleton and Lange, Stanford. hlm. 263-279



- Hartiningsih, Anggraini, D., Aji, D.. 2012. Respons Metafisis Tulang Femur Distalis Tikus Ovariectomi Yang Mengonsumsi Kalsitriol. Yogyakarta. Bagian Ilmu Bedah dan Radiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada
- Junquiera, and Carneiro. 2007. *Basic Histology*. The McGraw-Hill Companies.
- Kalu, D.N., Elena, S., Chung-Ching, L., Fabrizio, F., Arjmandi, B.H., Salih, M.A.. 1993. Ovariectomi-induced bone loss and the hematopoetic system. *Bone and Mineral* 23:145-161.
- Karlsn, M.K., Vergnauld, P., Delmos, P.D., Obrant, K.J.. 1995. *Indicates of bone formation in weight lifters. Calcif Tissue Int* 56 (3):177-180.
- Kawiyana, S.I.K. 2009. Interleukin-6 dan RANK-ligand yang tinggi sebagai faktor risiko terhadap kejadian osteoporosis pada wanita pascamenopause defisiensi estrogen. Program Studi Ilmu Kedokteran Pascasarjana Universitas Udayana.
- Kusriningrum, R. S. 2010. Perancangan Percobaan. Surabaya . Airlangga University Press
- Lee, C.J., Kanis, J.A. 1994. *An association between osteoporosis and premenstrual symptoms and postmenopausal symptoms. J Bone Miner* 24:127-134.
- Marcus, R., Feldman, D., Kelsey, J.. 1996. Osteoporosis. New York: *Academic Press*.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., 2003. *Harper's Review of Biochemistry*. Dalam Andry Hartono: Biokimia, EGC. Penerbit Kedokteran, Jakarta.
- Ott, S.M. 2002. Osteoporosis and bone physiology. *J Am Medic* 228:334-341.
- Oursler, M.J. 2003. *Direct and indirect effects of estrogen on osteoclast. J Musculoskel Neuron Interact* 3(4):363-6.
- Potu, B.K., Bhat, K.M., Rao, M.S., Nampurath, G.K., Chamallamudi, M.R., Nayak, S.R., Muttigi, M.S. 2009. *Evidence-based assessment of petroleum ether extract of Cissus quadrangularis Linn. On: Ovariectomi induced osteoporosis. J Medical Sci* 114(3):140-148.
- Price, C.P., Thomson, P.W.1995. *The role of biochemical test in the screening and monitoring of osteoporosis. Am Clin Biochem* 32:244-60.



- Puzas, V.E.1993. The osteoblast. Di dalam: *Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism*. Favas MJ, editor. 2nd Ed. Raven Press Ltd. hlm.15-20.
- Rachman, I.A. 1999. Paparan sinar UV beta terhadap *remodeling* tulang: Studi eksperimen pada M.fascicularis yang hipoestrogenis. [Disertasi]. Program Pasca Sarjana UI. Jakarta.
- Rachman, I.A. 2004. Pengaruh estrogen terhadap osteoporosis. Pada Simposium Nasional: Memasyarakatkan menopause untuk meningkatkan produktivitas dan kualitas hidup wanita. Jakarta: Permi Jaya.
- Sabri, M. 2011. Aktivitas Ekstrak Etanol Batang Sipatah-Patah (*Cissus Quadrangula Salis*) Sebagai Antiosteoporosis Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) [Skripsi]. Program Studi Sains Veteriner, Sekolah Pascasarjana. IPB
- Shirwaikar, A., Khan, S., Malini, S. 2003. *Antiosteoporotic effect of ethanol extract of Cissus quadrangularis Linn. on ovariectomized rat. J Ethnopharmacol* 89: 245-250.
- Stevenson, J.S., Marsh, M.S. 1992. *An atlas of osteoporosis*. Parthenon Publishing Group New Jersey. USA.
- Suhargo, L. 2008. Pemanfaatan Ekstrak Daun Wungu {*Graptophyllum Pictum* (L.) Griff.} Untuk Penurunan Kadar Kolesterol Serum Darah Mencit Betina Yang Diovariectomi. Surabaya. Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga
- Suk, K, S.Kim, Y.H. Kim, K.A. Kim, I. Chang, H. Yagita, M. Shong, and M.S. Lee. 2001. *IFN-g/TNF-a synergism as the final effector in autoimmune arthritis rheumatoid. Journal of Immunology*, 166: 4441-4489.
- Telford IR, Bridgman CF. 1995. *Indroduction to functional histology. 2nd Ed. Harper Collins Colloge Publishers*. hlm.103-119.
- Thalib, Ahmad. 2009. Pemanfaan Tepung Tulang Ikan Madidihang (*Thunnus albacares*) Sebagai Sumber Kalsium dan Fosfor Untuk Meningkatkan Nilai Gizi Makron Kenari. Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor
- Triskayani, W. 2010. Peranan Sitokin Pada Proses Destruksi Jaringan Periodonsium. Universitas Sumatera Utara. Medan

**Lampiran 1. Hasil Pra Penelitian**

Foto x-ray tikus 1 bulan pasca ovariektomi

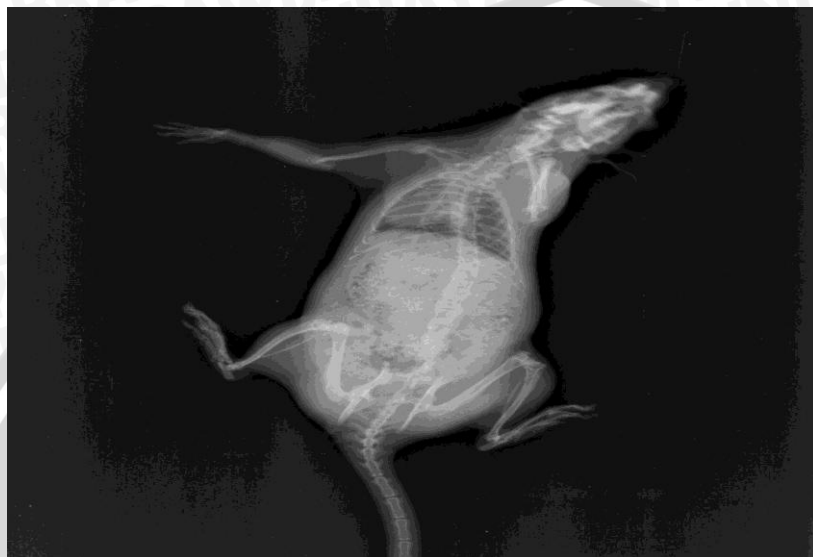
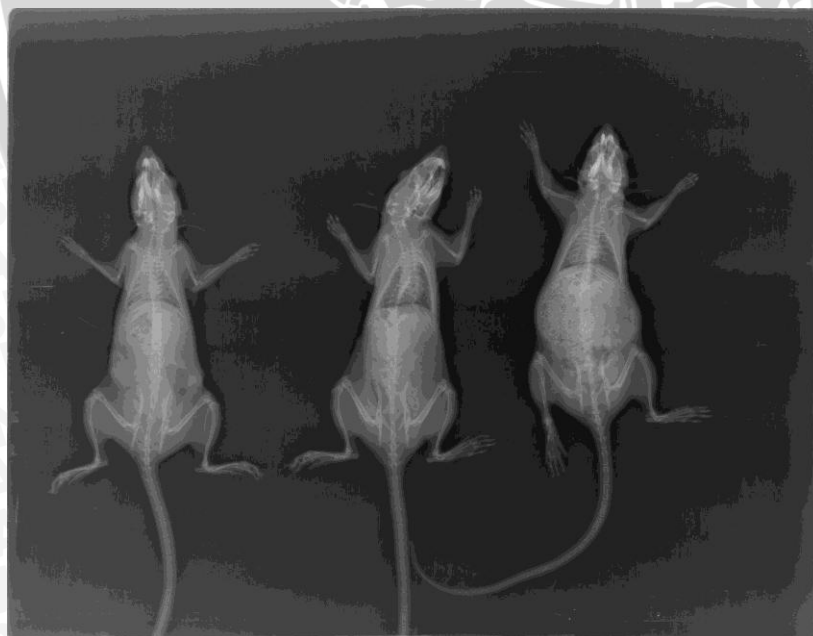


Foto x-ray tikus 3 bulan pasca ovariektomi

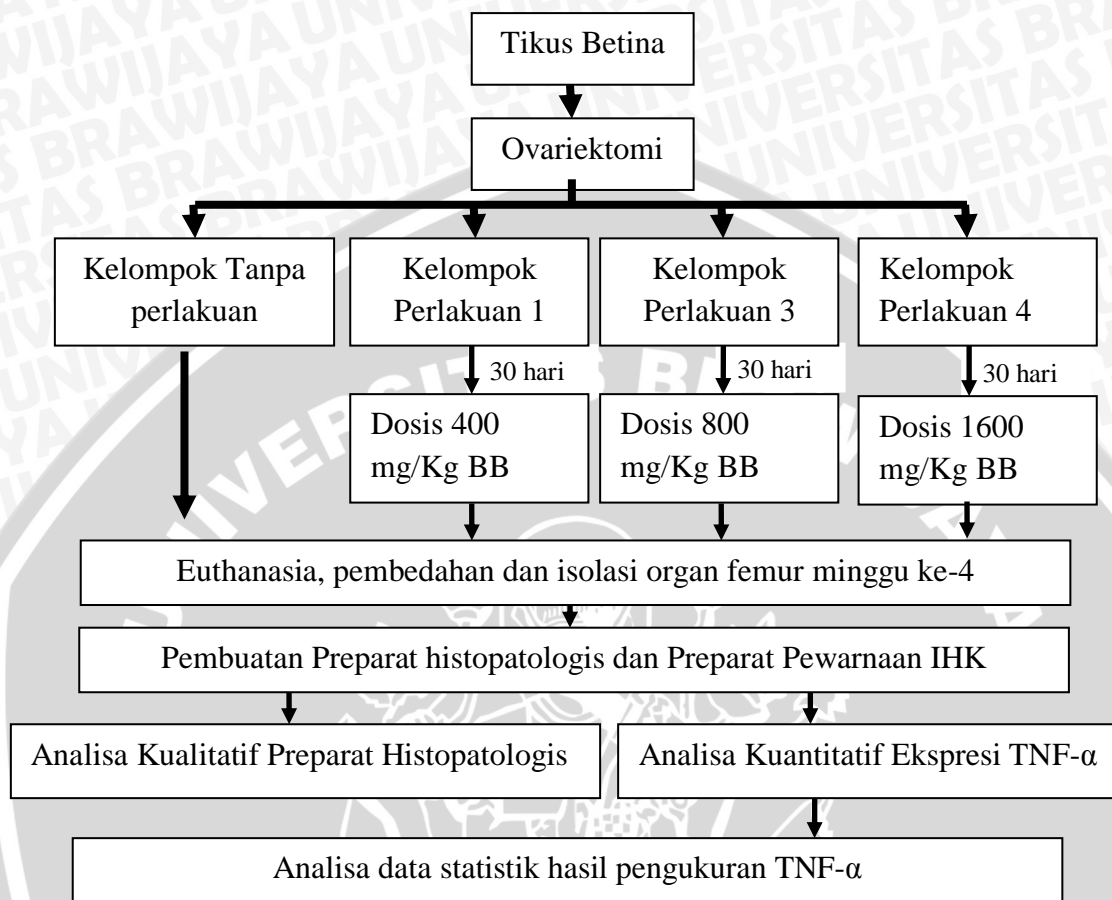


Lampiran 2. Sertifikat Laik Etik

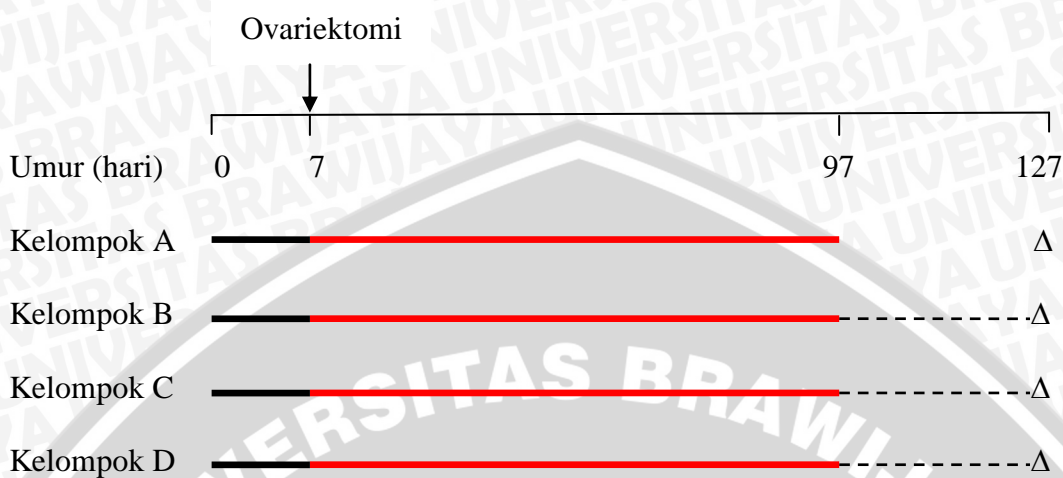




**Lampiran 3.** Diagram Alir Penelitian



**Lampiran 4.** Skema Alur Perlakuan Tikus



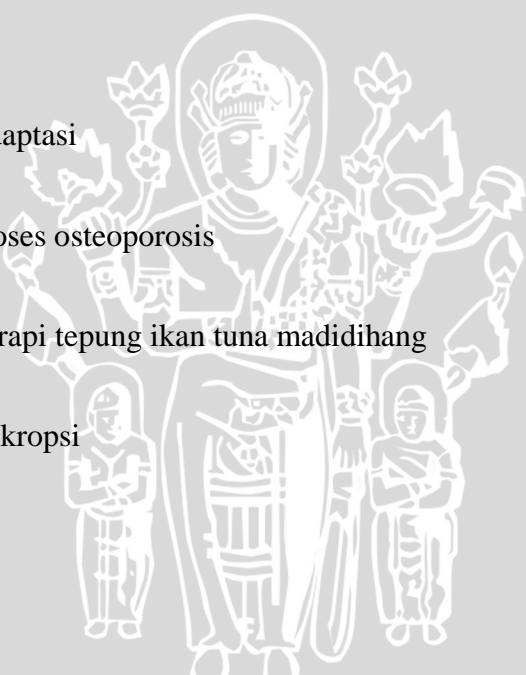
Keterangan:

— : Adaptasi

— : Proses osteoporosis

- - - - : Terapi tepung ikan tuna madidihang

Δ : Nekropsis



### Lampiran 5. Penentuan Dosis

- Kelompok B (Dosis terapi = 400 mg/Kg)

Berat kering tepung tulang = Dosis pemberian x Berat badan x Jumlah tikus

$$= 400 \text{ mg/Kg} \times 200 \text{ gr} \times 4$$

$$= \frac{400 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} \times 800 \text{ gr}$$

$$= 320 \text{ mg}$$

Dosis terapi = 320 mg untuk 4 ekor, untuk 1 ekor tikus dengan berat badan 200 gr = 80mg.

Volume pemberian = 2 ml

$$\text{Perhitungan} = 320 \text{ mg} + 7,68 \text{ ml} \rightarrow 320 \text{ mg}/8 \text{ ml} \rightarrow 80 \text{ mg}/2 \text{ ml}$$

- Kelompok C (Dosis terapi = 800 mg/Kg)

Berat kering tepung tulang = Dosis pemberian x Berat badan x Jumlah tikus

$$= 800 \text{ mg/Kg} \times 200 \text{ gr} \times 4$$

$$= \frac{800 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} \times 800 \text{ gr}$$

$$= 640 \text{ mg}$$

Dosis terapi = 640 mg untuk 4 ekor, untuk 1 ekor tikus dengan berat badan 200 gr = 160 mg.

Volume pemberian = 2 ml

$$\text{Perhitungan} = 640 \text{ mg} + 7,36 \text{ ml} \rightarrow 640 \text{ mg}/8 \text{ ml} \rightarrow 160 \text{ mg}/2 \text{ ml}$$



- Kelompok D (Dosis terapi = 1600 mg/Kg)

Berat kering tepung tulang = Dosis pemberian x Berat badan x Jumlah tikus

$$= 1600 \text{ mg/Kg} \times 200 \text{ gr} \times 4$$

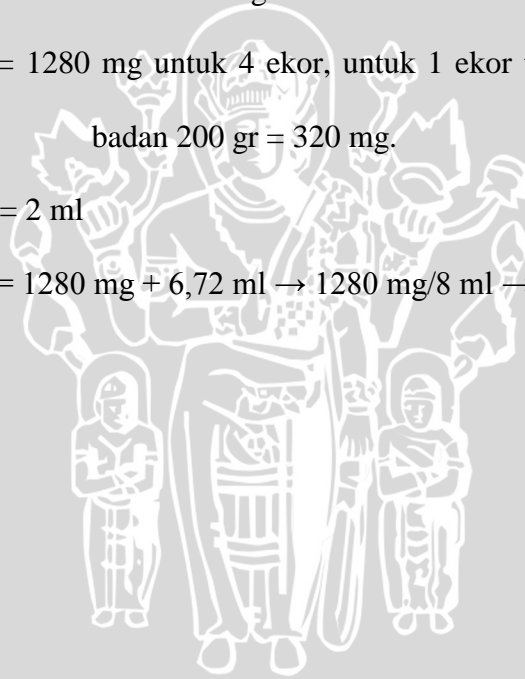
$$= \frac{1600 \text{ mg}}{1000 \text{ gr}} \times 800 \text{ gr}$$

$$= 1280 \text{ mg}$$

Dosis terapi = 1280 mg untuk 4 ekor, untuk 1 ekor tikus dengan berat badan 200 gr = 320 mg.

Volume pemberian = 2 ml

Perhitungan = 1280 mg + 6,72 ml → 1280 mg/8 ml → 320 mg/ 2 ml



### Lampiran 6. Metode pembuatan preparat histopatologi

Tahapan-tahapan pembuatan preparat dengan menggunakan metode pewarnaan HE yaitu setelah organ femur diisolasi maka tahap berikutnya dilakukan fiksasi yang dilakukan pada suhu 400°C dan dalam keadaan teragitasi.

Dehidrasi bertujuan untuk mengeluarkan air dari dalam jaringan dengan menggunakan larutan etanol secara bertingkat dari konsentrasi 70% sampai dengan absolut berkisar antara 10 menit hingga 30 menit. Proses dehidrasi berjalan dalam kondisi teragitasi dan pada suhu 4°C. Selanjutnya proses infiltrasi menggunakan *propylene* murni pada suhu ruang selama 30 menit untuk setiap tahapannya.

Proses *embedding* yaitu pertama-tama tutup objek gelas diolesi gliserin dan tetap dalam kondisi hangat (pengerjaan dilakukan diatas hot plate bersuhu 67oC), kemudian parafin cair pada *embedding tissue console* dituangkan ke dalam tutup objek gelas perlahan-lahan sampai permukaannya cembung. Jaringan secara hati-hati diletakkan ke dalam parafin dengan menggunakan pinset. Kemudian letaknya diatur sesuai dengan posisinya terhadap jaringan yang lain untuk mempermudah proses pemotongan. Pada setiap sampel diberikan label dengan nama sampelnya ditulis menggunakan pensil di atas kertas film.

Setelah jaringan ditanam, dipindahkan dari keadaan hangat ke bagian dingin (*cold plate*) untuk beberapa saat agar membeku lalu dipindahkan ke dalam air sampai parafin membeku sempurna. Jika parafin telah membeku sempurna, parafin dikeluarkan dari pagoda dengan cara mengungkit salah satu sisi pagoda dengan pisau. Potongan parafin yang membungkus jaringan dilakukan trimming.

sampai membentuk kotak lalu ditempelkan pada balok kayu yang telah disediakan.

Tahapan selanjutnya *sectioning* yaitu blok parafin dipasang pada mikrotom dan diatur agar posisinya sejajar dengan posisi pisau. Blok parafin dipotong dengan ketebalan 4  $\mu\text{m}$ . Pada awal pemotongan dilakukan *trimming* karena jaringan yang terpotong masih belum sempurna. Setelah didapatkan hasil sayatan yang terbaik, hasilnya diambil dengan kertas yang basah pada bagian ujung lalu diapungkan diatas air dingin. Jika hasil potongan membentuk pita maka jaringan dipisahkan dengan jarum satu persatu. Potongan jaringan yang telah terpisah ditempatkan pada air hangat dengan suhu 37<sup>0</sup>C untuk menghilangkan kerutan, lalu ditempatkan pada gelas objek. Sediaan pada gelas objek lalu dilihat di bawah mikroskop untuk melihat ada tidaknya luka pisau dan ketebalan potongan, jika belum maka dicari potongan lain.

Gelas objek dengan sediaan jaringan terpilih diberi label sesuai dengan perlakuan dan dikeringkan. Sediaan disimpan pada inkubator dengan suhu 37<sup>0</sup>C selama semalam lalu diwarnai dengan pewarnaan HE. Larutan pewarna *hematoxylin* ini lebih dikenal sebagai zat mordan sedangkan larutan *eosin* dibuat dengan melarutkan zat warna *eosin* dalam aquades dan alkohol. Secara sifat larutan *hematoxylin* bersifat basa sedangkan larutan *eosin* bersifat asam sehingga sifat basa pada larutan *hematoxylin* akan memungkinkan *hematoxylin* berikatan terutama dengan komponen sel yang bersifat asam sementara itu *eosin* akan mengikat komponen sel yang bersifat asam. Pengamatan dilakukan secara kualitatif menggunakan mikroskop Olympus BX51 dengan perbesaran 100x



**Lampiran 7.** Langkah-langkah Uji Pewarnaan Imunohistokimia

## Preparat Sendi Kaki

- 1) Dicuci PBS pH 7,4 selama 1X5 menit
- 2) Ditetesi 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit
- 3) Dicuci PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
- 4) Diblok 5% FBS (*Fetal Bovine Serum*) selama 1 jam
- 5) Dicuci PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
- 6) Diinkubasi dengan antibodi sekunder selama 1 jam dengan suhu ruang
- 7) Dicuci PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
- 8) Ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radin Peroxidase*) selama 40 menit
- 9) Dicuci PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
- 10) Ditetesi dengan DAB (*Diamano Benzidine*) selama 10 menit
- 11) Dicuci PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
- 12) *Counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 10 menit
- 13) Dicuci dengan air mengalir
- 14) Dibilas dengan aquades dan dikeringkan
- 15) Di *mounting* dengan *entellan* dan ditutup dengan cover glass

## HASIL

### Lampiran 8. Uji Statistika Ekspresi TNF- $\alpha$

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	tikus	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ekspresi_tnf	kontrol	.131	5	.200*	.994	5	.992
	400	.171	5	.200*	.962	5	.824
	800	.166	5	.200*	.989	5	.977
	1600	.227	5	.200*	.914	5	.490

a. Lilliefors Significance Correction

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

#### Test of Homogeneity of Variances

ekspresi\_tnf

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.115	3	16	.950

#### ANOVA

ekspresi_tnf	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	841.420	3	280.473	8.323E4	.000
Within Groups	.054	16	.003		
Total	841.474	19			

## POST-HOC

### Multiple Comparisons

ekspresi\_tnf

Tukey HSD

(I) tikus	(J) tikus	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	400	2.99800*	.03672	.000	2.8930	3.1030
	800	13.02200*	.03672	.000	12.9170	13.1270
	1600	15.35800*	.03672	.000	15.2530	15.4630
400	kontrol	-2.99800*	.03672	.000	-3.1030	-2.8930
	800	10.02400*	.03672	.000	9.9190	10.1290
	1600	12.36000*	.03672	.000	12.2550	12.4650
800	kontrol	-13.02200*	.03672	.000	-13.1270	-12.9170
	400	-10.02400*	.03672	.000	-10.1290	-9.9190
	1600	2.33600*	.03672	.000	2.2310	2.4410
1600	kontrol	-15.35800*	.03672	.000	-15.4630	-15.2530
	400	-12.36000*	.03672	.000	-12.4650	-12.2550
	800	-2.33600*	.03672	.000	-2.4410	-2.2310

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## Homogeneous Subsets

ekspresi\_tnf

Tukey HSD

tikus	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1600	5	1.7540			
800	5		4.0900		
400	5			14.1140	
kontrol	5				17.1120
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



**Lampiran 9.** Uji Statistika Kepadatan Trabekula *Os Femur*

**Tests of Normality**

tikus		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
tebal	kontrol	.179	5	.200 <sup>*</sup>	.962	5	.823
	400	.199	5	.200 <sup>*</sup>	.967	5	.858
	800	.180	5	.200 <sup>*</sup>	.952	5	.754
	1600	.141	5	.200 <sup>*</sup>	.979	5	.928

a. Lilliefors Significance Correction

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

**Test of Homogeneity of Variances**

tebal

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.901	3	16	.463

**ANOVA**

tebal					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.148	3	.049	74.694	.000
Within Groups	.011	16	.001		
Total	.158	19			



**Multiple Comparisons**

tebal

Tukey HSD

(I) tikus	(J) tikus	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	400	-.09400*	.01625	.000	-.1405	-.0475
	800	-.18800*	.01625	.000	-.2345	-.1415
	1600	-.22000*	.01625	.000	-.2665	-.1735
400	kontrol	.09400*	.01625	.000	.0475	.1405
	800	-.09400*	.01625	.000	-.1405	-.0475
	1600	-.12600*	.01625	.000	-.1725	-.0795
800	kontrol	.18800*	.01625	.000	.1415	.2345
	400	.09400*	.01625	.000	.0475	.1405
	1600	-.03200	.01625	.240	-.0785	.0145
1600	kontrol	.22000*	.01625	.000	.1735	.2665
	400	.12600*	.01625	.000	.0795	.1725
	800	.03200	.01625	.240	-.0145	.0785

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**tebal**

Tukey HSD

tikus	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
kontrol	5	.7480		
400	5		.8420	
800	5			.9360
1600	5			.9680
Sig.		1.000	1.000	.240

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

