

**ANALISIS KADAR KALSIUM DALAM DARAH
TIKUS BETINA (*Rattusnovergicus*) OVARIKTOMI
YANG DIBERI SARI KEDELAI YANG DIFORTIFIKASI
DENGAN KALSIUM DARI CANGKANG TELUR AYAM RAS
SECARA SPEKTROSKOPI SERAPAN ATOM**

**NURHIDAYAH
N111 09 005**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

**ANALISIS KADAR KALSIMUM DALAM DARAH
TIKUS BETINA (*Rattusnovergicus*) OVARIEKTOMI
YANG DIBERI SARI KEDELAI YANG DIFORTIFIKASI
DENGAN KALSIMUM DARI CANGKANG TELUR AYAM RAS
SECARASPEKTROSKOPI SERAPAN ATOM**

SKRIPSI

**untukmelengkapitugas-tugasdanmemenuhi
syarat-syaratuntukmencapaigelarsarjana**



**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

PERSETUJUAN

ANALISIS KADAR KALSIUM DALAM DARAH
TIKUS BETINA (*Rattusnovergicus*) OVARIEKTOMI
YANG DIBERI SARI KEDELAI YANG DIFORTIFIKASI
DENGAN KALSIUM DARI CANGKANG TELUR AYAM RAS
SECARA SPEKTROSKOPI SERAPAN ATOM

NURHIDAYAH

N111 09 005



PembimbingUtama

PembimbingPertama,

Prof. Dr. Hj. Asnah Marzuki, M.Si., Apt.
NIP. 19491018 198003 2 001

Yusnita Rifai, M. Pharm., Ph.D., Apt
NIP. 19751117 200012 2 001

Pada tanggal, 26Juli2013

PENGESAHAN

ANALISIS KADAR KALSIUM DALAM DARAH
TIKUS BETINA (*Rattus novergicus*) OVARIEKTOMI
YANG DIBERI SARI KEDELAI YANG DIFORTIFIKASI
DENGAN KALSIUM DARI CANGKANG TELUR AYAM RAS
SECARA SPEKTROSKOPI SERAPAN ATOM

Oleh :
NURHIDAYAH
N111 09005

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
Pada Tanggal 26 Juli 2013

Panitia Penguji Skripsi

1. Ketua

Dr. Hj. Sartini, M.Si., Apt.

.....

2. Sekretaris

Usmar, S.Si. M.Si., Apt

.....

3. Ex Officio

Prof. Dr. Asnah Marzuki, M.Si., Apt.

.....

4. Ex Officio

Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt.

.....

5. Anggota

Nurhasni Hasan, S.Si., M.Si., Apt.

.....

Mengetahui :
Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin

Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt.
NIP. 19560114 198601 2 001

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari terbukti bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, Juli 2013

Penyusun,

Nurhidayah

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur dipanjatkan kepada Allah swt, atas berkat dan rahmatNya, penulis mampu merampungkan penyusunan skripsi ini sebagai salah satu syarat dalam memperoleh gelar kesarjanaan pada Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Banyak kendala yang penulis hadapi dalam penyusunan skripsi ini, namun berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, akhirnya penulis dapat melewati kendala-kendala tersebut. Oleh karena itu, penulis menghaturkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Kedua orang tua tercinta, ayahanda Saleni dan ibunda Hj. Sanawiah atas segala pengorbanan materi, kasih sayang, ketulusan hati mendoakan sehingga penulis bisa menyelesaikan kuliah sampai saat ini.
2. Ibu Prof. Dr. Hj. Asnah Marzuki, M.Si., Apt. sebagai pembimbing utama yang telah memberikan arahan, dan nasihat, dan keramahan serta dorongan agar penulis segera menyelesaikan studi, serta Ibu Yusnita Rifai. S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt. sebagai pembimbing pertama yang telah memberikan bimbingan, arahan, motivasi, dan memberikan solusi-solusi dengan penuh kesabaran hingga penelitian dan skripsi penulis selesai. Penulis menyadari skripsi dan penelitian ini mungkin tidak akan selesai dengan cepat jika beliau tidak henti-hentinya mengingatkan penulis untuk cepat menyelesaikan studi.

3. Dekan, Wakil Dekan, serta staf dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas bantuan serta motivasi-motivasi yang diberikan.
4. Saudara-saudara penulis (Rosdiana, Edi, Maswadi, Seni, Zainal Abidin), atas dukungannya dan kasih sayang kalian selama ini. Semoga kita senantiasa menjadi anak yang berbakti, memberikan yang terbaik untuk orang tua kita.
5. Teman-teman farmasi angkatan 2009 (Ginkgo'09) untuk beberapa tahun yang sangat menyenangkan.
6. Kepada teman-teman seperjuangan dalam penelitian Cangkang telur (Ermawati, Dahlia, Nur Ariany, dan Andi Reskiany Beta), merupakan perjuangan yang berat namun menyenangkan bagi kita. Terima kasih telah memberikan dorongan tanpa henti agar penulis secepatnya "mengejar" ketertinggalan dan cepat menyusul teman-teman agar dapat menyelesaikan studi bersama-sama dan tepat waktu.
7. Kepada kanda Ismail, S.Si., Apt, dan Muhammad Nur Amir, S.Si., Apt yang telah memberi motivasi, saran-saran, nasihat, arahan, dan memberikan inspirasi bagi penulis yang masih diingat hingga detik ini.
8. Laboran dan kru Laboratorium Biofarmasi terima kasih telah memberi bantuan atas segala kesulitan yang dihadapi penulis mulai dari awal hingga akhir penelitian.
9. Kepada pihak yang tidak sempat disebut namanya. Semoga Allah membalas semua kebaikan kalian selama ini.

Penulis menyadari bahwa karya tulis ini sangat jauh dari kesempurnaan, karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun demi terciptanya suatu karya yang lebih bermutu. Akhirnya, semoga karya kecil ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan ke depannya.

Makassar, Juli 2013

Penulis

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian analisis kadar kalsium dalam darah tikus betina (*Rattus norvegicus*) ovariektomi yang diberi sari kedelai yang difortifikasi dengan kalsium cangkang telur ayam ras secara Spektroskopi Serapan Atom (SSA). Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis seberapa besar kadar kalsium dalam darah tikus betina (*Rattus norvegicus*) sehingga dapat digunakan dalam pengobatan osteoporosis. Cangkang telur sebagai sumber kalsium dikalsinasi sehingga diperoleh serbuk kalsium oksid. Kedelai merupakan tanaman fitoestrogen yang mengandung isoflavon cukup tinggi. Penelitian ini menggunakan 15 ekor tikus betina galur *wistar* umur 30 hari yang dibagi menjadi 5 grup dengan 3 kali ulangan. Kelompok hewan coba di adaptasikan dalam kandang selama 10 hari. Tikus dibagi menjadi lima grup yaitu kelompok hewan coba normal tanpa ovariektomi (NOV), kelompok kedua hewan coba kontrol ovariektomi tanpa perlakuan (OV-1), kelompok ketiga hewan coba ovariektomi dengan pemberian ekstrak sari kedelai (OV-2), kelompok keempat hewan coba ovariektomi dengan pemberian kalsium cangkang telur (OV-3), dan kelompok terakhir hewan coba ovariektomi dengan pemberian kalsium cangkang telur yang difortifikasi dengan ekstrak sari kedelai. Dosis sari kedelai adalah 100 mg/kg BB/hari, sedangkan dosis dari kalsium cangkang telur 108 mg/kg BB/hari. Pengambilan darah dilakukan setiap 30 hari selama 2 bulan. Dari hasil pengukuran kelompok OV-1 menunjukkan penurunan sebesar -0,54%, dibandingkan dengan kontrol NOV yang cenderung konstan dari bulan kesatu ke bulan kedua. Peningkatan kadar kalsium darah tertinggi selama masa pemberian terlihat pada kelompok OV-3 sebesar 2,20% yang diikuti OV-2 dan OV-4 masing-masing 1,02% dan 0,55%.

ABSTRACT

A research on analysis of calcium levels in the blood of female rats (*Rattus norvegicus*) given ovariectomy soymilk fortified with calcium shell eggs in Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) has been done. This study was aimed to determine how much calcium levels in the blood of female rats (*Rattus norvegicus*) that could be used in the treatment of osteoporosis. Eggshell as a calcium source was calcined in order to obtain calcium oxide powders. Soy was a plant that contains isoflavone phytoestrogens is high enough. This study used 15 female wistar rats aged 20 days which were divided into 5 groups with 3 replications. Studies in rats adapted in a cage for 10 days. OV rats were divided into five groups, namely normal group without ovariectomy (NOV), a second group of ovariectomized control rats without treatment (OV1), the third group of ovariectomized rats by administration of soya extract (OV-2), the fourth group of ovariectomized mice with eggshell calcium (OV-3), and the last group of ovariectomized rats by administration of eggshell calcium fortified soy extracts. Soya dose was 100 mg / kg bw / day, while the dose of egg shell calcium was 108 mg / kg / day. Blood sampling was performed every 30 days for 2 months. From the measurement results(OV-1) group showed a decrease by -0.54%, compared with the controls NOV unity remained constant from first month to second month. The highest blood calcium levels during the administration was showed OV-3 group with 2.20% followed OV-2 and OV-4 respectively with 1.02% and 0.55%.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
II.1 Kalsium	5
II.1.1 Fungsi Kalsium Dalam Tubuh	5
II.2 Estrogen	8
II.2 Jenis-jenis Estrogen	9
II.2 Kedelai	11
II.3.1 Klasifikasi Tanaman	11
II.3.2 Nama Daerah	11
II.3.3 Kandungan Kimia Kacang Kedelai	11

II.3.4 Khasiat dan Kegunaan	12
II.4 Cangkang Telur	13
II.5 Peran Kalsium dan Estrogen Dalam Proses Metabolisme	15
II.6 Hewan Coba	17
II.7 Ovariectomi	18
II.8 Instrumentasi SSA	20
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	25
III.1 Penyiapan Alat dan Bahan	25
III.2 Metode Kerja	25
III.2.1. Kalsinasi Kalsium Limbah Cangkang Telur	25
III.2.2 Pembuatan Sari Kedelai	26
III.2.3 Penyiapan Larutan Sampel	26
III.2.3.1 Penyiapan Larutan Kalsium	26
III.2.3.2 Penyiapan Larutan Sari Kedelai	26
III.2.3.3 Penyiapan Larutan Sari Kedelai yang Difortifikasi .Kalsium	26
III.2.4 Pemilihan dan Penyiapan Hewan Uji	26
III.2.5 Perlakuan Terhadap Hewan Uji	27
III.2.5.1 Metode Ovariectomi	27
III.2.5.2 Pengelompokan Hewan Uji	27
III.2.6 Pengambilan Darah dan Pengumpulan Serum	28
III.2.7 Penyiapan Larutan Standar	29
III.2.8 Penyiapan Serum Tikus	29
III.3 Pengukuran	29

III.4 Pengumpulan dan Analisis Data	29
III.5 Pembahasan	29
III.6 Pengambilan Kesimpulan	30
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	31
IV.1 Hasil Penelitian	31
IV.2 Pembahasan	32
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	36
V.1 Kesimpulan	36
V.2 Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	42

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Kadar Kalsium Serum Tikus Putih (<i>Rattus novergicus</i>)	31
2. Konsentrasi dan Absorbansi Standar	53
3. Absorbansi Standar	54

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Skema Peranan Kalsium Dalam Penggumpalan Darah	7
2. Struktur Kerabang Telur	14
3. Skema Spektrometer Serapan Atom	24
4. Perbandingan Konsentrasi Kalsium Serum Tiap Kelompok Perlakuan	31
5. Kacang Kedelai	46
6. Sari Kedelai Kering Hasil Sublimasi di <i>Freeze Dryer</i>	46
7. Cangkang Telur	47
8. Serbuk Kalsium Oksida Hasil Kalsinasi	47
9. Tikus Putih (<i>Rattus novergicus</i>)	48
10. Proses Ovariektomi	48
11. Perlakuan Peroral	49
12. Proses Pengambilan Darah	50
13. Proses Analisis	50
14. Serum	51
15. Deret Larutan Standar	51
16. Sampel yang Siap Dianalisis	51
17. <i>Freeze dryer</i>	52
18. Alat Pentanur	52
19. Rangkaian Alat Spektrofotometer Serapan Atom	52
20. Persamaan Garis dan Nilai R^2 Kurva Standar	53

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema Pembuatan Sari Kedelai (<i>Glycine max L.Merr</i>)	42
2. Kalsinasi Limbah Cangkang Telur	43
3. Skema Pengujian Pada Hewan Coba	44
4. Penyiapan Larutan Standar	45
5. Absorbansi Standar, Kurva Standar dan Absorbansi Sampel	53
6. Contoh Perhitungan Kadar dan Persentase Perubahan Kadar ..	56

BAB I

PENDAHULUAN

Dawson and Hughes (1996) dalam penelitiannya menyatakan dengan hilangnya estrogen karena menopause, wanita juga akan kehilangan mineral. Kehilangan mineral tersebut dapat mencapai 3% per tahun selama lima tahun pertama dan sekitar 1% pertahun pada tahun-tahun berikutnya. Pada masa yang akan datang, usia harapan hidup di menjadi masalah Indonesia terus meningkat sehingga osteoporosis sangat mungkin kesehatan di masyarakat, di samping penyakit jantung koroner dan kanker (1).

Osteoporosis yang berlangsung pada wanita menopause disebabkan karena tidak diproduksi lagi hormon estrogen oleh ovarium. Diperkirakan 40% wanita dan 13% pria pada usia 50 tahun keatas menderita osteoporosis dan memiliki resiko tinggi kejadian patah tulang (2).

Kalsium yang beredar dalam darah akan menyuplai kebutuhan kalsium bagi sel tubuh. Jumlah kalsium dalam tubuh sangat tergantung pada banyaknya kalsium yang diserap dari makanan (3). Namun demikian kandungan kalsium dalam darah terdapat dalam batas tertentu. Apabila kandungan kalsium dalam darah lebih kecil atau lebih besar dari batas normal, maka metabolisme akan terganggu (4). Sedangkan kelebihan kalsium dapat menyebabkan batu ginjal atau gangguan ginjal dan menyebabkan konstipasi (susah buang air besar) (5).

Kedelai merupakan salah satu jenis kacang-kacangan yang kaya akan kalsium dan merupakan salah satu tanaman fitoestrogen yang berkhasiat sebagai estrogen alami yang relatif aman dikonsumsi dalam jangka waktu yang lama (6). kedelai dapat diolah menjadi susu kedelai yang memiliki keunggulan tidak mengandung kolesterol, rendah lemak serta bergizi tinggi. Untuk lebih meningkatkan asupan kalsium maka perlu difortifikasi dengan cangkang telur ayam ras (7).

Kerabang telur atau dikenal masyarakat umum sebagai cangkang telur dapat digunakan sebagai sumber kalsium (8). Berdasarkan beberapa hasil penelitian sebelumnya diperoleh kadar kalsium sebesar $15,36 \pm 0,30$ g/100g pada kulit telur ayam ras, $14,51 \pm 0,18$ g/100g pada kulit telur ayam nonras, $16,72 \pm 0,26$ g/100g pada kulit telur itik. Berdasarkan hasil penelitian, serbuk kulit telur ayam mengandung kalsium sebesar $401 \pm 7,2$ gram atau sekitar 39% kalsium, dalam bentuk kalsium karbonat. (9).

Binatang percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Tikus putih betina (*Rattus norvegicus*). Tikus putih adalah tikus laboratorium yang lebih cepat dewasa dibandingkan dengan tikus liar. Hewan ini lebih besar dari pada mencit (*Mus musculus*) maka untuk beberapa percobaan tikus besar ini lebih menguntungkan (12).

Operasi ovariektomi merupakan salah satu rangkaian dari penelitian *invivo* yang menggunakan hewan uji, dimana hewan uji berupa tikus betina diambil ovariumnya agar mengalami defisiensi estrogen. Hewan yang diovariektomi digunakan sebagai model untuk kondisi

menopause dimana kondisi hormon estrogen dalam tubuh sudah sangat menurun dibandingkan kondisi normalnya. Senyawa yang diberikan dalam uji dengan tikus yang terovariektomi ini salah satunya adalah senyawa yang bersifat estrogenik, sehingga kedepannya dapat digunakan sebagai bahan alam yang berguna untuk terapi penggantian estrogen (10).

Pengukuran kadar kalsium dalam plasma darah dapat dilakukan dengan metode spektroskopi serapan atom berdasarkan pada prinsip absorpsi cahaya oleh atom. Atom-atom akan menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu, tergantung pada sifat unsurnya (11).

Berdasarkan latar belakang di atas maka dapat dirumuskan permasalahan yaitu seberapa besar pengaruh pemerian ekstrak sari kedelai dan kalsium dari cangkang telur serta sari kedelai yang difortifikasi dengan kalsium dari cangkang telur dalam meningkatkan kadar kalsium darah tikus betina (*Rattus norvegicus*) ovariektomi yang dikondisikan menopause yang diukur kadarnya menggunakan Spektroskopi Serapan Atom (SSA).

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk menganalisis seberapa besar kadar kalsium dalam darah tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang diberi sari kedelai yang difortifikasi kalsium cangkang telur ayam ras sehingga dapat digunakan dalam pengobatan penyakit osteoporosis. Oleh karena itu dilakukan penelitian analisis kadar kalsium dalam darah tikus betina (*Rattus novergicus*) ovariektomi yang diberi sari kedelai yang difortifikasi

dengan kalsium dari cangkang telur ayam ras menggunakan metode Spektroskopi Serapan Atom (SSA).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Kalsium

Kalsium berasal dari bahasa Latin *calcium* adalah unsur dasar kapur dan memiliki simbol Ca. Kalsium adalah mineral yang amat penting bagi manusia, antara lain bagi metabolisme tubuh, penghubung antar syaraf, kerja jantung, dan pergerakan otot (12). Sedangkan menurut Mahan Kathlen (2000) kalsium adalah mineral yang sangat penting dalam tubuh, terbentuk dari 1,5 sampai 2 % dari berat badan dan 39 % dari total mineral tubuh. Diperkirakan 99 % dari kalsium terdapat pada tulang dan gigi. Kalsium tulang berada dalam keadaan seimbang dengan kalsium plasma pada konsentrasi kurang lebih 2,25 – 2,60 mmol/l (40,5-46,8 mg/dl) (13).

II.1.1 Fungsi Kalsium Dalam Tubuh (14)

a. Pembentukan Tulang.

Kalsium di dalam tulang mempunyai dua fungsi: a). sebagai bagian integral dari struktur tulang; b). sebagai tempat penyimpanan kalsium. Pada tahap pertumbuhan janin dibentuk matriks sebagai cikal bakal tulang tubuh. Bentuknya sama dengan tulang tetapi masih lunak dan lentur hingga setelah lahir. Matriks yang merupakan sepertiga bagian dari tulang terdiri atas serabut yang terbuat dari protein kolagen yang diselubungi oleh bahan gelatin. Segera setelah lahir, matriks mulai menguat melalui proses kalsifikasi, yaitu terbentuknya kristal mineral.

Kristal ini terdiri dari kalsium fosfat atau kombinasi kalsium fosfat dan kalsium hidroksida yang dinamakan hidroksiapatit ($3\text{Ca}(\text{PO}_4)_2, \text{Ca}(\text{OH})_2$). Karena kalsium dan fosfor merupakan mineral utama dalam ikatan ini, keduanya harus berada dalam jumlah yang cukup di dalam cairan yang mengelilingi matriks tulang. Batang tulang yang merupakan bagian keras matriks, mengandung kalsium, fosfor, magnesium, seng, magnesium, natrium karbonat, dan flour di samping hidroksiapatit.

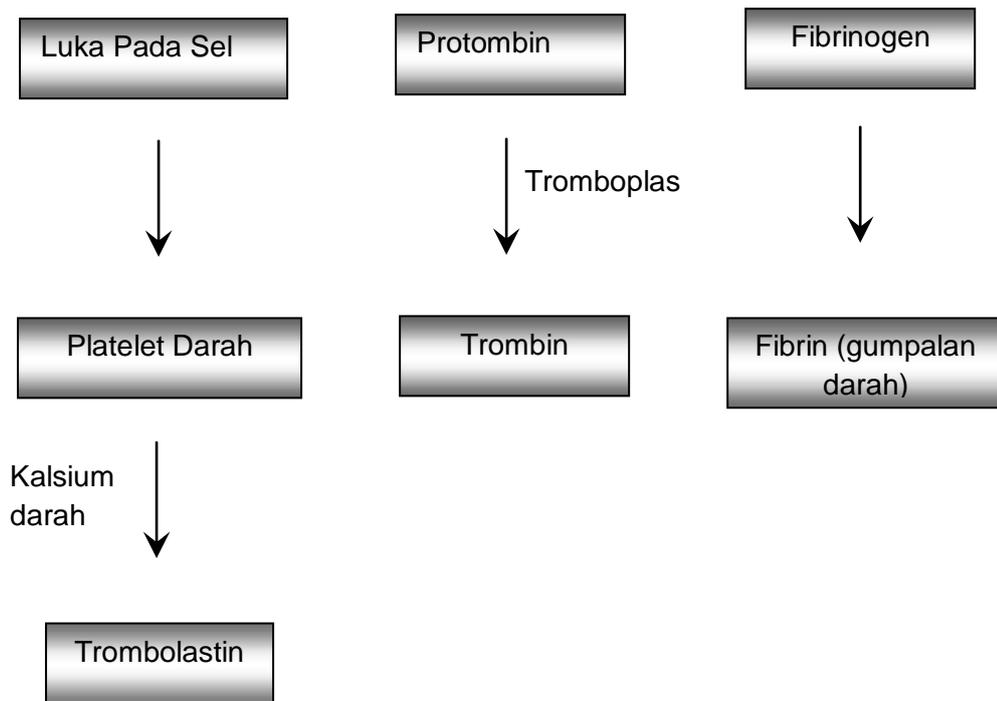
b. Pembentukan gigi.

Mineral yang membentuk dentin dan email yang merupakan bagian tengah dan luar dari gigi adalah mineral yang sama dengan yang membentuk tulang. Akan tetapi kristal dalam gigi lebih padat dan kadar airnya lebih rendah. Protein dalam email gigi adalah keratin, sedangkan dalam dentin adalah kolagen. Berbeda dengan tulang, gigi sedikit sekali mengalami perubahan setelah muncul dalam rongga mulut. Pertukaran antara kalsium gigi dan kalsium tubuh berlangsung lambat dan terbatas pada kalsium yang terdapat didalam lapisan dentin. Sedikit pertukaran kalsium mungkin juga terjadi di antara lapisan email dan ludah.

c. Mengatur pembekuan darah.

Bila terjadi luka, ion kalsium didalam darah merangsang pembebasan fosfolipida tromboplastin dari platelet darah yang terluka. Tromboplastin ini mengkatalisis perubahan protrombin, bagian darah

normal, menjadi trombin. Trombin kemudian membantu perubahan fibrinogen, bagian lain dari darah, menjadi fibrin yang merupakan gumpalan darah.



Gambar 1. Skema Peranan kalsium dalam penggumpalan darah Sumber : Almatsier (2003)

d. Katalisator Reaksi-reaksi biologik.

Kalsium berfungsi sebagai katalisator berbagai reaksi biologik, seperti absorpsi vitamin B12 tindakan enzim pemecah lemak, lipase pankreas, eksresi insulin oleh pankreas, pembentukan dan pemecahan asetilkolin, yaitu bahan yang diperlukan dalam memindahkan (transmisi) suatu rangsangan dari suatu serabut saraf ke serabut saraf lainnya. Kalsium yang diperlukan untuk mengkatalisis reaksi-reaksi ini diambil dari persediaan kalsium dalam tubuh.

e. Kontraksi Otot.

Pada waktu otot berkontraksi, kalsium berperan dalam interaksi protein di dalam otot, yaitu aktin dan miosin. Bila darah kalsium kurang dari normal, otot tidak bisa mengendor sesudah kontraksi. Tubuh akan kaku dan dapat menimbulkan kejang. Fungsi kalsium lainnya adalah meningkatkan fungsi transport membran sel, kemungkinan dengan bertindak sebagai stabilisator membran, dan transmisi ion melalui membran organel sel.

Kalsium dalam plasma terdapat dalam 3 bentuk yaitu kalsium yang terionisasi (50%), kalsium yang terikat oleh protein (40%), dan kalsium yang berikatan dengan ion organik atau kompleks (15).

Kalsium yang terionisasi (Ca^{2+}) merupakan bentuk aktif. kalsium terikat protein (albumin) merupakan sumber penting untuk penyediaan Ca^{2+} siap pakai. Sehingga kadar albumin dalam plasma mempengaruhi kadar kalsium total dalam plasma. Setiap penurunan 1 mg/dl albumin akan mengakibatkan penurunan kalsium total sebesar 0,8 mg/dl. Kalsium yang diperlukan untuk proses biologis adalah kalsium dalam bentuk ion bebas (15,16).

II.2 Estrogen

Estrogen merupakan inhibitor resorpsi kalsium di tulang yang potensial karena keberadaannya dapat menunjang sekresi dan meningkatkan produksi kalsitonin serta menurunkan sekresi hormon paratiroid. Estrogen juga dapat meningkatkan kadar 1,25

dihidroksikalsiferol sehingga akan meningkatkan penyerapan kalsium di dalam usus. Penurunan produksi estrogen juga menggagalkan osteoblas mendeposit jaringan matriks (osteoid) (47). Estrogen bertanggung jawab pada fase pertumbuhan dan menutup perkembangan epifisis pada tulang panjang masa pubertas (48). 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 α lebih lanjut. Estrogen juga merangsang ekspresi dari osteoprotegerin (OPG) dan *transforming growth factor- β* (TGF- β) oleh sel osteoblas dan sel stroma, sehingga estrogen berfungsi menghambat penyerapan tulang dengan cara mempercepat atau merangsang apoptosis sel osteoklas (49).

II.2.1 Jenis-Jenis Estrogen

Jenis-jenis estrogen yang terdapat secara alami dalam tubuh wanita adalah estradiol, estriol, dan estron. Di dalam tubuh tiga jenis estrogen tersebut dibuat dari androgen dengan bantuan enzim. Estradiol dibuat dari testosteron, sedangkan estron dibuat dari androstenadion. Estron bersifat lebih lemah dari pada estradiol, dan pada wanita pasca menopause, estron ditemukan lebih banyak daripada estradiol. Berbagai zat alami maupun buatan telah ditemukan memiliki aktivitas bersifat mirip estrogen (17).

Fitoestrogen merupakan komposisi alami yang ditemukan di tumbuhan yang memiliki banyak kesamaan dengan estradiol, bentuk alami

estrogen yang paling poten. Tapi fitoestrogen memiliki efek keamanan yang lebih baik dibandingkan estrogen. Zat ini terdapat di tubuh tapi bisa diolah dan dibuang dengan mudah dari dalam tubuh. Fitoestrogen mempunyai efek fisiologis pada manusia, merupakan senyawa tumbuhan yang mempunyai aktifitas biologis seperti estrogen dan sifat ikatan estrogen yang lemah. Studi epidemiologi menyarankan untuk mengkonsumsi diet kaya fitoestrogen, seperti yang dilakukan pada masyarakat tradisional asia, yang dikaitkan dengan resiko terkena kanker payudara yang rendah (dipiro) (17).

Pada tanaman dikenal ada beberapa kelompok fitoestrogen yakni; isoflavon, lignan, kumestan, triterpen glikosida, dan senyawa lain yang berefek estrogenik, seperti *flavones*, *chalconcs*, *diterpenoids*, *triterpenoids*, *coumarins*, dan *danacyclics*. Isoflavon banyak dijumpai pada buah-buahan, teh hijau, kacang kedelai, dan produk-produk kedelai lainnya seperti tempe, tahu, dan tauco (soy products). Lignan lebih banyak dijumpai pada biji-bijian gandum maupun wijen. Sementara kumestan banyak terdapat pada kacang-kacangan, biji bunga matahari. Sedangkan triterpen glikosida banyak terkandung pada tanaman *Cimifuga racemosa* (17).

Di antara kelompok fitoesterogen tersebut, menunjukkan isoflavon adalah yang terbaik. Sebagai fitoestrogen, isoflavon kedelai memiliki dua efek penting. Pertama, saat kadar estrogen tinggi, fitoestrogen bisa menghentikan bentuk estrogen yang lebih poten diproduksi oleh tubuh

dan bisa membantu mencegah penyakit yang diikendarai oleh hormon, seperti kanker payudara. Kedua, saat kadar estrogen rendah, seperti pada keadaan setelah menopause, fitoestrogen bisa menggantikan estrogen tubuh itu sendiri, sehingga bisa mengurangi hot flashes dan melindungi tulang (17).

II.3 Kedelai

II.3.1 Klasifikasi Tanaman

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Filum : Angiospermaae
Kelas : Dicotyledoneae
Ordo : Polypetalae
Famili : Leguminosae
Genus : *Glycine*
Spesies : *Glycine max* (L) Merr

II.3.2 Nama Daerah

Tanaman kedelai (*Glycine max* (L.) Merr) dikenal dengan berbagai nama daerah yaitu sojaboom, soja bohne, soybean, kedele, kacang gimbol, kacang ramang, retak mejok, kaceng bulu, kacang jepun, dekeman, dekenana, demekun, dele, kadele, kadang jepun, lebu bawak, lawui, sarupapa titak, dole, kadule, puwe mon, dan gadelei (18).

II.3.3 Kandungan Kimia Kacang Kedelai

Kedelai mengandung dua tipe fitoestrogen, yaitu isoflavon termasuk genistein, daidzein dan derivatnya, ononin, isoformononetin, dan komestan seperti komestrol. Terdapat kandungan minyak yang komponen utamanya adalah linoleat dan asam linoleat, dan fitoesterol yang mengandung β -sitosterol dan stigmasterol (19).

II.3.4 Khasiat dan Kegunaan

Isoflavon dan komestan yang merupakan fitoestrogenik, sekarang digunakan sebagai terapi pengganti hormon dari bentuk natural. Inklusi diet makanan kacang kedelai menghasilkan penurunan dalam beberapa faktor risiko klinis osteoporosis dan penyakit kardiovaskular pada wanita menopause, dan perbaikan profil lipid (19). Manfaat kesehatan utama yang terkait dengan konsumsi kacang kedelai yaitu pencegahan osteoporosis dan penyakit kardiovaskular, pengaturan metabolisme lipid, dan promosi koagulasi darah. Kacang kedelai telah menunjukkan efek hipokolestolemik, antiaterogenik, antikarsinogenik, dan antialergenik (20).

Kandungan isoflavon pada kedelai berkisar 2-4 mg/g kedelai. Senyawa isoflavon tersebut pada umumnya berupa senyawa kompleks atau konjugasi dengan senyawa ikatan glukosa. Selama proses pengolahan, baik melalui proses fermentasi maupun proses non-fermentasi, senyawa isoflavon dapat mengalami transformasi, terutama melalui proses hidrolisa, sehingga dapat diperoleh senyawa senyawa isoflavon bebas yang disebut aglikon (21).

Isoflavon memiliki kemiripan struktur kimia dengan estrogen pada mamalia. Cincin fenolat pada isoflavon merupakan struktur penting pada kebanyakan komponen isoflavon yang berfungsi untuk berikatan dengan reseptor estrogen. Isoflavon mampu berikatan dengan Reseptor Estrogen (RE), dengan sifatnya yang agonis ataupun antagonis. Isoflavon sebagai senyawa *estrogen like*, mengawali kerjanya dengan cara meniru cara kerja estrogen (22).

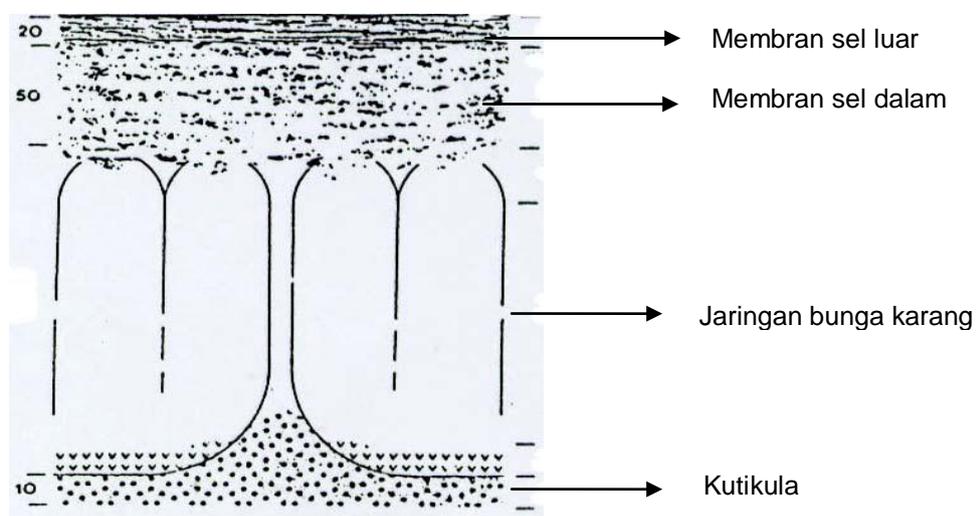
Penurunan kepadatan tulang pada wanita pascamenopause terjadi karena indung telur mengalami penurunan dalam produksi hormon estrogen. Penurunan produksi hormon estrogen akan diikuti dengan meningkatnya kalsium yang terbuang dari tubuh seorang wanita (33). Hal ini secara berangsur akan menyebabkan penurunan kepadatan tulang atau terjadi pengurangan dalam massa jaringan tulang per unit volum (g/cm^2), sehingga tulang menjadi tipis, lebih rapuh dan mengandung sedikit kalsium atau tulang semakin keropos. Proses pengeroposan tulang ini disebut osteoporosis (34). Penurunan kepadatan tulang dengan risiko osteoporosis pada wanita meningkat secara nyata di usia 50 tahun yaitu sekitar usia menopause (35).

II.4 Cangkang Telur

Kerabang telur mengandung 1,6% air dan 98,4% bahan kering. Bahan kering ini terdiri dari 3,3% protein, 0,03% lemak dan 95,10% mineral. Jumlah mineral dalam kerabang telur beratnya 2,25 gram yang

terdiri dari 2,21 gram kalsium, 0,02 gram fosfor, 0,02 gram magnesium serta sedikit besi dan sulfur (23).

Struktur dari kerabang telur sangat unik karena bersifat *porous* (menyerap) yaitu sebagai tempat difusi dari oksigen dan karbon dioksida tetapi juga sebagai penghambat pertumbuhan bakteri dan benda asing lain yang akan masuk ke dalam bagian dalam telur (24). Struktur kerabang telur secara mikroskopis dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur Kerabang Telur (Kaplan dan Siegesmund, 1973).

Gambar 2 menjelaskan lapisan-lapisan yang ada pada kerabang telur. Lapisan-lapisan yang menyusun kerabang telur terdiri atas kutikula, jaringan bunga karang (spons), jaringan mamilari dan membran kerabang telur (24). Lapisan paling luar dari kerabang telur adalah membran kerabang telur yang terdiri atas bagian luar dan dalam, bagian dalam dari kerabang telur berbatasan dengan jaringan bunga karang (25). Daengprok *et al.* (2003) menjelaskan bahwa kalsium dari kerabang telur merupakan suplemen yang sempurna untuk bahan pangan. Kalsium dari kerabang

telur berfungsi meningkatkan densitas mineral dalam tulang untuk penderita osteoporosis (26).

Penyerapan kalsium dari CaCO_3 sangat bervariasi tergantung umur dan kondisi badan. Penyerapan kalsium pada waktu anak-anak dan masa pertumbuhan sekitar 50-70% tetapi untuk orang dewasa sekitar 10-40%. Garam kalsium mempunyai sifat larut dalam asam, oleh karena itu penyerapan kalsium terjadi pada bagian atas usus kecil, tepat setelah lambung (27). Martin *et al.* (2002) juga menjelaskan bahwa reaksi dari senyawa asam dan kalsium karbonat akan meningkatkan penyerapan kalsium dalam tubuh (28).

II.5 Peran Kalsium dan Estrogen Dalam Proses Metabolisme

Estrogen berperan penting di dalam penghambatan proses resorpsi tulang karena estrogen dapat menurunkan kadar hormon paratiroid (PTH) dalam darah, meningkatkan produksi kalsitonin dan meningkatkan produksi 1,25 Dehidroxycholecalciferol (1,25-DHCC) dalam ginjal.

Osteoporosis akibat kekurangan estrogen dapat mempengaruhi interaksi lokal dan sistemik. Pengaruh lokal antara lain menghambat produksi sitokin oleh osteoblas yang meningkatkan proses penyerapan tulang dan pergantian tulang, menghambat produksi prostaglandin yang merupakan regulator multifungsional yang penting metabolisme tulang, menurunkan produksi insulin like growth factor dan transforming growth factor B. Kedua zat ini bekerja menghambat kerja sel tulang osteoklas,

menurunkan produksi faktor pemicu koloni makrofag yang meningkatkan penyerapan tulang.

Pengaruh sistemik antara lain produksi kalsitonin secara tidak langsung dipengaruhi oleh hormon estrogen, kadar kalsitonin yang rendah akan meningkatkan penyerapan tulang, peningkatan hormon paratiroid (PTH) yang meningkatkan penyerapan kalsium tulang. Wanita atau hewan betina memiliki hormon estrogen yang dihasilkan setiap mengalami siklus menstruasi, dimana hormon ini merupakan suatu hormon yang berfungsi sebagai pelindung tulang. Wanita mulai umur 35 tahun, pengambilan massa tulang menjadi lebih sering, sedangkan penyimpanan massa tulang tetap.

Kepadatan tulang wanita menyusut 0,5%-1% setiap tahunnya. Setelah memasuki masa menopause, yaitu suatu fase dimana wanita sudah tidak bisa haid lagi, atau pada hewan betina yang mengalami panhisterektomi maka hormon estrogen sama sekali tidak bisa dihasilkan, wanita bisa kehilangan 2%-3% massa tulang setiap tahunnya dan itu berlangsung selama 10 tahun masa awal menopause.

Pada betina pasca panhisterektomi terjadi penurunan fungsi dari ovarium, pembentukan estrogen oleh ovarium juga menurun, kadar estrogen yang turun akan mengakibatkan gangguan keseimbangan antara sel penghancur tulang (osteoklas) dan sel pembentuk tulang (osteoblas). Hal ini akan menyebabkan terjadinya kehilangan massa tulang yang

menyebabkan peningkatan penyerapan tulang yang pada akhirnya dapat menyebabkan osteoporosis.

Absorpsi kalsium sebagian besar terjadi di duodenum dan jejunum bagian proksimal karena keadaannya lebih bersifat asam daripada bagian usus yang lainnya. Absorpsi kalsium dari lumen usus melibatkan 3 proses, yaitu transfer melalui membran mikrovili dari sel-sel mukosa, transfer melalui sel dan keluar dari sel melewati membran basolateral ke dalam cairan ekstraseluler dan dalam darah. Absorpsi kalsium di usus halus dikerjakan dengan 2 mekanisme, yaitu dengan transpor aktif dan transpor pasif. Mekanisme transpor aktif diatur oleh 1,25 - Dehidroxycholecalciferol (1,25-(OH)₂D), suatu bentuk vitamin D paling aktif yang diproduksi dalam ginjal (50).

II.6 Hewan Coba

Hewan percobaan adalah hewan yang sengaja dipelihara dan ditenakkan untuk dipakai sebagai hewan model dalam mempelajari dan mengembangkan berbagai bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratorik (29). Syarat hewan sebagai hewan coba adalah sedapat mungkin hewan percobaan bebas dari mikroorganisme patogen, mempunyai kemampuan dalam memberikan reaksi imunitas yang baik, kepekaan terhadap sesuatu penyakit, performa atau prestasi hewan percobaan yang dikaitkan dengan sifat genetiknya (29). Hewan percobaan terbagi atas 5 kelompok, yaitu hewan laboratorium berukuran kecil, seperti mencit, tikus, dan kelinci, karnivora, seperti kucing dan anjing, primata,

seperti *Macaca* dan babon, kelompok domestik besar, seperti domba, sapi, dan kelompok hewan lainnya, seperti unggas (30).

Primata merupakan hewan yang sangat cocok digunakan dalam penelitian ilmiah yang ada kaitannya dengan manusia karena kekerabatan, serta kemiripan anatomis, fisiologis, dan patologis. Namun penggunaan hewan coba primata menemui banyak kendala seperti sulitnya pengadaan hewan, perawatan yang rumit dan mahal, penanganan yang sulit, serta adanya bahaya penyakit menular (31). Hewan percobaan lain yang memiliki karakter fisiologis mirip dengan manusia maupun mamalia lain adalah tikus. Tikus terdiri atas dua spesies, yaitu tikus hitam (*Rattus rattus*) dan tikus putih (*Rattus norvegicus*). Spesies yang sering dipakai sebagai hewan model pada penelitian mengenai mamalia adalah *Rattus norvegicus* (29).

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan kingdom Animalia, famili Muridae, sub famili Murinae, ordo Rodentia, sub ordo Myomorpha, genus *Rattus*, dan spesies *Rattus norvegicus*. Tikus putih memiliki 5 macam *basic stock* yaitu *Long Evans*, *Osborne Mendel*, *Sherman*, *Sprague-Dawley*, dan *Wistar* (32). *Rattus norvegicus* memiliki ciri rambut berwarna putih dan mata berwarna merah (29). Tikus yang baru lahir biasanya memiliki berat badan 5-6 gram dan memiliki kecepatan tumbuh 5 gram/hari. Berat badan tikus dewasa rata-rata 200-250 gram, tetapi bervariasi tergantung pada galurnya.

Rattus norvegicus sebagai hewan percobaan, memiliki beberapa keunggulan, yaitu pemeliharaan dan penanganan mudah, kemampuan reproduksi tinggi dan masa kebuntingan singkat, serta cocok untuk berbagai penelitian (29).

II.7 Ovariectomi

Operasi ovariectomi merupakan salah satu rangkaian dari penelitian *In vivo* yang menggunakan hewan uji, dimana hewan uji berupa tikus betina diambil ovariumnya agar mengalami defisiensi estrogen. Hewan yang diovariectomi digunakan sebagai model untuk kondisi menopause di mana kondisi hormon estrogen dalam tubuh sudah sangat menurun dibandingkan kondisi normalnya. Senyawa yang diberikan dalam uji dengan tikus yang terovariectomi ini salah satunya adalah senyawa yang bersifat estrogenik, sehingga kedepannya dapat digunakan sebagai bahan alam yang berguna untuk terapi penggantian estrogen (13). 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 (41).

Pada tikus yang dilakukan ovariectomi, ditemukan peningkatan aktivitas resorpsi tulang, hal ini sesuai dengan peranan estrogen terhadap

tulang. Hilangnya fungsi ovarium dalam memproduksi hormon seks steroid, seperti estradiol akan menimbulkan kondisi hipoestrogenis yang merupakan faktor utama kehilangan massa tulang (44). Histerektomi dengan ovariectomi bilateral banyak dihubungkan dengan tingginya risiko osteoporosis (45). Beberapa penelitian menyatakan bahwa ovariectomi akan menyebabkan perubahan dan penurunan volume tulang, peningkatan jumlah osteoklas, serta peningkatan kadar enzim serum alkalin fosfatase (46,47).

Model menopause digunakan karena menopause identik dengan menurunnya estrogen dalam tubuh dan berpengaruh besar dalam memicu terjadinya gangguan kesehatan alat reproduksi dan dapat meningkatkan resiko penyakit kardiovaskuler, oleh karena itu diperlukan adanya alternatif pengganti estrogen yang relatif lebih aman untuk digunakan (10).

II.8 Instrumentasi SSA

Spektrometri Serapan Atom (SSA) dalam kimia analitik dapat diartikan sebagai suatu teknik untuk menentukan konsentrasi unsur logam tertentu dalam suatu cuplikan. Teknik pengukuran ini dapat digunakan untuk menganalisis konsentrasi lebih dari 62 jenis unsur logam. Teknik Spektrometri Serapan Atom (SSA) dikembangkan oleh suatu tim peneliti kimia Australia pada tahun 1950-an, yang dipimpin oleh Alan Walsh, diCSIRO (*Commonwealth Science and Industry Research Organization*) bagian kimia fisik di Melbourne, Australia (43).

1. Sumber sinar(11)

Sumber sinar yang lazim dipakai adalah lampu katoda berongga (*hollow cathode lamp*). Lampu ini terdiri atas tabung kaca tertutup yang mengandung suatu katoda dan anoda. Katoda sendiri berbentuk silinder berongga yang terbuat dari logam atau dilapisi dengan logam tertentu.

2. Tempel sampel

Dalam analisis dengan spektrofotometri serapan atom, sampel yang akan di analisis harus diuraikan menjadi atom-atom netral yang masih dalam keadaan asas. Ada berbagai macam alat yang dapat digunakan untuk mengubah suatu sampel menjadi uap atom-atom yaitu: dengan nyala (*flame*) dan dengan tanpa nyala (*flameless*).

a. Nyala (*Flame*)

Nyala yang digunakan untuk mengubah sampel yang berupa padatan atau cairan menjadi bentuk uap atomnya, dan juga berfungsi untuk atomisasi. Pada cara spektrofotometri emisi atom, nyala ini berfungsi untuk mengeksitasikan atom dari tingkat dasar ke tingkat yang lebih tinggi.

Suhu yang dapat dicapai oleh nyala tergantung pada gas-gas yang digunakan, misalkan untuk gas batubara-udara, suhunya kira-kira sebesar 1800°C ; gas alam-udara: 1700°C ; asetilen-udara: 2200°C ; dan gas asetilen-dinitrogen oksida (N_2O) sebesar 3000°C .

Pemilihan macam bahan pembakar dan gas pengoksidasi serta komposisi pembandingnya sangat mempengaruhi suhu nyala. Untuk

penetapan logam kalsium memerlukan panjang gelombang 422,7 nm, tipe nyala NA dengan kisaran kerja 1-4 µg/mL, batas deteksi 0,002 µg/mL.

Cara pengatoman pada nyala:

1. Cara langsung (pembakar konsumsi total atau *total consumption burner*).

Sampel dihembuskan (diaspirasikan) secara langsung ke dalam nyala, dan sampel akan dikonsumsi oleh pembakar. Variasi ukuran kabut (*droplet*) sangat besar. Diameter partikel rata-rata sebesar 20 mikron, dan sejumlah partikel ada yang mempunyai diameter lebih besar dari 40 mikron. Semakin besar kabut yang melewati nyala (tanpa semuanya diuapkan), maka efisiensinya semakin rendah.

2. Cara tidak langsung

Larutan sampel dicampur terlebih dahulu dengan bahan pembakar dan bahan pengoksidasi dalam suatu kamar pencampur sebelum dibakar. Tetesan-tetesan yang besar akan tertahan dan tidak masuk ke dalam nyala. Dengan cara ini, ukuran terbesar yang masuk ke dalam nyala ± 10 mikron sehingga nyala lebih stabil dibandingkan dengan cara langsung.

Masalah yang terkait dengan penggunaan cara ini adalah kemungkinan nyala membakar pencampur dan terjadi ledakan. Akan tetapi, hal ini dapat dihindari dengan menggunakan lubang sempit atau dengan cara mematuhi aturan yang benar terkait dengan cara menghidupkan gas.

b. Tanpa nyala (*Flameless*)

Sistem pemanasan dengan tanpa nyala ini dapat melalui 3 tahap yaitu: pengeringan (*drying*) yang membutuhkan suhu yang relatif rendah; pengabuan (*ashing*) yang membutuhkan suhu yang lebih tinggi karena untuk menghilangkan matriks kimia dengan mekanisme volatilisasi atau pirolisis; pengatoman (*atomising*). Pada umumnya waktu dan suhu pemanasan tanpa nyala dilakukan dengan cara terprogram.

3. Monokromator

Pada SSA, monokromator dimaksudkan untuk memisahkan dan memilih panjang gelombang yang digunakan dalam analisis. Di samping sistem optik, dalam monokromator juga terdapat suatu alat yang digunakan untuk memisahkan radiasi resonansi dan kontinyu yang disebut dengan *chopper*.

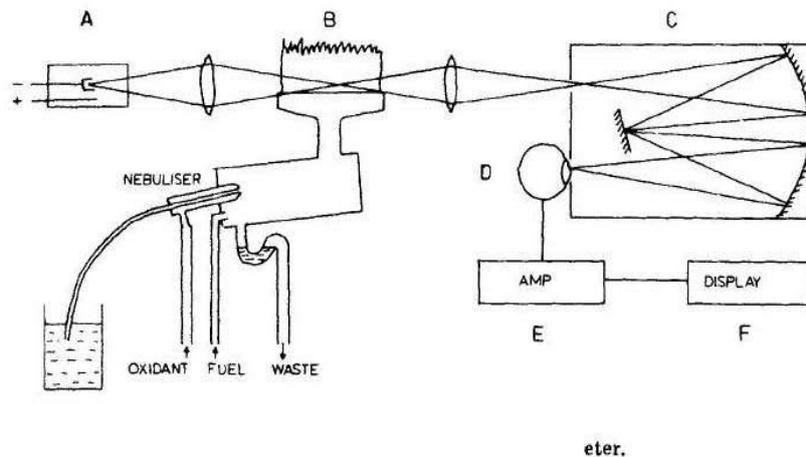
4. Detektor

Detektor yang digunakan untuk mengukur intensitas cahaya melalui tempat pengatoman. Biasanya digunakan tabung penggandaan foton (*photomultiplier tube*). Ada 2 cara yang dapat digunakan dalam system deteksi yaitu: (a) yang memberikan respon terhadap radiasi resonansi dan radiasi kontinyu; dan (b) yang hanya memberikan respon terhadap radiasi resonansi.

5. Readout

Readout merupakan salah satu alat penunjuk atau data juga diartikan sebagai system pencatat hasil. Pencatatan hasil dilakukan dengan

suatu alat yang telah terkalibrasi untuk pembacaan suatu transmittansi atau absorpsi. Hasil pembacaan dapat berupa angka atau berupa kurva dari suatu recorder yang menggambarkan absorbansi atau intensitas cahaya.



Gambar 3. Skema Spektrometer Serapan Atom

Keterangan :

- A. Sumber Radiasi
- B. Burner
- C. Monokromator
- D. Detektor
- E. Amplifier
- F. Display (Readout)