**EFEKTIVITAS PEMBERIAN LIMBAH CAIR TAHU SEBAGAI FITOESTROGEN
TERHADAP JUMLAH SEL OSTEOKLAS PADA TULANG MANDIBULA TIKUS WISTAR PASCA
OVARIEKTOMI**

Nungky Devitaningtyas*, Nur Permatasari, Rudhanton Sidharta*****

*Departemen Periodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya

**Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

***Departemen Periodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya

Korespondensi: Nungky Devitaningtyas, E-mail: nungkyskg@gmail.com

ABSTRAK

Menopause pada wanita akan menyebabkan terjadinya defisiensi hormon estrogen. Hormon estrogen memiliki peran dalam pembentukan dan remodeling tulang termasuk tulang alveolar dengan mempertahankan keseimbangan kerja osteoblas dan osteoklas. Penurunan hormon ini mengakibatkan proses remodeling tulang terganggu. Fitoestrogen dapat merangsang aktivitas osteoblastik dan menghambat osteoklas. Limbah cair tahu merupakan salah satu produk sampingan olahan kedelai yang masih memiliki kandungan fitoestrogen. **Tujuan:** untuk membuktikan efektivitas pemberian limbah cair tahu sebagai sumber fitoestrogen terhadap penurunan jumlah sel osteoklas pada tulang mandibula pasca ovariektomi. **Metode:** Penelitian ini menggunakan tikus wistar dengan 6 kelompok, yaitu K1 (tidak diovariektomi dan tidak diberi limbah cair tahu), K2 (ovariektomi 4 minggu dan tidak diberi limbah cair tahu), K3 (ovariektomi 8 minggu dan tidak diberi limbah cair tahu), K4 (ovariektomi + 1,2 ml/kgBB limbah cair tahu), K5 (ovariektomi + 6 ml/kgBB limbah cair tahu), K6 (ovariektomi + 12 ml/kgBB limbah cair tahu). Pemberian limbah cair tahu melalui sonde 3 kali sehari selama 4 minggu. Penurunan jumlah osteoklas diamati secara mikroskopis. **Hasil:** Uji Oneway anova, ($p < 0$) terdapat perbedaan jumlah sel osteoklas tikus Wistar antar kelompok. Uji Post Hoc Multiple Comparison, K6 terdapat perbedaan signifikan dibandingkan K4 dan K5 dimana jumlah sel osteoklas K6 paling sedikit. **Kesimpulan:** Pemberian limbah cair tahu dengan dosis 12 mg/kgBB dapat menurunkan jumlah sel osteoklas pada mandibula tikus pasca ovariektomi.

Kata kunci: limbah cair tahu, fitoestrogen, sel osteoklas, ovariektomi

THE EFFECTIVENESS OF TOFU LIQUID WASTE AS PHYTOESTROGEN ON THE NUMBER OF OSTEOCLAS CELLS IN MANDIBULA BONE OF POST OVARECTOMIC WISTAR RATS

ABSTRACT

*Menopause in women will cause estrogen hormone deficiency. Estrogen hormones have a role in bone formation and remodeling including alveolar bone by maintaining a working balance of osteoblasts and osteoclasts. This decrease in hormones results in a disrupted bone remodeling process. Phytoestrogens can stimulate osteoblastic activity and inhibit osteoclasts. Tofu liquid waste is one of the by-products of processed soybeans which still contains phytoestrogens. **Objective:** to prove the effectiveness of tofu liquid waste as a source of phytoestrogens to decrease the number of osteoclasts in the mandibular bone after ovariectomy. **Method:** Subjects were divided into 6 groups: K1 (not ovariectomized and not given tofu liquid waste), K2 (ovariectomy 4 weeks and not given tofu liquid waste), K3 (ovariectomy 8 weeks and not given tofu liquid waste), K4 (ovariectomy and 1.2 ml / kg tofu liquid waste), K5 (ovariectomy and 6 ml / kg of tofu liquid waste), K6 (ovariectomy and 12 ml / kg of tofu liquid waste). At the dose groups I, II, and III, after ovariectomized rats fed rats for 4 weeks, then given a liquid waste out for 4 weeks for 3 times a day. A decrease in the number of osteoclasts is observed microscopically. **Result:** One-Way ANOVA test, ($p < 0$) there were differences in the number of osteoclas of Wistar rats between groups. Post-Hoc Multiple Comparison Test, K6 there were significant differences compared to K4 and K5 where the number of osteoclas K6 cells was the least. **Conclusion:** The provision of tofu liquid waste at a dose of 12 mg / kg BB can reduce the number of osteoclasts in the mandible of rats after ovariectomy.*

Keywords: tofu liquid waste, phytoestrogens, osteoclast cell, ovariectomized

PENDAHULUAN

Menopause adalah periode fisiologis pada wanita ketika siklus menstruasi berhenti secara irregular. Saat menopause, wanita akan mengalami penurunan kadar estrogen tubuh, sehingga kehilangan efek protektif dari estrogen.¹ Hormon estrogen sangat berperan dalam proses regenerasi dan remodeling tulang, termasuk tulang alveolar, yang melibatkan aktifitas osteoblas (formasi tulang) dan osteoklas (penyerapan tulang). Akibat dari penurunan hormon estrogen ini, maka proses keseimbangan aktifitas kedua sel tersebut dapat terganggu.²

Pada menopause, penurunan jumlah estrogen akan menyebabkan peningkatan aktifitas osteoklas yang mengakibatkan terjadinya resorpsi tulang.³ Mekanisme biologis yang terjadi adalah penurunan aktifitas ER α pada osteosit, yang mengakibatkan terjadinya peningkatan ekspresi interleukin (IL)-1, IL-6, *tumor necrosis factor* (TNF- α) dan *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF). Sitokin ini akan menurunkan aktifitas osteoblastik dan meningkatkan aktifitas osteoklastik serta menghambat apoptosis dari osteoklas.⁴

Estrogen memiliki peranan sebagai penghambat sekresi *interleukin (IL)-1* dan *Tumor necrosis factor* (TNF- α) oleh makrofag dan sel T, yang merupakan stimulator proliferasi osteoklas dan apoptosis osteoblast.² Selain itu, estrogen mampu sebagai penginduksi proliferasi dan maturasi dari sel-T regulator, dimana sel ini berfungsi sebagai penghambat perkembangan osteoklas. Estrogen mampu menstimulasi sel-sel pada tulang dan osteoblas untuk menghasilkan osteoprotegerin (OPG) yang akan menghambat

interaksi antara *receptor activator of NF- κ B* (RANK) dengan *receptor activator of NF- κ B* ligand (RANKL). Jika estrogen tubuh menurun maka akan terjadi peningkatan RANKL yang merupakan mediator aktivitas osteoklas, sehingga akan meningkatkan aktivasi osteoklas dan terjadi resorpsi tulang.³

Penggunaan bahan alami yang mengandung hormon atau fitohormon sudah banyak dikembangkan saat ini. Salah satunya adalah fitoestrogen. Fitoestrogen merupakan tumbuhan yang memiliki aktivitas mirip estrogen.⁵ Penggunaan fitoestrogen memiliki efek keamanan yang lebih baik dibandingkan dengan estrogen sintesis atau obat-obat hormonal pengganti (*hormonal replacement therapy* / HRT).⁶

Limbah cair yang dihasilkan oleh industri pembuatan tahu adalah cairan kental yang terpisah dari gumpalan tahu yang disebut air dadih. Cairan ini mengandung kadar protein yang tinggi dan dapat segera terurai. Limbah cair tahu mengandung bahan olahan organik kompleks yang tinggi terutama protein dan asam amino dalam bentuk padatan tersuspensi maupun terlarut yang masih mengandung isoflavone.^{7,8} Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas pemberian limbah cair tahu pada tikus wistar pasca ovariectomi terhadap penurunan jumlah sel osteoklas pada tulang mandibula.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan *true experimental* laboratoris yang menggunakan metode *randomized post-test control group design*. Penelitian ini telah lolos *ethical clearance* yang diberikan Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya, Malang. Subyek menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar dibagi 6 kelompok, yaitu K1 (tidak diovariectomi dan tidak diberi limbah cair tahu), K2 (ovariectomi 4 minggu dan tidak diberi limbah cair tahu), K3 (ovariectomi 8 minggu dan tidak diberi limbah cair tahu), K4 (ovariectomi + 1,2 ml/kgBB limbah cair tahu), K5 (ovariectomi + 6 ml/kgBB limbah cair tahu), K6 (ovariectomi + 12 ml/kgBB limbah cair tahu). Pada kelompok K4, K5, K6 setelah diovariectomi tikus diberi pakan selama 4 minggu, kemudian diberi limbah cair tahu selama 4 minggu sebanyak 3 kali sehari. Setelah itu, pada keenam kelompok tersebut dilakukan pembedahan tulang mandibula untuk dilihat jumlah sel osteoklas.

Prosedur Ovariectomi. Berat badan tikus ditimbang, lalu tikus difiksasi dalam posisi supinasi. Dilakukan anestesi menggunakan *ketamin* i.m dengan dosis 40mg/kgBB kemudian dilakukan sterilisasi menggunakan *alcohol* 70% dan *betadine solution*. Dilakukan insisi transabdominal di atas uterus sepanjang 1,5–2 cm selapis demi selapis sampai menembus dinding peritoneum. Uterus dicari dengan menelusuri kornu *uteri-oviduct-ovarium*. *Oviduct* dan ovarium dibebaskan dari jaringan lemak dan jaringan ikat sekitarnya. Selanjutnya *oviduct* bagian distal dan ovarium diligasi. Kemudian *oviduct* dan ovarium diangkat. Luka potongan diberi *basitrasin* serbuk (*Nebacetin*). Prosedur yang sama dilakukan untuk ovarium kanan. Luka insisi diberikan *Gentamycin* i. m dengan dosis 60–80 mg/kgBB 1 kali per hari selama 3 hari, dan Novalgin i.m dengan dosis 0,3 ml selama 1 hari.

Pembuatan Limbah Cair Tahu.

Pertama, dilakukan pemilihan kedelai. Setelah dicuci menggunakan air mengalir, kedelai tersebut direndam dalam air bersih selama 8 jam (paling sedikit 3 liter air untuk 1 kg kedelai). Untuk 100 gram kedelai dibutuhkan 30 cc air. Cuci berkali-kali kedelai yang telah direndam. Selanjutnya, dilakukan penghancuran kedelai dengan cara menumbuk sambal meambahkan air hangat, hingga kedelai berbentuk bubur. Berikutnya, bubur tsb dimasak pada suhu 70⁰-80⁰C dan disaring. Hasil saringan diendapkan dengan menambahkan 3 ml asam cuka untuk setiap liter sari kedelai. Akhirnya, endapan tersebut diletakan dan dipres agar endapan tersebut tmengeluarkan cairan yang disebut limbah cair tahu. Limbah cair tahu inilah selanjutnya digunakan sebagai bahan uji pada eksperimen menggunakan tikus wistar yang telah dilakukan ovarectomi. Hewan coba yang telah diovariectomi diberikan limbah cair tahu per *oral* melalui sonde atau pipa langsung kedalam kerongkongan hewan coba, sesuai dengan dosis yang ditetapkan selama 4 minggu.

Pemrosesan Jaringan.

Pada penelitian ini, proses dekalsifikasi selama 5 hari dilakukan dengan cara merendam organ pada cairan onkalek. Untuk melakukan proses fiksasi, dehidrasi, clearing dan impregnasi, dilakukan *embedding* dan penyayatan jaringan dengan mikrotom. Kemudian jaringan dicat menggunakan prosedur hematoksilin eosin. Kemudian perhitungan sel osteoklas menggunakan Mikroskop Olympus Photo Slide BX51 dengan pembesaran 40x pada tiap preparat/ 4 lapangan pandang.

Analisis Data. Perbandingan jumlah sel osteoklas pada tulang mandibula antara sampel yang berasal dari kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dianalisa dengan menggunakan uji One-way ANOVA, Uji Post hoc Multiple Comparison Equal Variance by LSD, dan Uji Korelasi Pearson. Uji statistik dilakukan dengan menggunakan program *SPSS 16.00*, dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

HASIL PENELITIAN

Gambaran mikroskopis pada kelompok K1 tampak jumlah osteoklas yang normal. Jumlah sel osteoklas pada K2 terlihat lebih banyak daripada jumlah osteoklas K1. Pada kelompok K3, jumlah osteoklas terlihat lebih banyak dari kelompok K3. Pada kelompok K4, jumlah osteoklas mengalami penurunan dibandingkan dengan jumlah osteoklas pada kelompok K2 dan K3. Pada kelompok K5, jumlah osteoklas lebih sedikit daripada kelompok K4. Selanjutnya jumlah sel osteoklas pada kelompok K6 lebih sedikit pada dibandingkan dengan jumlah osteoklas kelompok K4 dan K5.

Gambar 1. Gambaran histologi potongan membujur tulang mandibula tikus Wistar

Keterangan:

K1 = tikus normal; K2 = tikus ovariectomi 4 minggu; K3 = tikus ovariectomi 8 minggu; K4 = tikus Ovariectomi+dosis limbah cair tahu 1,2 mg/kgBB; K5 = tikus Ovariectomi+dosis limbah cair tahu 6 mg/kgBB; K6 = tikus Ovariectomi+dosis limbah cair tahu 12 mg/kgBB

Gambar 2. Diagram Rerata dan Standar Deviasi Jumlah Sel Osteoklas

Berdasarkan diagram rerata pada kelompok tikus tanpa ovariectomi (K1= 19,9475) tampak jumlah osteoklas yang normal. Pada tikus 4 minggu pasca ovariectomi (K2=19,1425) jumlah sel osteoklas terlihat lebih banyak. Pada kelompok tikus 8 minggu pasca ovariectomi (K3 =33,6875) osteoklas terlihat lebih banyak dari kelompok K2. Pada kelompok K4, jumlah osteoklas mengalami penurunan disbanding K2 dan K3. Pada kelompok K5, jumlah osteoklas lebih sedikit dari kelompok K3. Kemudian pada kelompok K6 memiliki jumlah sel osteoklas yang paling sedikit dibandingkan dengan kelompok K4 dan K5.

Uji statistik yang pertama adalah menentukan normalitas data dengan menggunakan Uji Kolmogorov-smirnov ,dimana suatu data dikatakan memiliki sebaran normal jika nilai $p>0,05$. Berdasarkan pengujian

normalitas data dengan menggunakan uji Kolmogorov-smirnov didapatkan bahwa data untuk semua kelompok mempunyai sebaran normal (uji Kolmogorov-smirnov, $p > 0,05$) dengan nilai $p = 0.648$ sehingga dapat disimpulkan bahwa data tersebut menyebar mengikuti sebaran normal. Dengan demikian dapat dilakukan pengujian dengan anova karena syarat data telah terpenuhi.

Pada uji homogenitas levene suatu data dikatakan memiliki varian yang normal bila nilai signifikansi $p > 0,05$. Pada tabel uji homogenitas didapatkan bahwa data mempunyai nilai $p = 0,157$. Dengan demikian maka analisa data dapat dilakukan dengan menggunakan uji One-way ANOVA.

Analisis dengan menggunakan uji Oneway ANOVA bertujuan untuk mengetahui perbedaan nilai jumlah sel osteoklas antar kelompok. Dari hasil pengujian didapatkan bahwa nilai $p = 0$, dan berdasarkan hasil tersebut maka hipotesis Null ditolak sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan jumlah sel osteoklas tikus Wistar antara enam kelompok yang berbeda.

Analisis mengenai perbedaan jumlah dari keenam kelompok dapat diketahui dalam *Post-Hoc Multiple Comparison test*. Metode *Post-Hoc* yang digunakan adalah uji LSD. Pengujian statistik, kelompok K2 tidak mengalami peningkatan jumlah sel osteoklas yang signifikan dibandingkan dengan jumlah sel osteoklas kelompok K1. Kelompok K3 mengalami peningkatan jumlah sel osteoklas signifikan dibandingkan dengan jumlah sel osteoklas kelompok K1. Pada kelompok K3 memiliki perbedaan secara bermakna dengan semua kelompok. Pada kelompok K4, K5, K6

tidak terdapat perbedaan signifikan antara jumlah sel osteoklas dibandingkan dengan K1 dan K2. Pada kelompok K6 terdapat perbedaan signifikan antara jumlah sel osteoklas dibandingkan dengan kelompok K2 dan K3, sedangkan dengan kelompok K4 dan K5 tidak berbeda signifikan.

Korelasi Pearson digunakan untuk mengukur kekuatan hubungan dua variabel atau lebih yang berskala interval (parametrik). Dalam hal ini didapatkan hasil Kekuatan korelasi (r) = -0,432, dengan demikian terdapat korelasi yang cukup kuat antara dosis limbah cair tahu dengan jumlah sel osteoklas tikus Wistar. Arah korelasi adalah negatif, sehingga semakin besar dosis limbah cair tahu, maka semakin kecil pula jumlah sel osteoklas tikus Wistar.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan jumlah sel osteoklas pada kelompok K2 dan K3 meningkat dibandingkan dengan kelompok K1, sedangkan pada kelompok K3 mengalami peningkatan jumlah sel osteoklas yang signifikan dibandingkan dengan kelompok K2. Pada penelitian sebelumnya dikatakan bahwa tikus yang dilakukan ovariektomi selama 4 minggu dan 8 minggu, tikus akan mengalami penurunan kadar estradiol dan hal ini menunjukkan adanya kondisi hipoestrogen.⁹

Estrogen dapat mempengaruhi osteoklas secara langsung melalui ekspresi reseptor estrogen α (ER- α) dan reseptor estrogen β (ER- β). Estrogen dapat mempengaruhi osteoklas dan jalur lain dari osteoklas dalam hal regulasi proses formasi, proliferasi, apoptosis dan kapasitas osteoklas

untuk meresorpsi tulang yang berfungsi untuk menjaga keseimbangan tulang. Pada tikus kelompok normal yang tidak diberikan perlakuan ovariectomi terdapat kadar estrogen yang cukup untuk merangsang terjadinya aktifitas osteoklas. Estrogen ini dapat menghambat produksi osteoklastogenik dan merangsang apoptosis dari sel osteoklas.²

Hasil penelitian menunjukkan penurunan jumlah sel osteoklas pada kelompok K4, K5 dan K6 dibandingkan dengan kelompok K2 dan K3. Pada kelompok K6 mengalami penurunan jumlah sel osteoklas yang signifikan dibandingkan kelompok K4 dan K5. Konsumsi kedelai pasca menopause dapat meningkatkan massa tulang. Kedelai dan olahannya memiliki kandungan isoflavone berupa fitoestrogen yang memiliki aktifitas estrogenik terhadap tulang. Dengan demikian limbah cair tahu merupakan produk sampingan dari pengolahan tahu yang berbahan dasar kedelai masih memiliki kandungan isoflavon dapat dimanfaatkan sebagai pencegahan resorpsi tulang dan pemeliharaan tulang.⁹

Berdasarkan uji korelasi pearson didapatkan hasil bahwa korelasi yang cukup kuat ($r=-0.432$) dengan signifikan ($p=0,000$) mengenai hubungan antara peningkatan dosis limbah cair tahu dengan penurunan jumlah sel osteoklas tikus wistar. Koefisien r sebesar 0,432 menunjukkan bahwa pemberian limbah cair tahu dalam menurunkan jumlah sel osteoklas tikus pasca ovariectomi sebesar 43,2 %, sedangkan sisanya 56,8% disebabkan beberapa faktor akibat dari penyimpanan limbah cair tahu yang dapat mempengaruhi zat aktif limbah cair tahu tersebut dan dipengaruhi karena faktor individu dalam kemampuan

mengabsorpsi limbah cair tahu dalam tubuh. Arah korelasi adalah negatif, yang berarti semakin besar dosis limbah cair tahu yang diberikan, maka semakin kecil jumlah sel osteoklas pada tulang mandibula tikus wistar yang teramati. Hasil penelitian ini menguatkan hipotesis penelitian, bahwa pemberian limbah cair tahu menurunkan jumlah sel osteoklas pada tulang mandibula tikus wistar pasca ovariectomi. Berdasarkan dosis pemberian, maka pemberian limbah cair tahu dengan dosis sebesar 12 mg/kgBB menurunkan jumlah sel osteoklas secara lebih efektif.

KESIMPULAN

1. Terdapat peningkatan jumlah sel osteoklas pada tulang mandibula tikus wistar 4 minggu pasca ovariectomi dan 8 minggu pasca ovariectomi.
2. Terdapat penurunan jumlah sel osteoklas pada tulang mandibula tikus wistar pasca ovariectomi setelah pemberian limbah cair tahu.
3. Terdapat hubungan antara dosis limbah cair tahu dengan penurunan jumlah sel osteoklas pada mandibula tikus wistar pasca ovariectomi, dengan arah korelasi negatif, yang berarti semakin besar dosis limbah cair tahu yang diberikan maka semakin kecil jumlah sel osteoklas

DAFTAR PUSTAKA

1. Nidhi KRR. *Periodontal Diseases in Menopausal Women*. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2014; 6(12): 423–4.
2. Fitzpatrick LA. 2003. Phytoestrogens- Mechanism of Action and Effect on Bone

- Markers and Bone Mineral Density. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2003; 32(1): 233-52.
3. Robling AG, Castillo AB, Turner CH. *Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodelling*. *Annu Rev Biomed Eng*. 2006; 8: 455-98.
 4. Sapir KR, Livshits G. *Postmenopausal Osteoporosis in Rheumatoid Arthritis: The Estrogen Deficiency-Immune Mechanisms Link*. *Bone*. 2017; 103: 102-115.
 5. Glover A, Assinder SJ. *Acute Exposure of Adult Male Rats to Dietary Phytoestrogen Reduces Fecundity and Alters Epididymal Steroid Hormon Receptor Expression*. *Journal of Endocrinology*. 2006; 189(3): 565-73.
 6. Ariyanti H, Apriliana E. *Pengaruh Fitoestrogen terhadap Gejala Menopause*. *Majority*. 2016; 5(5): 1-5.
 7. Husni E, Bakhtiar A, Helmiza H. *Isolasi Isoflavonoid dari Limbah Cair Pabrik Tempe*. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*. 2010; 7(2): 99-101.
 8. Kaswinarni, F. *Kajian Teknis Pengolahan Limbah Padat dan Cair Industri*. *Majalah Lontar*. 2008; 22(2): 1-20.
 9. Wulandari RCL. *Terapi Sulih Hormon Alami untuk Menopause*. *Jurnal Involusi Kebidanan*. 2015; 5(10): 54-66.