

PSI

29

Jakarta

10

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

**DISAIN SUPLEMEN MENGANDUNG ASAM LEMAK
TERKONYUGASI (ALT) UNTUK MENINGKATKAN
PERTUMBUHAN TULANG**



Oleh:

Komari, dkk

**PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
DEPARTEMEN KESEHATAN RI**

**Jl. Percetakan Negara No. 21,
Jakarta Pusat 10560**

2012

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

**DISAIN SUPLEMEN MENGANDUNG ASAM LEMAK
TERKONYUGASI (ALT) UNTUK MENINGKATKAN
PERTUMBUHAN TULANG**



Oleh:

Komari, dkk

**PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
DEPARTEMEN KESEHATAN RI**

Jl. Percetakan Negara No. 21,

Jakarta Pusat 10560

2012

SK PENELITIAN



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jakarta No. 23 Jakarta 10560
1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

KEPUTUSAN

KEPALA PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
NOMOR: HK.03.05/III/750/2012

TENTANG

PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012

KEPALA PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

MEMBANG

- a. bahwa untuk melaksanakan kegiatan penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, perlu ditunjuk Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012;
- b. bahwa berdasarkan pertimbangan huruf a tersebut diatas, maka dipandang perlu menetapkan Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tentang Pembentukan Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 sejumlah tujuh belas penelitian;

MINGAT

- 1. Undang-Undang Nomor 23 Tahun 1992 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia tahun 1992 Nomor 100, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3495);
- 2. Undang-undang Nomor 14 Tahun 2001 tentang Paten (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2002 Nomor 109, Tambahan Lembaran negara Republik Indonesia Nomor 4130);
- 3. Peraturan Pemerintah RI No. 39 Tahun 1995 tentang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Lembaran Negara Tahun 1995 Nomor 67, Tambahan Lembaran Negara Nomor 3609);
- 4. Peraturan Pemerintah Nomor 20 Tahun 2005 tentang Alih Tehnologi Kekayaan Intelektual serta hasil Penelitian dan Pengembangan oleh Perguruan Tinggi dan Lembaga Penelitian dan Pengembangan (Lembaran Negara Tahun 2005 Nomor 43, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4457);
- 5. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 791/Menkes/SK/VII/1999 tentang Koordinasi Penyelenggaraan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
- 6. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 1179A/Menkes/SK/X/1999 tentang Kebijakan Nasional Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
- Peraturan Presiden Nomor 47 Tahun 2009 tentang Pembentukan dan Organisasi Kementerian Negara.
- 7. Peraturan Menteri Kesehatan No. 1144/Menkes/Per/VIII/2010 tentang Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Kesehatan;
- 8. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No.HK.03.05/4/11675/2011 tanggal 30 Desember 2011 tentang Penetapan Kuasa Pengguna Anggaran, Pejabat Pembuat Komitmen, Pejabat Penguji dan Penandatanganan SPM, Bendahara Pengeluaran dan Bendahara Penerimaan pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan di Jakarta tahun anggaran 2012;

PERHATIKAN

- 1. Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tahun 2012 dengan No.0683/024-11.1.01/00/2012. tanggal 9 Desember 2011;



KEMENTERIAN KESEHATAN RI

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Peraturan Negara No. 23 Jakarta 10560
No. 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

MEMUTUSKAN

MENETAPKAN

- PERTAMA** :
- 1) Membentuk Tim Pelaksana Penelitian Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012 sebagaimana tercantum dalam lampiran keputusan ini;
 - 2) Kepada Tim Pelaksana Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan Tahun Anggaran 2012, dapat diberikan honorarium sebagaimana tersebut dalam lampiran 2 Keputusan ini;
- KEDUA** :
- Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 mempunyai tugas sebagai berikut:
- 1) Melaksanakan Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012, dengan susunan Tim seperti pada lampiran surat keputusan ini;
 - 2) Menyerahkan Laporan Kemajuan Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian dan Laporan Akhir Penelitian kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan.
- KETIGA** :
- Dalam melaksanakan tugasnya, Tim bertanggungjawab kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan serta wajib menyampaikan laporan akhir penelitian sebagai pertanggungjawaban kegiatan;
- KEEMPAT** :
- Biaya pelaksanaan kegiatan serta honor Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 dibebankan pada anggaran DIPA Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012;
- KELIMA** :
- Keputusan ini mulai berlaku sejak bulan Januari sampai dengan Desember 2012 dengan ketentuan apabila dikemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam penetapan ini akan diadakan perbaikan dan perubahan sebagaimana mestinya.

Ditetapkan di : Jakarta

Pada tanggal : 6, Februari 2012

Kepala,

Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIP. 19521119 198803 100 1

Tembusan Yth:

1. Sekretaris Jenderal Kemenkes RI;
2. Inspektur Jenderal Kemenkes RI;
3. Ketua Badan Pemeriksa Keuangan;
4. Kepala Badan Pengawasan Keuangan dan Pembangunan;
5. Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
6. Sekretaris Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
7. Kamwil Ditjen Anggaran Kemenkeu RI DKI Jakarta;
8. Para Kepala Pusat di Lingkungan Badan Litbang Kesehatan;
9. Kepala Bagian Tata Usaha Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
10. Kepala Bidang Biomedis, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
11. Kepala Bidang Teknologi Dasar Kesehatan, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
12. Kepala Bidang Pengeluaran Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
13. Lainnya masing-masing yang bersangkutan untuk dilaksanakan.



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Negara No. 23 Jakarta 10560
Rus 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

Lampiran 1 *
Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Nomor : HK.03.05/III/750/2012
Tanggal : 6 Februari 2012

SUSUNAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012

**DISAIN SUPLEMEN MENGANDUNG ASAM LEMAK TERKONYUGASI (ALT)
UNTUK MENINGKATKAN PERTUMBUHAN TULANG**

- | | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| 1. Prof. Bambang | : Koordinator Peneliti |
| 2. Prof. Dr. drh. Arief | : Koordinator Peneliti |
| 3. Prof. Komari, M.Sc., PhD | : Peneliti Utama/Ketua Pelaksana |
| 4. drh. Wien Winarno | : Peneliti Madya |
| 5. Dra. Heru Yuniati, M.Si | : Peneliti Madya |
| 6. Dra. Dian Sundari | : Peneliti Madya |
| 7. Dr. Astuti Lamid, MCN | : Peneliti Madya |
| 8. Nelis Imanningsih, STP., M.Sc | : Peneliti Muda |
| 9. Dra. Efriwati, M.Sc | : Peneliti Muda |
| 10. Ade Nugrahaeni, M.Sc | : Peneliti Non Fungsional |
| 11. Fifi Retiati, SKM | : Peneliti Non Fungsional |
| 12. drh. Intan Retno Putri | : Peneliti Non Fungsional |
| 13. Nia Kumiawati, B.Sc | : Peneliti Non Fungsional |
| 14. Herman | : Pembantu Peneliti |
| 15. Enday Yunidar | : Pembantu Peneliti |
| 16. Samini | : Sekretariat Penelitian |

Kepala,


Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIP. 19621119 198803 100 1



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Negara No. 23 Jakarta 10560
1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

Lampiran 2
Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar
Kesehatan
Nomor : HK.03.05/III/750/2012
Tanggal : 6 Februari 2012

**JUDUL PENELITIAN : KOMPONEN LEMAK TERKONYUGASI (ALT) UNTUK MENINGKATKAN
PERTUMBUHAN TULANG PADA TIKUS COBA**

JUMLAH HONOR TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012

1. Koordinator Peneliti	: Jumlah honor yang diterima per-bulan sebesar	=Rp.	420.000
2. Peneliti Utama	: Jumlah honor yang diterima per-Jam, per-minggu sebesar	=Rp.	60.000
3. Peneliti Madya	: Jumlah honor yang diterima per-Jam, per-minggu sebesar	=Rp.	50.000
4. Peneliti Muda	: Jumlah honor yang diterima per-Jam, per-minggu sebesar	=Rp.	40.000
5. Peneliti Non Fungsional	: Jumlah honor yang diterima per-Jam, per-minggu sebesar	=Rp.	30.000
6. Pembantu Peneliti	: Jumlah honor yang diterima per-Jam, per-minggu sebesar	=Rp.	20.000
7. Sekretariat Penelitian	: Jumlah honor yang diterima setiap bulan sebesar	=Rp.	300.000

Kepala,

Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIP 19621119 198803 100 1

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas karuniaNya laporan penelitian berjudul "DISAIN SUPLEMEN MENGANDUNG ASAM LEMAK TERKONJUGASI (ALT) UNTUK MENINGKATKAN PERTUMBUHAN TULANG" dapat diselesaikan dengan baik.

Atas kerjasama tim peneliti dan bantuan dari peneliti lain dilingkungan Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan dalam menyelesaikan tugas ini kami mengucapkan terima kasih yang sebesar besarnya. Setiap peneliti yang terlibat dalam kegiatan ini dapat berkontribusi seauai dengan tugas masing-masing sehingga kegiatan penelitian ini dapat berlangsung harmonis.

Harapan kami hasil penelitian ini dapat berkontribusi dalam memecahkan masalah *stunting* di Indonesia dengan pendekatan sumber daya lokal dan kemampuan sendiri. Selain itu informasi yang diperoleh dari kegiatan ini dapat menjadi pertimbangan dalam peningkatan ilmu pengetahuan dan program kesehatan.

Semoga kegiatan penelitian ini memberikan pengalaman bagi peneliti dan kegiatan ilmiah dimasa datang.

Jakarta 30 Desember 2012

Ketua Pelaksana

RINGKASAN EKSEKUTIF

Berdasarkan data Riskesdas 2010, masalah balita pendek (stunting) merupakan masalah gizi yang menonjol dalam masalah gizi anak, sehingga dalam program suplementasi bagi anak dan ibu hamil memerlukan suplemen yang mendorong pertumbuhan densitas tulang.

Pada awal penelitian ini ditujukan untuk meningkatkan pertumbuhan yang diukur dengan densitas tulang formulasi ini disusun dari ALT dan sumber bioaktif tanaman tersebut terhadap pertumbuhan densitas tulang, yang terdiri dari (1) pengaruh komponen ALT dan bioaktif terhadap pertumbuhan tulang dari fermentasi kedelai dan uwi pada tikus coba

Penelitian ini didesain sebagai penelitian ekperimental murni, yang akan dilakukan di laboratorium Pusat Biomedis dan Penelitian Dasar Kesehatan Bali bangkes dengan memformulasikan tiga jenis ransum yaitu kontrol/ransum basal (i), ransum basal dengan suplementasi mengandung ALT saja (ii), dan ransum basal yang disuplementasi dengan ALT, isoflavon (fermentasi kedelai) dan antosianin (uwi) (iii) yang diberikan pada hewan coba (tikus) yang baru disapih dan yang bunting. Pertumbuhan tulang diukur dengan densitas tulang, serta biokimia tulang metabolisme kalsium dan protein tulang serta hormon terkait pertumbuhan tulang diukur untuk menilai efektifitas suplemen tersebut.

Berdasarkan data densitas tulang, suplemen ALT dengan senyawa antioksidasi isoflavon dan antosianin membantu meningkatkan densitas tulang baik pada tikus sapih maupun pada anak tikus dari induk yang bunting yang mengkonsumsi suplemen tersebut. Hal tersebut didukung dengan meningkatnya transpor (Albumin), kandungan kalsium dan protein tulang serta hormon pertumbuhan tulang osteokalsin.

Prototipe suplemen tersebut diharapkan dijadikan masukan bagi suplementasi makanan anak kurang gizi serta ibu hamil dalam pencegahan dan penanggulangan stunting pada anak Indonesia melalui penelitian lanjutan mengenai efikasi dan efektifitas suplemen ALT dan isoflavon dan antosianin pada masyarakat terutama anak balita dan ibu hamil .

ABSTRAK

Pendahuluan: data Riskesdas 2010, masalah balita pendek (stunting) merupakan masalah gizi yang memerlukan inovasi pemberian suplemen yang sesuai dengan pertumbuhan tulang pada anak-anak dan ibu hamil. Disain formula suplemen dengan komposisi Asam Lemak Terkonyugasi (ALT) yang banyak dijumpai dalam makanan Indonesia dan bioaktif larut lemak (isoflavon) dan larut air (antosianin).

Metoda: Desain penelitian adalah eksperimental mumi, yang dilakukan di laboratorium Pusat Biomedis dan Penelitian Dasar Kesehatan Balitbangkes dengan tiga jenis formula ransum yaitu kontrol/ransum basal (i), ransum basal dengan suplementasi mengandung ALT saja (ii), dan ransum basal yang disuplementasi dengan ALT, isoflavon (fermentasi kedelai) dan antosianin (uwi) (iii) yang diberikan pada hewan coba (tikus) yang baru disapih selama 2 bulan dan yang bunting sampai melahirkan kemudian anak disapih. Pertumbuhan tulang diukur dengan densitas tulang, serta biokimia tulang metabolisme kalsium dan protein tulang serta hormon terkait pertumbuhan tulang diukur untuk menilai efek suplemen tersebut

Hasil dan Pembahasan: Data densitas tulang pada hewan mendapat suplemen ALT dengan senyawa antioksidasi isoflavon dan antosianin meningkat secara signifikan dibanding tikus yang mendapat ALT saja dan yang mendapat ransum basal/kontrol baik pada tikus sapih maupun pada anak tikus dari tikus induk. Selanjutnya data tersebut didukung dengan meningkatnya transpor (Albumin), kandungan kalsium dan protein tulang serta hormon pertumbuhan tulang osteokalsin.

Kesimpulan: Prototipe suplemen makanan mengandung ALT dan senyawa antioksidasi merupakan formulasi yang dapat diintegrasikan pada program pemberian suplementasi makanan anak kurang gizi serta ibu hamil dalam pencegahan dan penanggulangan sehingga selain dapat meningkatkan status gizi juga membantu menurunkan kasus stunting pada anak Indonesia.

Kata Kunci: suplemen makanan, ALT, Isoflavon, antosianin, densitas tulang, *stunting*

Daftar Anggota Tim Peneliti

No	Nama	Kedudukan dalam tim/Keahlian
I. TIM KONSULTAN		
1	Prof DR. Dr Bambang	Konsultan/Prof UNAIR/Medis
2	Prof Dr drh Arief	Konsultan/Prof IPB/Hewan
II. TIM TEKNIS		
1	Prof. Komari. MSc, PhD	Ketua pelaksana/Peneliti Utama/Biorekayasa
2	Dra. Heru Yuniat. Msi	Anggota/Peneliti Madya/Biologi
3	Nelis Imanningsih STP, MSc	Anggota/Peneliti Muda/Tek.Pangan
4	Drh. Wien Winarno	Anggota/Peneliti Madya/Dokter hewan
5	Dra. Dian Sundari Peneliti Madya	Anggota/Peneliti Madya/Biologi
6	DR. Astuti Lamid MCN	Anggota/Peneliti Madya/Klinis
7	Dra. Efriwati, MSc Peneliti	Anggota/Peneliti muda/Biotek
8	Ade Nugrahaeni STP	Anggota/Peneliti Non fungsional/Tek. Pangan
9	Fifi Retiati SKM	Anggota/Peneliti non fungsional/Gizi
10	Drh Putri Reno Intan	Anggota/Ransum Hewan/Dokter Hewan
11	Nia Kurniawati	Anggota/Teknisi/D3 analisis
12	Samini	Pembantu Peneliti/Keuangan
13	Enday Yunidar	Pembantu Peneliti/ Administrasi
14	Herman	Pembantu Peneliti/Litkayasa
15	Misbah	Pembantu peneliti/Litkayasa

Penanggung jawab penelitian dan laporan

Prof. Komari, M.Sc., PhD

Penanggung jawab laboratorium hewan

Drh M. Wien Winarno

DAFTAR ISI

Bab	ISI	Halaman
	Kata Pengantar	ii
	Ringkasan Eksekutif	iii
	Abstrak	iv
	Daftar Anggota Tim Peneliti	v
	Daftar Tabel dan Gambar	vii
<u>I</u>	PENDAHULUAN	1
<u>II</u>	TINJAUAN PUSTAKA	4
<u>III</u>	TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	14
<u>IV</u>	HIPOTESIS	15
<u>V</u>	METODA PENELITIAN	15
	a. Kerangka Konsep	15
	b. Tempat dan Waktu Penelitian	16
	c. Jenis Penelitian	16
	d. Disain Penelitian	16
	e. Populasi dan Sampel	16
	f. Variabel	17
	g. Alat, Bahan, Tahapan dan Cara Kerja	17
	h. Definisi Operasional	20
	i. Manajemen dan Analisis Data	21
	y. Pertimbangan Etik Penelitian	21
<u>VI</u>	HASIL	21
<u>VII</u>	PEMBAHASAN	31
<u>VIII</u>	KESIMPULAN DAN SARAN	34
<u>VIII</u>	UCAPAN TERIMA KASIH	35
<u>IX</u>	DAFTAR KEPUSTAKAAN	35
<u>X</u>	LAMPIRAN	39
<u>XI</u>	PERSETUJUAN ETIK	46
<u>XII</u>	RINGKASAN KONSEP PATEN	47
<u>XIII</u>	LEMBARAN PENGESAHAN	48

DAFTAR TABEL DAN GAMBAR

DAFTAR TABEL	Halaman
Tabel 1. Komposisi bahan untuk pembuatan ransum dan kandungan zat gizi makro dalam ransum tikus per dalam ransum	18
Tabel 2. Definisi operasional	20
Tabel 3. Kandungan Gizi Makro, ALT dan Bioaktif dalam ransum (6g)	21
Tabel 4. Berat (g) tikus sapih, induk dan anak yang dilahirkan selama penelitian	22
Tabel 5. Uji t Berat Badan (g) Tikus Anak Lahir Sampai Menyusui	23
Tabel 6. Rata-rata Konsumsi Pakan per hari (g) Hewan Coba Tikus Sapih	24
Tabel 7. Rata-rata Konsumsi Ransum-hari (g) Tikus Sapih dengan Uji t	24
Tabel 8. Kadar Hemoglobin (g/dl) dan Serum Albumin (g/L) pada Hewan Coba	25
Tabel 9. Kadar serum Osteocalcin, Ctx-telopeptide dan IGF-1 pada Hewan Coba	26
Tabel 10. Rata-rata kadar Osteocalcin tikus sapih dengan uji t	27
Tabel 11. Kadar serum Zinc (mg/L) pada Hewan Coba	27
Tabel 12. Kadar Kalsium Tulang dan Protein Tulang Hewan Coba	28
Tabel 13. Densitas Tulang (%) pada Hewan Coba	30
DAFTAR GAMBAR	
Gambar 1. Pengaruh PUFA termasuk ALT dalam metabolisme tulang	2
Gambar 2. Tulang Panjang	4
Gambar 3. Tulang Kompak dan Sponge	5
Gambar 4. Struktur Sel Tulang	7
Gambar 5. Endokondrial Ossifikasi Pada Tulang Tibia	7
Gambar 6. Lempeng Epifisis	8
Gambar 7. Struktur Kimia Asam Lemak Terkonyugasi	11
Gambar 8. Mekanisme Kerja CLA pada Osteoclas	11
Gambar 9. Efek Observasi Asam Lemak dengan Kerja Osteoblas dan Osteoclas	11
Gambar 10. Struktur Kimia Antosianin	13
Gambar 11. Genistein dan Daidzen	13
Gambar 12. Mekanisme Selluler Isoflavon menstimulasi Formasi Tulang Osteoblas	14
Gambar 13. Kerangka konsep ALT dalam pertumbuhan tulang	15
Gambar 14. Skema percobaan tiap suplemen	19
Gambar 15. Penurunan BB Induk Tikus dari Bunting Sampai Masa Menyusui	23
Gambar 16. (A) Alat negatoscope Negato-Densitometer merk Gammatec GD-1A Pencil Type Digital, (B) Mesin Rontgen (X-ray) merk Collimax Model R 120 H Tokyo Jepang	29
Gambar 17. Hasil Rontgen tikus, (A) Tikus Kontrol, (B) Tikus Sapih, (C) Tikus Induk dan Anak	30
Gambar 18. Gambar 1-4 menunjukkan Komponen Albumin yang merupakan transport bioaktif dalam darah tiap baris terdiri dari standar/marker, sampel tikus 1, 2, 3 dan seterusnya	31

I. PENDAHULUAN

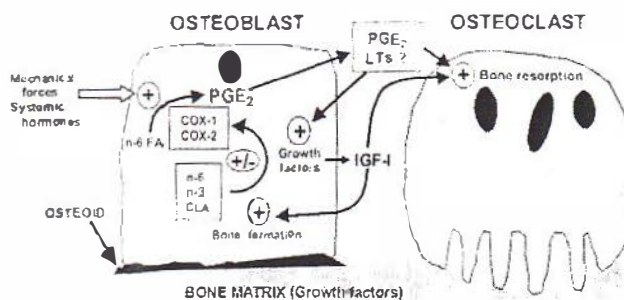
Latar Belakang

Data Riskesdas tahun 2010 menunjukkan angka stunting (pendek) mencapai 35,6% diantara anak-anak Indonesia. Hal ini disebabkan oleh status gizi yang rendah pada waktu dalam janin dan perkembangan pada masa Golden Age. Penurunan angka stunting tersebut akan mendorong peningkatan status gizi anak dan kualitas sumberdaya manusia (Riskesdas 2010).

Sejauh ini upaya penanganan stunting pada balita banyak dilakukan baik dengan pemberian suplemen mengandung zat gizi makro (energi dan protein) dan mikro (vitamin dan mineral antara lain dengan zinc) namun belum berhasil menurunkan angka stunting bahkan balita menjadi severe stunting (sangat pendek) (Lamid A 2011, Arnelia 2006). Pencegahan stunting secara dini terbaik dimulai sejak ibu hamil.

Ibu hamil yang kurang gizi karena kurangnya asupan zat gizi dari makanan berpengaruh terhadap pertumbuhan janin yang beresiko melahirkan bayi BBLR dan panjang badan yang rendah. Bayi ini akan mempunyai hambatan pertumbuhan yang berpeluang tumbuh sebagai bayi atau balita yang stunting, dikemudian hari beresiko menjadi obesitas. Sejauh ini penelitian suplementasi melalui zat gizi mikro (multi gizi) (Sunawang 2005) dan zat gizi makro dan mikro (Hardinsyah 2002) untuk ibu hamil belum optimal menurunkan angka stunting pada bayi dan anak. Diduga suplemen yang diberikan kurang mengandung asam lemak tidak jenuh ganda (Poly Unsaturated Fatty Acid=PUFA). Pada penelitian dengan hewan coba penambahan PUFA termasuk asam lemak terkonyugasi (ALT) atau conyugated linoleic acid (CLA) dapat meningkatnya massa tulang dan menurunkan lemak adipose (Steven W and Martha A. 2011).

Asam lemak terkonyugasi merupakan isomer dari asam linoleik (LA:18:2) (18-20) yang termasuk salah satu dari PUFA pada umumnya ditemukan pada posisi cis-9,trans-11 (c9t11) dan trans-10,cis-12 (t10c12) keduanya mempunyai aktifitas biologis. Pengaruh PUFA termasuk ALT pada metabolisme tulang dijelaskan dalam gambar dibawah ini:



Gambar 1. Pengaruh PUFA termasuk ALT dalam metabolisme tulang

Pada Gambar 1 menunjukkan 2 mekanisme ALT atau conjugated linoleic acid (CLA) pada pertumbuhan tulang. Pertama, ALT berpengaruh terhadap perubahan alur siklooksigenase pada pembentukan tulang, secara langsung melalui produksi biosintesa Prostaglandin E (PGE₂) atau tidak langsung melalui Insulin-like growth Factor-1 (IGF-1). Kedua, leptin dan ALT terhadap deposit mineral tulang (Watkins and Seifert, 2000). Osteoclast dipengaruhi oleh molekul yang larut atau terikat dengan membrane sel yang diproduksi oleh osteoblast. Dengan demikian osteoblast mendorong proses pembentukan tulang menjadi lebih tinggi (Rahman et al. 2006). Hal ini menyebabkan absorpsi kalsium akan meningkat oleh adanya asam lemak terkonyugasi (Kelly et al, 2003).

Asam lemak terkonyugasi sangat banyak ditemukan dalam makanan laut maupun darat dapat digunakan untuk meningkatkan mutu makanan yang bermanfaat bagi kesehatan manusia. Asam lemak terkonyugasi mempunyai dampak bagi metabolisme kalsium untuk tulang, tetapi kurang berpengaruh pada pertumbuhannya. Selain asam lemak terkonyugasi, potensi protein dan bioaktif ternyata juga dapat membantu metabolisme tulang sehingga memanfaatkan potensi asam lemak terkonyugasi dan bioaktif secara bersama-sama dapat meningkatkan pertumbuhan tulang (Anonym, 2003; Kelly et al 2003; Chen et al 2008).

Sumber daya genetika makanan Indonesia cukup beragam dan pemanfaatan sumber daya ini selain membantu peningkatan ekonomi daerah dan juga sumber daya manusia yang memilikinya. Oleh karena itu pemanfaatan potensi bioaktif dalam makanan berpotensi sebagai perlindungan kekayaan sendiri dan manfaatnya bagi masyarakat.

Peranan bioaktif dalam menstabilkan metabolisme tulang terjadi dengan adanya flavonoid dalam makanan sumber protein (Chang et al, 2003) dan sumber energi (Chen et al., 2008), sehingga pertumbuhan tulang meningkat dan densitas tulang lebih tinggi.

Penambahan bioaktif baik dari sumber energi dan protein membantu absorpsi mineral dan menstabilkan proses pembentukan tulang.

Penelitian ini terdiri dari tahun I mendisain teknologi formulasi suplemen dan manfaat asam lemak terkonyugasi dan bioaktif dalam ransum untuk pertumbuhan pada tulang dengan hewan coba (tikus) dan tahun II-III menguji manfaat suplemen pada ibu hamil dan anak balita.

a. Masalah Penelitian

Suplemen yang diberikan pada ibu hamil dan balita selama ini kurang mengandung PUFA sehingga pertumbuhan janin dan pertumbuhan bayi dan balita belum optimal dalam meningkatkan pertumbuhan tulang. PUFA termasuk ALT berperan dalam pembentukan tulang pada hewan coba. Optimasi ALT pada pertumbuhan tulang sejak dari janin sampai balita sampai saat ini belum diketahui.

b. Pertanyaan penelitian

Timbul pertanyaan apakah suplemen dengan penambahan ALT lebih dapat meningkatkan pertumbuhan dibandingkan dengan suplemen biasanya? dan apakah dengan penambahan bioaktif (antioksidan) pada suplemen ALT lebih dapat meningkatkan pertumbuhan tulang lebih tinggi dari pada hanya dengan penambahan ALT saja?.

c. Pertimbangan (justification) fokus

Selama ini suplemen untuk ibu hamil dan balita yang ada, belum dapat menanggulangi balita pendek. Oleh karena itu perlu dicari zat gizi dan bioaktif yang dapat meningkatkan pertumbuhan tulang sejak janin sampai balita. Penelitian pada hewan coba dewasa telah membuktikan bahwa ALT dapat meningkatkan pertumbuhan tulang. Selain itu bioaktif (antioksidan) diketahui dapat sebagai penstabil dalam meningkatkan pembentukan tulang. Dengan demikian penelitian pada hewan coba usia sapih dan bunting diberi ransum ALT dan zat bioaktif akan dilakukan untuk mempelajari peningkatan pertumbuhan tulang pada anak dan ibu hamil yang diberi makanan tambahan

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Kerangka Manusia

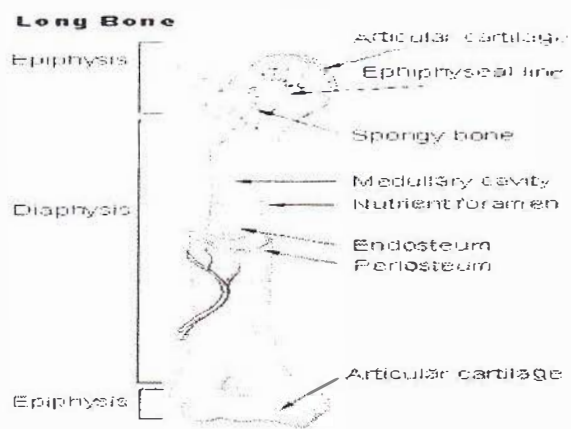
Kerangka (skeleton) manusia terdiri dari susunan berbagai macam tulang termasuk cartilage (tulang rawan). Total sebanyak 213 buah tulang yang saling berhubungan atau bersendi. Tulang dan cartilage yang membentuk kerangka tubuh melindungi berbagai organ, jaringan dan sel tubuh (Syaifuddin 1992).

Cartilage merupakan jaringan ikat yang tidak kaku, elastis dan mudah dibengkokkan dari pada tulang. Cartilage terdiri dari sel-sel khusus yang disebut kondroblas yang banyak menghasilkan matriks ekstraseluler yang terdiri dari serat kolagen. Ada tiga jenis cartilage yaitu cartilage elastis, hialin dan fibrosa. Kondroblas yang terjebak dalam matriks disebut kondrosit (Partodihardjo P 1987).

Tulang merupakan jaringan ikat yang keras dengan zat interseluler yang keras pula. Fungsi tulang yaitu memberi bentuk dan penguat tubuh; sebagai pelindung alat tubuh yang vital; tempat untuk melekat otot; sumsumnya membentuk sel-sel darah merah; sebagai gudang penyimpanan mineral zat perekat dan zat kapur dan pertukaran ion kalsium, fosfat (Syaifuddin 1992).

Bentuk Tulang

Bentuk tulang-tulang pada rangka manusia terdiri atas: a) tulang panjang, b) tulang pendek; c) tulang pipih dan d) tulang tak beraturan yang berbentuk rongga, contohnya adalah tulang belakang. Tulang panjang: merupakan tulang utama dari anggota badan terdiri dari batang dan dua ujung yang membentuk sendi (Syaifuddin 1992).



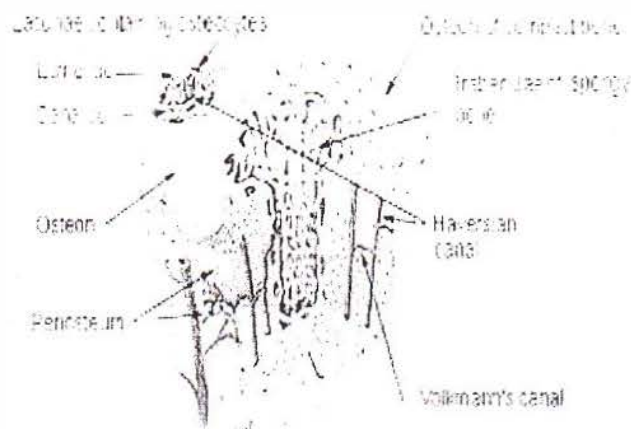
Gambar 2. Tulang Panjang

Bagian tulang panjang terdiri dari 1) diafisis merupakan tulang padat/kompak; 2) epifisis merupakan ujung tulang panjang lebih besar dari batangnya dan dibentuk dari tulang rawan 3) lempeng epifisis adalah bagian epifisis merupakan zona pertumbuhan dan bagian tulang baru disebut metafisis. Epifisis dan metafisis terdiri trabekula (balok) yang saling menyilang tidak beraturan membentuk tulang spongiosa dan ruang trabekula dipenuhi sumsum. 4) articular cartilage merupakan lapis tipis dari cartilage hialin yang menutupi epifisis; 5) periosteum terdiri dari 2 lapisan yaitu: a) lapisan fibrosa luar terdiri dari pembuluh darah, saluran limpa, syaraf; b) lapisan osteogenik dalam terdiri dari serat elastis, pembuluh darah, sel osteoprogenitor, osteoclast dan osteoblast; 6) rongga sumsum (medulla) berisi sumsum merah dan kuning; 7) permukaan dalam tulang padat dilapisi oleh lapisan tipis bersel yang disebut endosteum. Sel osteoprogenitor dan osteoblast dalam lapisan endosteum dalam medulla cavity juga mengandung osteoclast yang menyebar. Pada ujung tulang terdapat banyak lubang (foramen) tempat masuknya pembuluh darah (Tortora G and Anagnostakos N, 1990).

Struktur tulang dan struktur sel

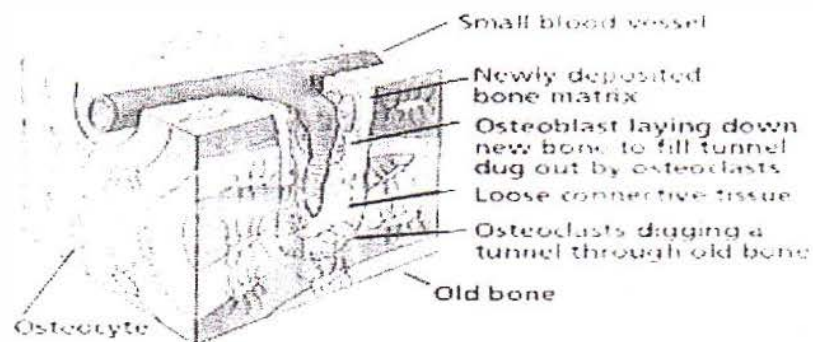
Struktur tulang ada dua macam yaitu tulang kompak (kortikal) dan tulang trabekular (sponge atau cancellous). Tulang kompak adalah lapisan luar tulang yang keras warna putih, dan padat. Sedangkan tulang trabekular merupakan jaringan sel terbuka berpori yang membuat organ secara keseluruhan lebih ringan dan memungkinkan ruang untuk pembuluh darah dan sumsum (Partodihardjo P 1987):

Compact Bone & Spongy (Cancellous Bone)



Gambar 3. Tulang Kompak dan Sponge

Struktur sel yang menyusun tulang terdiri dari 1). Osteoblas adalah sel pembentuk tulang (remodeling tulang) yang diturunkan dari sel Osteoprogenitor. Osteoblas adalah sel-sel tulang yang belum matang, dan akhirnya menjadi terperangkap dalam matriks tulang menjadi osteosit sel tulang dewasa 2) Osteosit berasal dari osteoblas yang telah bermigrasi dan terjebak yang dikelilingi oleh matriks tulang. Osteosit merupakan sel-sel tulang yang matang. Fungsinya untuk pembentukan tulang, pemeliharaan matriks, dan homeostasis kalsium dan 3). Osteoklas adalah sel-sel yang bertanggung jawab untuk resorpsi tulang yaitu memecah tulang (Tortora G and Anagnostakos N, 1990)..

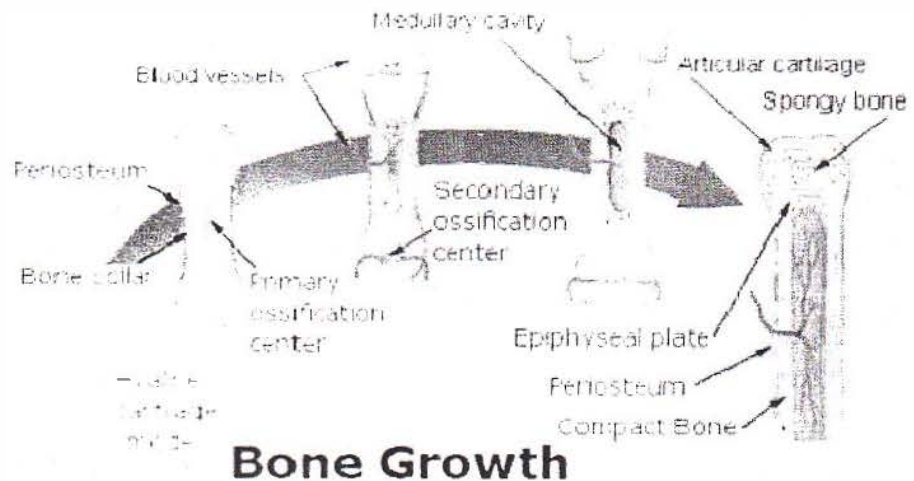


Gambar4. Struktur Sel Tulang

Fisiologi pembentukan tulang (bone formation)

Proses pembentukan tulang disebut ossifikasi atau osteogenesis. Pembentukan kerangka manusia dimulai dari embrio yang terdiri dari membran fibrosa dan cartilage hialin. Osteogenesis mulai dari minggu ke 6 atau 7 kehidupan embrio dan berlanjut sampai usia dewasa. Ada 2 tipe pembentukan tulang yaitu 1) intra membran ossifikasi dan 2) endokondrial ossifikasi (Tortora G and Anagnostakos N, 1990).

Setelah kedua osifikasi (pertama dan kedua) terjadi, jaringan tulang segera menggantikan cartilage. Cartilage yang menutupi permukaan articular disebut articular cartilage sedangkan daerah antara epifisis dan diafisis disebut lempengan epifisis yang bertanggung jawab untuk pertumbuhan panjang dari tulang panjang (Tortora G and Anagnostakos N, 1990).



Gambar 5. Endokondrial Ossifikasi pada Tulang Tibia

Fisiologi pertumbuhan tulang

Pertumbuhan tulang diketahui dari struktur lempengan epifisis (epiphyseal plate) yang terdiri dari 4 area zona yaitu:

- 1) zona cadangan cartilage. Sel chondrocyte pada zona ini tidak berfungsi dalam pertumbuhan tulang, sel ini hanya berfungsi memasang lempengan epifisis pada tulang dari epifisis.

2) zona cartilage proliferasi: Zona mengatur pembuatan chondrocytes baru dengan pembelahan sel untuk menggantikan chondrocytes yang mati pada permukaan diafisis pada lempeng epifisis.

3) zona cartilage hipertrofi terdiri dari chondrocyte yang lebih besar, yang lebih matang lebih dekat dengan diafisis. Lempeng epifisis memanjang hasil proliferasi sel zona cartilage proliferasi dan matang hasil dari sel dalam zona cartilage hipertrofi.

4) zona matrik kalsifikasi (calcified matrix): hanya beberapa sel tebal dan hampir semuanya sel mati karena matriks intersel (intercellular matrix) yang mengelilingi telah di kalsifikasi. Kalsifikasi pengerasan tulang karena adanya deposit garam kalsium (kapur) (Tortora G and Anagnostakos N, 1990).



Gambar 6. Lempeng Epifisis (Tortora G and Anagnostakos N. 1990).

Pertumbuhan kesamping (diameter) seiring dengan pertumbuhan panjang. Dengan proses ini, tulang yang melapisi rongga sumsum dirusak sehingga rongga bertambah dalam diameter. Pada saat bersamaan, osteoblast dari periosteum menambah jaringan tulang sekitar permukaan luar tulang. Mula-mula pembentukan tulang di epifisis dan epifisis menghasilkan hanya tulang sponge bone. Terakhir, daerah luar dari tulang sponge dirubah menjadi kompak bone.

Cartilage epifisis sel berhenti membelah dan cartilage digantikan oleh tulang. Tulang yang baru dibentuk disebut selaput epifisis (epiphyseal line). Dengan munculnya selaput epifisis pertumbuhan tulang berhenti. Pembentukan tulang akan berhenti pada usia 25 th (Tortora G and Anagnostakos N. 1990).

Pertumbuhan, Modeling dan Remodeling

Tulang mengalami pertumbuhan longitudinal dan radial, modeling dan remodeling selama hidup. Pertumbuhan longitudinal dan radial selama tumbuh kembang terjadi selama masa kanak-kanak dan remaja. Pertumbuhan longitudinal terjadi pada lempeng pertumbuhan, dimana cartilage berproliferasi pada epifisis dan metafisis pada zona pada tulang panjang, sebelum mengalami mineralisasi untuk membentuk tulang baru.

Dua mekanisme biologis, menentukan kekuatan tulang yaitu modelling dan remodelling. Setiap tulang mengalami modeling selama hidup untuk membantu mengadaptasi perubahan biomekanik, dan remodeling untuk membuang tulang tua dan rusak dan menggantinya dengan baru.

Modeling Tulang.

Modeling dapat mengubah bentuk dan ukuran tulang melalui pembentukan tulang oleh sel osteoblas dan melalui pengerusakan tulang oleh sel osteoklas. Tulang bisa melebar atau berubah axis dengan memindahkan atau menambah tulang pada permukaan yang tepat karena pengaruh sel osteoclast dan osteoblast. Secara normal dengan bertambah umur maka tulang melebar untuk merespon terhadap pembentukan tulang baru pada permukaan tulang dan resorpsi tulang pada sel endosteal tulang lama (Clarke B. 2008).

Pengerusakan Tulang.

Kerusakan tulang dimulai dari permukaan osteoklas tulang. Setelah ini, osteoklas mengalami perubahan morfologi yang spesifik. Proses penghancuran tulang dimulai dengan penghancuran asam hidroksiapatit. Setelah itu osteoklas mulai merusak matriks organik (Clarke B. 2008).

Remodeling Tulang

Remodelling atau *bone turnover* adalah proses penyerapan, kehilangan densitas tulang, diikuti dengan penggantian jaringan tulang lama dengan jaringan tulang baru dan hal ini terjadi sepanjang hidup manusia. Remodelling dimulai selama hamil dan berlanjut sampai kematian. Sekitar 10% dari massa tulang orang dewasa dibangun ulang setiap tahun. Tujuan remodeling adalah untuk mengatur homeostasis kalsium (keseimbangan kalsium) dengan cara ini kalsium yang beredar dalam aliran darah yang berbentuk mineral masuk kedalam tulang untuk pembentukan tulang mengimbangi proses resorpsi tulang oleh osteoklas (Clarke B. 2008).

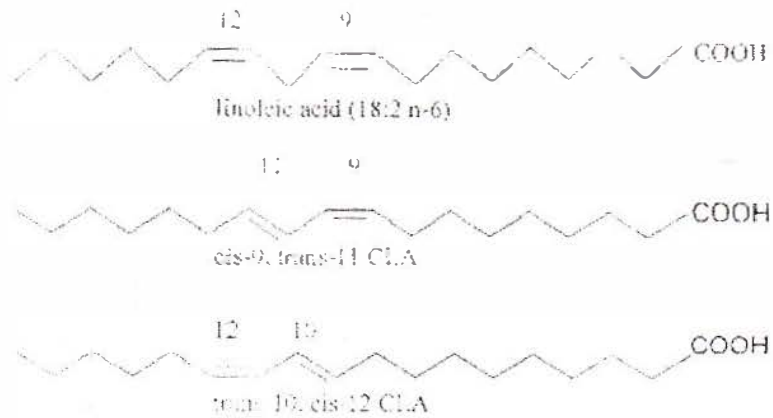
Remodeling tulang merupakan proses dalam tulang oleh populasi sel yang disebut unit remodeling tulang (Ganong 1995). Proses remodeling meliputi tahapan quiescence bone (tulang diam); aktivasi, resorpsi, formasi dan mineralisasi.

Tahapan pertama dimulai penempatan prekursor pada tempat tertentu, kemudian berproliferasi, differensiasi dan kemudian pada tahap aktivasi fusi prekursor ke dalam osteoclast. Pada tahap resorpsi dimana osteoid dan matriks yang telah mengalami mineralisasi dirusak oleh osteoklas. Kemudian osteoklas hilang dan permukaan tulang terdapat mononuclear phagocytes yang menempatkan prekursor osteoblas untuk melakukan proliferasi dan differensiasi pada lokasi remodeling. Pada tahap pembentukan (formasi) sel matang membentuk matriks tulang baru untuk menggantikan tulang yang lama. Pada tahap mineralisasi dimana osteoid mengalami mineralisasi dan lapisan sel terlihat kembali (quiescence)(Gowen 1991).

B. ASAM LEMAK TERKONYUGASI (CONYUGATED LINOLEIC)

Asam Lemak Terkonyugasi (ALT) atau Conyugated Linoleic Acid (CLA) merupakan asam lemak tidak jenuh yang esensial banyak ditemukan dalam makanan yang mempunyai ikatan metilen antara karbon atom C yang berikatan ganda ($-C=C-C-C=C-$). ikatan rangkap mempunyai konfigurasi *cis*. Asam lemak terkonyugasi mempunyai ikatan rangkap konyugasi ($-C=C-C-C=C-$) pada banyak posisi (8 dan 10, 9 dan 11, 10 dan 12 atau 11 dan 13) dan isomer geometri *cis* atau *trans*. Ada beberapa macam asam lemak terkonyugasi diantaranya conyugated linoleic acid (CLA), conyugated linolenic acid (CLN) dan conyugated eicosapentaenoic (CEPA) (Koba and Yanagita 2009)

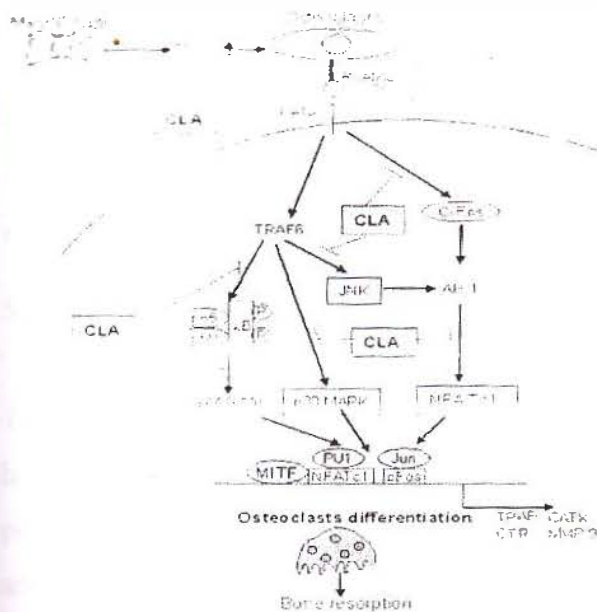
ALT diperoleh dari makanan hewan pemamah biak (ruminansia) seperti sapi, kambing, unta atau produk susu. ALT dihasilkan oleh bakteri *Butyrivibrio fibrisolvens* sebagai perantara dalam proses biohidrogenasi dari linoleic acid menjadi asam stearat (Chin et al 1992). Selain itu juga tersedia ALT sintetis dipreparasi dari linoleic acid oleh katalin isomerisasi (Reaney et al 1999), secara komersial ALT biasanya dipersiapkan dengan metode ini. ALT merupakan zat gizi yang aman untuk manusia (Whigham et al 2004).



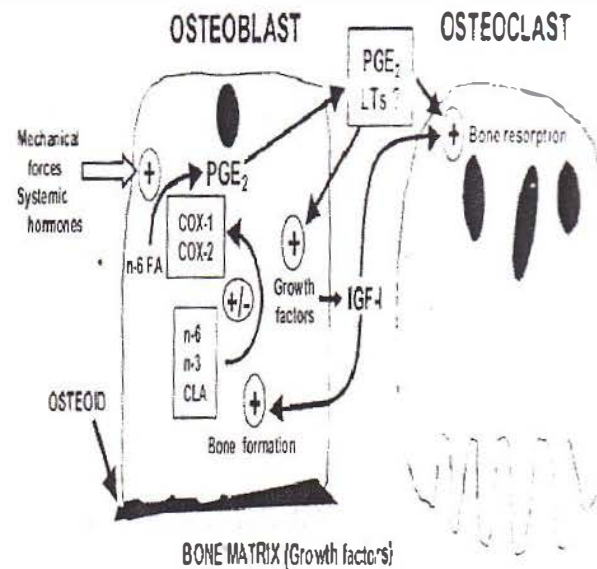
Gambar 7 Struktur Kimia Asam Lemak Terkonyugasi (Koba K and Yanagita T, 2009)

Efek ALT :

1. Efek potensial ALT sebagai zat anti kanker baik dalam penelitian *in vitro* maupun *in vivo* (Ha Y et al 1987) (Takahashi et al 1999)(Futakuchi et al 2002), menurunkan lemak tubuh atau anti obes pada penelitian hewan (Pariza et al 2001, Park et al 1997).



Gambar 8 Mekanisme Kerja CLA pada Osteoklas Differensiasi (Rahman et al 2006)



Gambar 9. Efek Observasi asam lemak dengan Kerja Osteoblas dan Osteoklas (Watkins et al, 2000)

2. ALT menunjukkan peranan positif dalam metabolisme tulang dan kalsium. Penelitian telah menunjukkan ALT peranan positif dalam densitas mineral tulang pada wanita menopause (Park YK et al 1997). ALT meningkatkan formasi tulang

pada sel line osteoblast tikus (Watkins et al 2001). ALT menghambat pembentukan osteoclas melalui penghambatan reseptor aktifator nuclear factor-kB ligand (RANKL) sebagai mediator pembentukan osteoklas (Rahman et al 2006).

3. Penelitian pada tikus muda yang diberi suplementasi ALT berhasil meningkatkan kandungan mineral tulang dan BMD dari tulang trabekular dan kortikal (Banu J et al 2006).

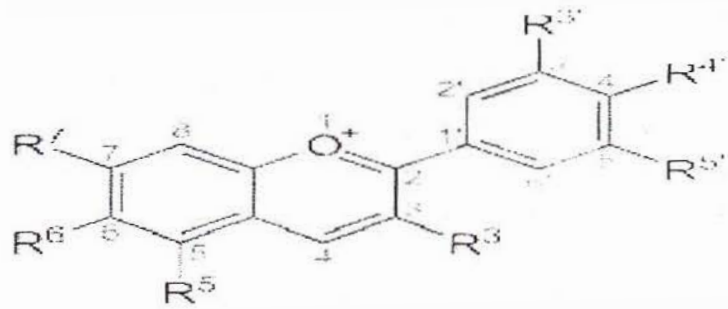
Pada Gambar ditunjukkan ALT dapat menghambat osteoclast differensiasi. Dengan penghambatan produksi TNF- α , maka ALT dimungkinkan menekan produksi RANKL. Selain itu ALT menghambat molekul signaling RANKL seperti NF-kB, JNK dan p38. ALT juga menekan produksi penting formasi osteoclast termasuk c-Fos dan NFATc1. Jadi ALT menghambat diffrensiasi osteoclas dengan modilasi berbagai sitokin, molekul signaling dan transkripsi faktor.

Pada Gambar konsumsi asam lemak tak jenuh ganda termasuk ALT dapat mempengaruhi modeling tulang secara langsung (melalui biosintesa Prostaglandin/PGE) atau tidak langsung (melalui Insulin Like Growth Factor atau IGFs). Efek anabolik dari Prostaglandin E2 (PGE2) terjadi melalui stimulasi produksi IGF-1 endogen osteoblast atau dengan meningkatkan respon sel tulang kepada IGF-1. Konsumsi asam lemak tak jenuh atau ALT mengatur produksi IGF-1 dalam tulang melalui kemampuan PGE2.

C. ANTOSIANIN

Susunan kimia

Antosianin merupakan glikosida larut air dari polyhydroxyl and polymethoxyl. Terdapat 6 macam zat antosianin tergantung dari jumlah dan posisi dari gugusan hidroksilnya yaitu: cyanidin (cy), delphinidin (dp), malvidin (mv), peonidin (pn), pelargonidin (pg) and petunidin (pt) (Ghosh D and Konishi 2007). Sumber antosianin adalah tanaman yang kaya antosianin blueberry, cranberry, and bilberry; anggur, kubis merah dan uwi semacam umbi.



Gambar Struktur Kimia Antosianin

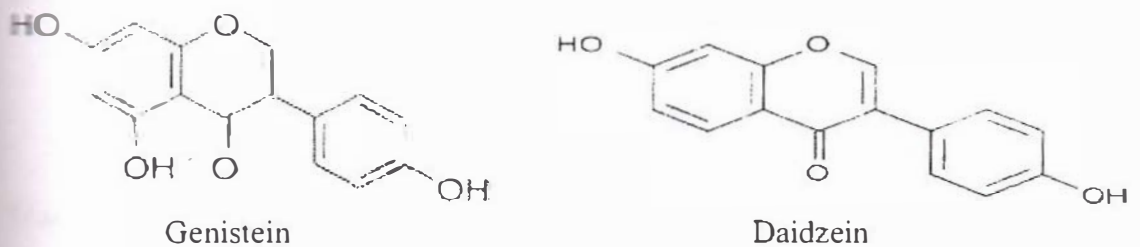
Fungsi antosianin sebagai antioksidan yang kuat dan penstabil reaksi terjadi pada tubuh sehingga dapat melindungi tubuh dari serangan radikal bebas.

D. ISOFLAVON

Isoflavon zat aktif yang tidak larut dalam air termasuk dalam fitoestrogen serupa hormon estrogen biologis yang berasal dari tumbuhan biji seperti kacang kedelai. Unsur utama isoflavon adalah genistein dan daidzein. Secara natural isoflavon mirip dengan 17- β -estradiol dan mempunyai kemampuan yang lemah untuk berikatan dengan estrogen.

Banyak penelitian menemukan efek yang menguntungkan isoflavon terhadap tulang pada hewan (Ishimi Y et al 1999) dan pada manusia (Morabito N et al 2002) selain itu juga banyak dilaporkan isoflavon mempunyai efek terhadap kanker (Lippman and Dickson 1989)

Struktur Kimia isoflavon



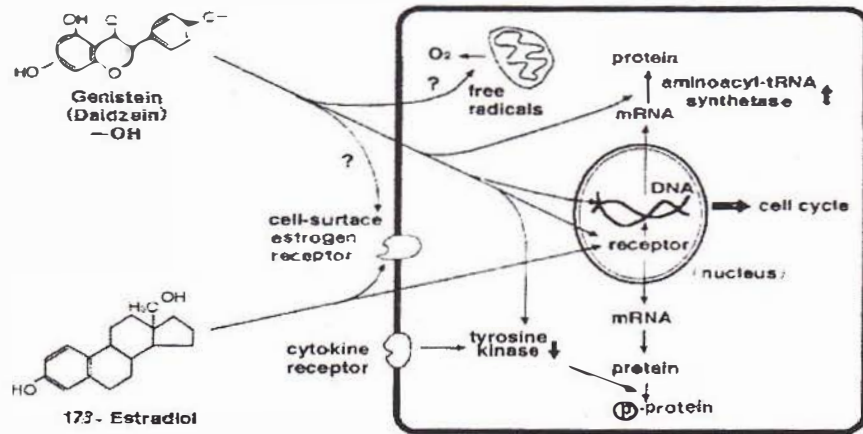
Gambar 11. Genistein dan Daidzen

Genistein dari isoflavon dapat menstimulasi bone formasi dan meningkatkan pelepasan osteocalcin dalam sel osteoblast tikus coba (Haochang et al 2003). Selain itu protein dalam isoflavon dapat meningkatkan proteksi terhadap kehilangan masa tulang

pada wanita menopause (Potter SM 1998) dan perlambatan kehilangan tulang dengan terapi isoflavon sehingga dapat meningkatkan formasi tulang (Somekkawa Y et al 2001). Penelitian pada sel kultur daidzein dan genistein dapat meningkatkan proliferasi dan formasi pada sel osteoblast tikus secara in vitro (Yoon HK 1998) dan menghambat bone resorpsi (Gao YH 1999).

Metabolisme Isoflavon dalam Tulang (Yamaguchi 2002)

Genistein dan daidzein secara langsung mengaktifkan aminoacyl-tRNA sintetase, enzim dalam proses transisi pada sel osteoblast. Isoflavon dapat meningkatkan protein sintesis. Kemungkinan genestein dapat meningkatkan aktifitas transkripsi dengan mengikat pada reseptor estrogen dan atau secara langsung isoflavon pada gen dalam sel.



Gambar 12. Mekanisme selular isoflavon menstimulasi formasi tulang Osteoblast

Genistein secara unik menghambat proses differensiasi sel dari pre-preosteoklas ke preosteoklas, dan isoflavon secara langsung menghambat kerja osteoclast.

III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Manfaat Penelitian

1. Menemukan model suplementasi untuk asam lemak terkonyugasi dan komponen bioaktif yang terkait dengan pertumbuhan tulang yang dapat dimanfaatkan dalam program pencegahan dan penanggulangan balita pendek
2. Mendapatkan paten

Tujuan Penelitian

Tujuan Umum: Mendisain asam lemak terkonyugasi dan zat bioaktif sebagai suplemen dalam pertumbuhan tulang.

Tujuan khusus:

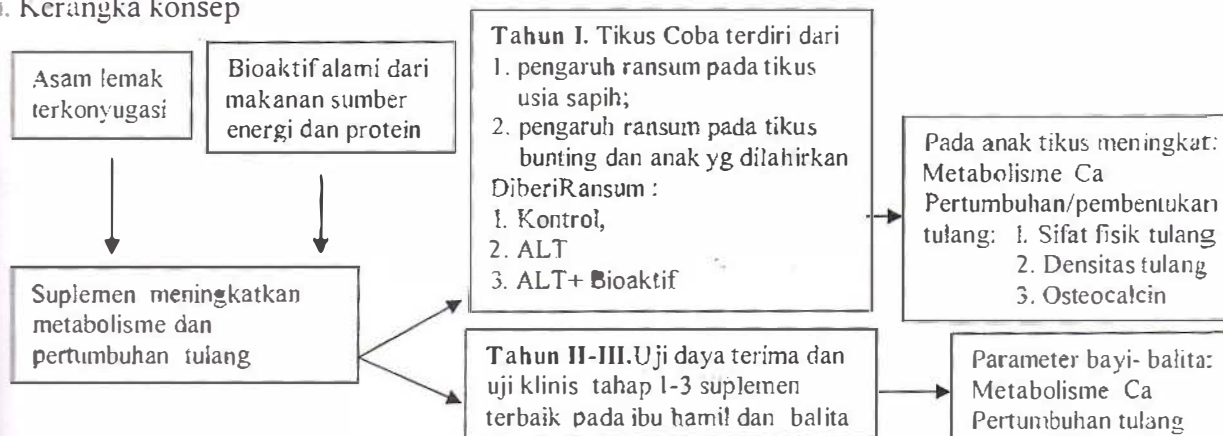
1. Mendisain formulasi diet suplemen yang terkait dengan pertumbuhan tulang pada hewan coba (Tahun I)
 - Menilai pertumbuhan tikus terutama tulangnya
 - Mengukur molekul yang terkait metabolisme tulang
 - Menilai status gizi secara biokimia
2. Menilai manfaat suplemen tersebut terhadap metabolisme dan pertumbuhan tulang pada ibu hamil dan anak balita (Tahun II-III)
 - Mengembangkan formula suplemen bagi ibu hamil dan anak yang mempunyai pengaruh fungsional terhadap tulang
 - Meneliti daya terima dan mutu gizi serta bioaktif lain sebagai suplemen fungsional
 - Meneliti pertumbuhan janin sejak hamil, bayi dan pertumbuhan anak balita
 - Mengukur nilai antropometri dan biokimia bagi bayi dan anak balita

IV . HIPOTESIS

1. Pertumbuhan tulang pada anak tikus sapih yang diberi ALT lebih tinggi dari pada diberi ransum kontrol
2. Pertumbuhan tulang pada tikus bunting lebih tinggi pada yang diberi ALT dan bioaktif (flavonoid dan antosianin) dari pada ransum kontrol

V. METODA PENELITIAN

a. Kerangka konsep



Gambar 13. Kerangka konsep ALT dalam pertumbuhan tulang

Pada tahun I: Pemberian suplemen mengandung ALT, bioaktif dari sumber energi dan protein pada tikus coba usia sapih dan bunting serta anak tikus yang dilahirkan lebih dapat meningkatkan pertumbuhan tulang dan metabolisme kalsium (Ca) lebih tinggi dari pada hanya diberikan ransum ALT

Pada Tahun II-III pemberian suplemen yang mengandung ALT, bioaktif sumber energi dan protein yang diberikan pada ibu hamil dan anak balita lebih meningkatkan metabolisme kalsium dan pertumbuhan tulang dari pada hanya diberikan ALT atau bioaktif saja.

b. Tempat dan Waktu

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Hewan Coba, dan Laboratorium Makanan Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan.

Waktu Penelitian, penelitian dilakukan selama 8 bulan dari bulan Mei sampai bulan Desember tahun 2012

c. Jenis Penelitian:

Penelitian ini merupakan penelitian dasar kesehatan (Th I-II) dan penelitian terapan (Th III)

d. Disain penelitian:

Penelitian ini didesain sebagai penelitian eksperimental murni (Tahun I), dan Uji penerimaan dan uji klinis (Tahun II-III)

e. Populasi dan sampel

Populasi adalah hewan coba (tikus) Sprague Dawley

Sampel adalah tikus sapih umur sapih (2 bulan) dengan berat rata-rata 60-70 gram dan tikus bunting.

Estimasi besar sampel

Besar sampel ditentukan berdasarkan rumus Freederer sebagai berikut $(t-1)(n-1) > 15$. Ada 3 (tiga) perlakuan sehingga jumlah tikus yang dibutuhkan dalam 1 (satu) kelompok perlakuan adalah minimal 9 ekor. Reduction jumlah tikus menjadi 7 ekor masih bisa dilakukan dan dengan asumsi resiko kematian tikus 1 ekor per kelompok masih tersisa 6 ekor tikus perkelompok masih cukup untuk dianalisis. Selain itu

dibutuhkan pula sebanyak 4 ekor tikus dikorbankan awal untuk diambil spesimen darah sehingga untuk kelompok tikus sapih, dan tikus bunting, dibutuhkan masing-masing 32 ekor. Total ada sebanyak 64 ekor tikus. Dalam pelaksanaan penelitian tersebut jumlah anak yang dilahirkan dari tiap induk berbeda tiap kelompok.

f. Variabel:

1. Variabel bebas: kandungan asam lemak terkonyugasi dan bioaktif (flavonoid) dalam ransum yang dikonsumsi, jumlah ransum dikonsumsi tikus
2. Variabel terikat: pertumbuhan tulang, berat tikus, metabolisme tulang dan kalsium

g. Alat, Bahan, Tahapan dan Cara kerja

ALAT. Alat yang digunakan yaitu : timbangan digital, kandang tikus metabolik, peralatan bedah, spuit, kapiler tube, tabung, cool box, freezer, sentrifuse, mikroskop, alat analisa (HPLC, AAS, spektrofotometer dll), form pengamatan klinis tikus, jumlah ransum yang dikonsumsi dan berat badan tikus (Lampiran 1).

BAHAN: Bahan yang digunakan yaitu hewan coba (tikus putih), ransum basal, suplemen (pangan fungsional terdiri dari ALI dengan atau tanpa zat bioaktif isoflavon dan antosianin).

TAHAPAN (1) HEWAN COBA. Penelitian ini menggunakan tikus betina galur *Sprague Dawley*. Untuk tikus sapih (umur 2 bulan) bobot badan rata-rata 60 gram diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan. Pemilihan galur tersebut karena merupakan hewan model yang tepat untuk pengamatan metabolisme dalam menilai pertumbuhan tulang. Sedangkan untuk tikus bunting, diperoleh dengan cara tikus betina usia dewasa dikawinkan, untuk mendapatkan siklus estrus serempak dilakukan penyuntikan menggunakan estradiol 80-120 mg/kg bb. Setiap hari dilakukan pemeriksaan ulas vagina untuk mengetahui kehamilan, bila pada preparat ulas didapatkan sperma maka dipastikan umur kehamilan hari ke-1. Untuk mendapatkan kepastian dilakukan preparat ulas 2-3 hari berturut-turut. Bila hasil preparat ulas didapatkan siklus estrus yang tetap dipastikan hewan telah hamil.

Pemeliharaan Hewan dilakukan dengan tikus yang diteliti ditempatkan pada kandang *poly carbonat* dengan ukuran 425 x 260 x 185mm dengan alas kandang serutan kayu. Hewan ditempatkan pada rak kandang dalam ruangan dengan pencahayaan dan sirkulasi udara

yang baik. Suhu ruangan sesuai dengan suhu 26-27° C, dengan kelembaban udara 26-27%. Pemeliharaan hewan diharapkan memenuhi Refinement. Pemeliharaan hewan oleh Tenaga dokter hewan.

TAHAPAN (2) RANSUM. Pembuatan ransum basal dan suplemen ALT dan bioaktif. Kelompok kontrol mengandung makanan dengan komposisi seperti Tabel 1 dibawah ini. Dosis yang diberikan: Ransum basal yang diberikan adalah 10 g /tikus/hari. Komposisi ransum basal dan suplemen ALT dan bioaktifnya terlihat pada Tabel 1. ALT diberikan asam lemak terkonyugasi dalam bentuk isolate (10g/kg total diet) sehingga ditambahkan tiap kali membuat makanan dengan suplemen ALT 134g. Sedangkan pada suplemen bioaktif antosianin dari sumber energi dari uwi (0,5 %/kg total diet) dan isoflavon darii tempe kedele (60g/kg total diet) dengan demikian komposisi suplemen terlihat dalam Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi bahan untuk pembuatan ransum dan kandungan zat gizi makro dalam ransum tikus per dalam ransum

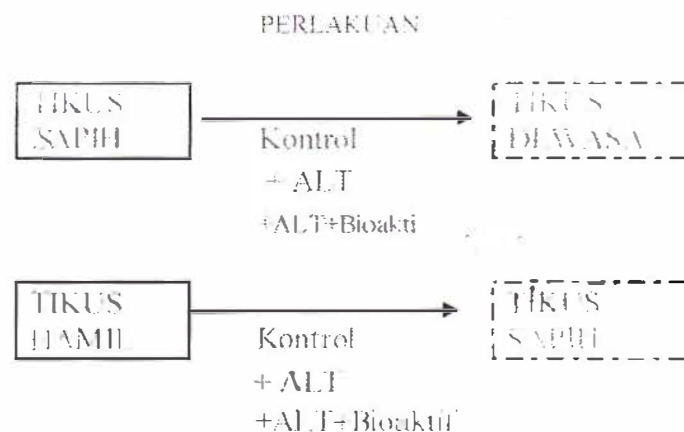
Bahan Ransum	Kelompok perlakuan		
	Ransum Basal (kelompok /kontrol)	Ransum+ALT (kelompok 2)	Ransum+ALT+Bioaktif (kelompok 3)
1. Tepung Beras (g)	5000	5000	4903
2. Kedele Rebus (g)	2500	2500	1697
3. Kacang Tanah (g)	750	750	750
4. Minyak Goreng (g)	125	0	0
5. Vit Mineral Mix (g)	10	10	10
6. ALT (g)	-	134	134
7. Tepung Tempe (g)	-	-	803
8. Uwi (g)	-	-	97

CARA KERJA :

(1) Sebelum intervensi tikus saph dan tikus bunting, dilakukan random kedalam 3 (tiga) perlakuan ransum (ransum basal +ALT dan + ALT dan bioaktif). Terdapat 3 (tiga) perlakuan dan 1 (satu) kelompok untuk dikorbankan. Setiap kelompok terdapat 8 ekor tikus. Semua tikus (yang akan dikorbankan dan mendapat perlakuan) sebelumnya

mendapat ransum basal selama 1 minggu untuk beradaptasi. Berat Tikus ditimbang secara berkala. Sebanyak 4 ekor tikus yang dikorbankan dan dirontgen di RS Hewan Fakultas Kedokteran Hewan IPB, serta diambil darah dan serum. Jumlah serum yang diambil sebanyak 2 ml dari tiap tikus. Dengan sentrifus dan disimpan dalam freezer -20°C . Serum digunakan untuk pemeriksaan biomarker tulang (CTx-telopeptide dan osteocalcin), hormon pertumbuhan (IGF-1), status zink, kalsium, isoflavon, asam lemak tak jenuh (ω -3 dan ω -6) dan hemoglobin dan albumin. Metoda analisis dilihat pada Lampiran 2. Spesimen diambil oleh dokter hewan.

(2) Selama intervensi. Setelah masa adaptasi (7 hari) kemudian secara random 24 ekor tikus sapih dan tikus bunting dialokasi kedalam 3 kelompok perlakuan dengan pemberian ransum 10g/tikus/hari, yaitu: Kelompok I kontrol mendapatkan ransum basal, kelompok perlakuan ALT (II): mendapatkan ransum basal + ALT dan kelompok perlakuan ALT dan bioaktif (III): mendapatkan ransum basal ALT + bioaktif (Gambar 3)



Gambar 14. Skema percobaan tiap suplemen

Keterangan: Kotak gelap merupakan perlakuan 3 macam ransum
Kotak putus-putus merupakan pengukuran hasil perlakuan.

Semua kelompok perlakuan diberikan makanan basal tujuan untuk adaptasi selama seminggu. Untuk tikus sapih, perlakuan diberikan selama 60 hari terus menerus sejak tikus umur sapih, sedangkan untuk tikus bunting selama 21-23 hari (bunting) sampai tikus melahirkan, dan kemudian dilanjutkan dari bayi lahir sampai usia sapih (1 bulan).

Selama intervensi semua hewan ditempatkan pada kandang metabolit, minuman diberikan ransum 10 g/hari. Data yang dikumpulkan selama intervensi adalah (1)

Pengumpulan data konsumsi ransum tikus dilakukan tiap hari dari tiap kandang tikus dengan menimbang dengan alat timbangan digital (2). Penimbangan berat tikus dilakukan tiap minggu menggunakan timbangan digital dan data klinis tikus dicatat bila terjadi kelainan (Lampiran 2).

Pada tikus sapih. Pada akhir pemberian perlakuan diambil sampel tikus untuk dilakukan rontgen untuk pengukuran densitas tulang dan tikus dibius untuk diambil darah menggunakan dietil eter serta diambil tulang femur untuk melihat mineral kalsium dan protein). Pengambilan spesimen dilakukan oleh dokter hewan. Darah diambil dan disentrifus untuk mendapatkan serum dan dianalisis sesuai metoda diatas. Pada tikus anak lahir dari tikus bunting setelah disapih 1 bulan, menggunakan dietil eter dikorbankan. masing-masing kelompok diambil 3 ekor untuk dilakukan pemeriksaan sama seperti diatas.

Semua tikus yang dikorbankan dan tulang maupun sisa spesimen dimusnahkan dengan cara dibakar.

h. Definisi Operasional

Berikut ini uraian definisi operasional beberapa variabel dalam penelitian ini.

Tabel 2. Definisi operasional

Variabel	Deskripsi	Metoda Pengukuran	Skala
Berat Badan tikus	Berat badan tikus dalam gram	Penimbangan	Rasio
Konsumsi ransum	Berat ransum yang dikonsumsi tiap hari dalam gram	Penimbangan	Rasio
Densitas tulang	Berat tulang dibagi dengan volume tulang	Densitometri	Rasio Ordinal
Mineral kalsium tulang	Berat kalsium dalam tulang femoral kering	Penimbangan	Rasio Ordinal
Status Osteocalcin	Petanda biokimia untuk hasil metabolisme osteoblas ada formasi tulang	ELISA	Rasio Ordinal
Status Ctx-telopeptide	Petanda biokimia untuk hasil metabolisme osteoklas pada resorpsi tulang	Immunoassay	Rasio Ordinal
Status Hemoglobin	Kadar Hemoglobin dalam darah dalam satuan	Cyanmethaemoglobin dengan alat spektrofotometer	Rasio, Ordinal
Status Zn	Kadar Zn dalam serum	AAS	Rasio, Ordinal

Variabel	Deskripsi	Metoda Pengukuran	Skala
Status IGF-1	Kadar IGF-1	Radioimmunoassay	Rasio
Status Flavonoid	Kadar flavonoid dari kacang kedele dan uwi dalam serum	HPLC	Rasio Ordinal
Status asam lemak omega-3 dan omega-6	Kadar asam lemak omega-3 dan omega-6 dalam serum	Gas Chromatography	Rasio Ordinal
Status protein	Kandungan molekul protein diukur dengan SDS PAGE	Electroforesis	Rasio

i. Manajemen dan Analisa Data

Pengolahan Data dengan uji T dan Anova untuk data biologis. Kemudian dilanjutkan dengan analisis Duncan apabila ditemukan perbedaan yang signifikan

y. Pertimbangan Etik Penelitian

Penelitian ini menggunakan data yang dikumpulkan dari hewan coba maka diperlukan dimintakan ethical clearance dari Komisi Etik Balitbang Kesehatan, Kemenkes

VI. HASIL

Makanan Suplemen:

Tabel 3. Kandungan Gizi Makro, ALT dan Bioaktif dalam Ransum (6g)

Zat gizi/bioaktif	Ransum Basal (kelompok 1 /kontrol)	Ransum ALT (kelompok 2)	Ransum ALT+Bioaktif (kelompok 3)
1. Energi (kkal)	26	26	26
2. Protein (g)	1.3	1.3	1.2
3. Lemak (g)	0.7	0.7	0.7
4. Karbohidrat (g)	3.7	3.7	3.7
5. ALT	-	0.1	0.1
6. Isoflavon	-	-	0.7
7. Antosianin	-	-	0.1

Komposisi 1-4 dalam tabel adalah komposisi makanan sedangkan suplemennya yakni ALT, isoflavon dan antosianan.

A. Berat Badan dan Konsumsi Ransum Tikus

Berat badan hewan coba yang dikumpulkan dari tikus jenis Sprague Dawley: tikus umur sapih, tikus induk yang diamati mulai dari bunting sampai menyusui, dan tikus anak yang diamati dari lahir sampai usia menyusui.

Tabel 4. Berat (g) Tikus Sapih, Induk dan Anak yang Dilahirkan Selama Penelitian

Hewan coba	Tahap	Kelompok 1 (n)	Kelompok 2 (n)	Kelompok 3 (n)	P
Tikus sapih (jantan+betina)	Awal	70.0±8.4 (n=8)	73.3±11.8 (n=8)	76.9 ± 6.9 (n= 8)	0.315
	Akhir	102.8±25.7 (n=8)	114.3± 9.8 (n=8)	116.0 ± 9.3 (n= 8)	0.252
	Delta BB	33.3±19.2 (n=8)	41.0±17.3 (n=8)	39.1 ± 6.3 (n=8)	0.581
Tikus induk	Bunting	167,2±30,2 (n=6)	194,0± 6,8 (n=6)	180,3±31,9(n=6)	0.522
	Menyusui	135.3±14.9 (n=6)	191.5± 2.1 (n=6)	173.8±45.4(n=6)	0.066
Tikus anak (jantan+betina)	Lahir	3.3±1.3 (n=29)	5.7± 2.1(n=13)	4.2±1.2(n=10)	0.443
	Menyusui	35.8±10.6(n=29)	56.3±14.2(n=13)	43,3±6.7(n=10)	0.003*
	Delta BB	32,5±11.4(n=29)	50.7±12,1(n=13)	39.1±5.7(n=10)	0.010*

Selain itu data berat badan juga dikumpulkan dari tikus sapih dan induk yang dikorbankan pada awal penelitian. Tikus sapih dikorbankan awal dengan rata-rata BB: 67,3 ± 6,1 g dan tikus induk yang bunting dikorbankan awal dengan rata-rata BB: 162,0 ± 23,0 g.

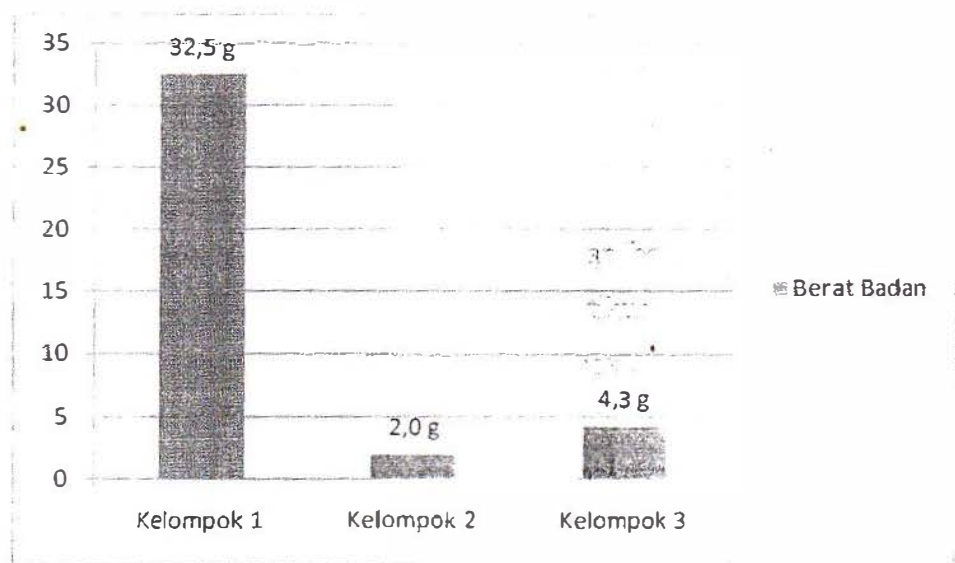
Pengukuran berat badan dilakukan setiap minggu pada kelompok 1;2; dan 3. Data berat badan (BB) tikus selama penelitian disajikan pada Tabel 4. Pada tikus sapih, pada awal penelitian ditemukan rata-rata BB terendah pada kelompok 1 sebesar 70,0 g dan tertinggi pada kelompok 3 sekitar 76,9 g. Pada akhir penelitian kenaikan berat badan yang tertinggi diamati terjadi pada kelompok 2 sebanyak 41,0 g kemudian diikuti kelompok 3 sebesar 39,1 g dan kenaikan yang terendah dijumpai pada kelompok 1 sekitar 33,3 g. Dengan uji Anova tidak ditemukan adanya perbedaan yang bermakna rata-rata BB antara 3 kelompok pada awal dan akhir ($p>0,05$).

Pada tikus induk yang bunting pada awal penelitian mempunyai rata-rata BB terendah pada kelompok 1 dengan BB sebesar 167,2 g dan tertinggi pada kelompok 2 sekitar 194,0 g, dengan uji statistik tidak ada perbedaan yang signifikan BB tikus bunting antar kelompok ($p>0,05$). Rata-rata BB tikus induk umur menyusui menurun dan terjadi

pada semua kelompok dan dengan uji statistik ditemukan penurunan BB antar kelompok tidak bermakna ($p=0,05$).

Pada anak tikus yang lahir, terlihat BB pada kelompok 1 paling rendah yaitu 3,3 g dan yang tertinggi pada kelompok 2 yaitu 5,7 g. Pada tikus anak masa menyusui BB yang tertinggi pada kelompok 2 dan kelompok 3. Ditemukan perbedaan bermakna BB tikus anak yang lahir, tikus anak masa menyusui dan kenaikan BB selama menyusui antara semua kelompok perlakuan ($p<0,05$)

Dibawah ini dipaparkan delta atau penurunan berat tikus sejak bunting sampai menyusui anaknya. Ketiga kelompok rata-rata berat tikus menurun, seluruh tikus bunting kelompok 1 enurun beratnya sedangkan tikus kelompok 2 dan kelompok 3 hanya sebagian kecil tikus yang mengalami kenaikan berat. Ternyata kelompok 2 diamati peenurunan berat tikus selama bunting samapi masa menyusui anaknya terkecil yaitu 2,0 g dan yang paling tinggi penurunannya adalah kelompok 1 yaitu 32,5 g



Gambar 15. Penurunan BB Induk Tikus dari Bunting Sampai Masa Menyusui

Analisa lebih lanjut berat anak lahir sampai anak menyusui dan kenaikan berat badan selama masa menyusui dapat diamati pada 3 kelompok perlakuan dalam Tabel berikut. Ternyata ditemukan ada perbedaan signifikan berat badan lahir, anak masa menyusui dan kenaikan berat tikus anak hanya antara kelompok 1 dan kelompok 2 ($p<0,05$). Pada anak tikus masa menyusui ditemukan ada perbedaan bermakna berat badan antara kelompok 2 dan kelompok 3 dengan kelompok 1 ($p<0,05$).

Tabel 5. Uji t Berat Badan (g) Tikus Anak Lahir Sampai Menyusui

Kelompok	Anak lahir	Anak Menyusui	Kenaikan Berat Badan
Kelompok 1	3,3± 1,3 (n=29)	35,8±10,6 (n=29)	32,5± 11,4 (n=29)
Kelompok 2	5,7± 2,1 (n=13)	56,3±14,2 (n=13)	50,7± 12,1 (n=13)
	P=0,008*	P=0,004*	P=0,014*
Kelompok 1	3,3± 1,3 (n=29)	35,8±10,6 (n=29)	32,5± 11,4 (n=29)
Kelompok 3	4,2± 1,2 (n=10)	43,3± 6,7 (n=10)	39,1± 5,7 (n=10)
	P= 0,062	P=0,043*	P=0,087

B. Konsumsi Ransum per Hari Hewan Coba

Konsumsi ransum tikus dikumpulkan setiap hari dari masing-masing kandang. Kandang tikus dibedakan menurut jenis kelamin dan usia. Di bawah ini hanya diuraikan rata-rata konsumsi ransum tikus sapih setiap hari selama penelitian (Tabel 6).

Tabel 6. Rata-rata Konsumsi Ransum per hari (g) Hewan Coba Tikus Sapih

Tikus	Kelompok 1	Kelompok 2	Kelompok 3	P
Tikus sapih: Jantan	5,9 g	7,0 g	6,8 g	
Betina	5,9 g	5,9 g	6,4 g	
Jantan+betina	5,9 ± 0,2 g	6,4 ± 0,5 g	6,6 ± 0,2 g	0,02*
Tikus induk	10,1 ± 1,4 g	7,6 ± 0,8 g	5,5 ± 0,6 g	0,00*

Rata-rata konsumsi ransum tikus sapih per hari yang paling rendah adalah kelompok 1 sebesar 5,90 g dan tertinggi kelompok 3 sebesar 6,59 g. Sedangkan rata-rata konsumsi ransum kelompok 2 hanya 6,4 g. Bila dibedakan menurut jenis kelamin tikus sapih jantan lebih banyak mengkonsumsi ransum dibandingkan dengan tikus sapih betina pada tiap kelompok.

Tabel 7. Rata-rata Konsumsi Ransum/hari (g) Tikus Sapih dan Tikus Induk dengan Uji t

Kelompok	Tikus Sapih	Tikus Induk
Kelompok 1	5,9 ± 0,03 (n=29)	10,1 ± 1,4 (n=6)
Kelompok 2	6,4 ± 0,6 (n=13)	7,6 ± 0,8 (n=6)
	P=0,024*	P=0,050*
Kelompok 1	5,9 ± 0,03 (n=29)	10,1 ± 1,4 (n=6)
Kelompok 3	6,6 ± 0,2 (n=10)	5,5 ± 0,6 (n=6)
	P= 0,000*	P= 0,000*

Lebih lanjut dengan uji t diketahui kelompok yang mempunyai perbedaan konsumsi ransum yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Di bawah ini

diuraikan rata-rata konsumsi ransum selama penelitian. Ternyata kelompok 2 dan kelompok 3 mempunyai perbedaan konsumsi ransum yang bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p < 0,05$). Demikian juga konsumsi ransum kelompok 2 dan kelompok 3 berbeda secara signifikan dengan konsumsi ransum kelompok kontrol ($p < 0,5$).

C. Gambaran Biokimia Darah: Kadar Hemoglobin, Serum Albumin, Serum Osteocalcin; Serum CTx- telopetide dan Serum IGF-1 pada Hewan Coba

1. Kadar Hemoglobin dan Serum Albumin

Profil kadar hemoglobin dan serum albumin dapat dilihat pada Tabel dibawah ini. Profil biokimia darah hemoglobin menunjukkan keterkaitan dengan metabolisme zat besi dan albumin sebagai biomarker protein tubuh.

Tabel 8. Kadar Hemoglobin (g/dl) dan Serum Albumin (g/L) pada Hewan Coba

Hewan coba	Kelompok 1 (n)	Kelompok 2 (n)	Kelompok 3 (n)	P
a. Hemoglobin (g/dl)				
Tikus sapih (jantan+betina)	13,6 ± 1,7 (n=6)	14,3 ± 1,0 (n=6)	14,3 ± 1,0 (n=6)	0,544
Tikus induk menyusui	16,9 ± 2,5 (n=6)	18,0 ± 5,6 (n=6)	18,6 ± 4,0 (n=6)	0,457
Tikus anak (jantan+betina)	12,5 ± 2,8 (n=10)	15,0 ± 0,0 (n=10)	15,0 ± 3,5 (n=10)	0,282
b. Serum Albumin (g/L)				
Tikus sapih (jantan+betina)	2,75 ± 0,5 (n=6)	3,00 ± 0,0 (n=6)	2,85 ± 0,7 (n=6)	0,508
Tikus induk Menyusui	2,67 ± 0,57 (n=6)	3,00 ± 0,0 (n=6)	3,33 ± 0,57 (n=6)	0,363
Tikus anak (jantan+betina)	2,75 ± 0,45 (n=10)	3,00 ± 0,0 (n=10)	3,00 ± 0,0 (n=10)	0,198

Ket: Tikus sapih dikorbankan awal: kadar Hb: 15,2 ± 3,1 g/dl (n=6); Albumin: 3,0 (n=6)
Tikus induk bunting dikorbankan awal kadar Hb: 16,7 ± 2,5 g/dl (n=3); Albumin: 3,0 (n=3)

Rata-rata kadar serum hemoglobin pada tikus sapih pada akhir penelitian terendah pada kelompok 1 (kontrol) sebesar 13,6 g/dl. Pada kelompok lainnya rata-rata hemoglobin lebih tinggi yaitu pada kelompok 2 dan kelompok 3 yaitu sebesar 14,3 g/dl.

Rata-rata kadar hemoglobin pada akhir penelitian pada tikus induk lebih rendah pada kelompok 1 yaitu sebesar 16,9 g/dl. Rata-rata serum hemoglobin pada kelompok 2 dan kelompok 3 sekitar 18,0 g/dl.

Peningkatan hemoglobin antara kelompok diamati lebih jelas terjadi pada tikus anak. Rata-rata hemoglobin terendah tetap pada kelompok 1 (kontrol) yaitu 12,5 g/dl. Peningkatan hemoglobin diamati terjadi pada kelompok 2 dan kelompok 3 menjadi sekitar 15,0 mg/dl.

Walaupun terjadi peningkatan kadar hemoglobin selama penelitian, tetapi tidak ditemukan perbedaan yang bermakna kadar hemoglobin pada tikus sapih, tikus induk dan anak tikus antara 3 kelompok selama penelitian ($p > 0,05$).

Rata-rata serum albumin pada tikus sapih kelompok 1 terendah (2,75 g/L) diantara 3 kelompok. Serum albumin kelompok 2 dan kelompok 3 sebesar 3,00 g/L dan 2,85 g/L. Tidak ada perbedaan yang bermakna serum albumin antara 3 kelompok ($p = 0,508$).

Rata-rata serum albumin tikus induk pada kelompok 1 (kontrol) ternyata lebih rendah dibandingkan 2 kelompok yang lain. Rata-rata serum albumin pada tikus bunting 2 kelompok yang lain lebih besar dari 3,0 g/L. Hasil uji statistik tidak ditemukan adanya perbedaan yang bermakna rata-rata serum albumin 3 kelompok ($p = 0,363$).

Rata-rata serum albumin tikus anak juga ditemukan lebih rendah pada kelompok 1 yaitu sebesar 2,75 g/L. Sedangkan rata-rata serum albumin 2 kelompok yang lainnya nilai serum albumin mencapai 3,0 g/L. Dengan uji Anova tidak ditemukan adanya perbedaan rata-rata serum albumin 3 kelompok ($p = 0,198$).

2. Kadar Serum Osteocalcin; Ctx-telopeptide dan Serum IGF-1 pada Hewan Coba

Secara detail Tabel 9 diungkapkan rata-rata kadar serum Osteocalcin, Ctx-telopeptide dan IGF-1 pada hewan coba: tikus sapih, tikus induk dan tikus anak selama penelitian. Selain itu pada awal penelitian kelompok tikus sapih dikorbankan untuk mendapat rata-rata serum Osteocalcin, Ctx-telopeptide dan IGF-1.

Rata-rata serum Osteocalcin tikus sapih pada kelompok 1 yaitu 81,1 ng/ml nilai ini terendah dibandingkan dengan 2 kelompok yang lain. Dengan uji Anova ditemukan perbedaan rata-rata serum osteocalcin diantara 3 kelompok ($p = 0,002$).

Dengan uji lebih lanjut dibandingkan kadar serum osteocalcin antara kelompok 2 dan kelompok 3 dengan kelompok kontrol pada tikus sapih. Hasil uji disajikan pada tabel

dibawah ini. Ternyata ada perbedaan kadar Osteocalcin kelompok 2 dan kelompok 3 dibandingkan kelompok kontrol

Tabel 9 Kadar serum Osteocalcin, Ctx-telopeptide dan IGF-1 pada Hewan Coba

Hewan coba	Kelompok 1 (n)	Kelompok 2 (n)	Kelompok 3 (n)	P
Serum Osteocalcin (ng/ml)				
Tikus sapih (jantan+betina)	81,14 ± 0,1 (n=4)	91,2 ± 1,8 (n=4)	94,2 ± 0,3 (n=4)	0,002
Tikus induk	66,2 (n=3)	74,3 (n=3)	51,9 (n=3)	
Tikus anak (jantan+betina)	99,3 ± 0,9 (n=5)	105,8 ± 9,6 (n=6)	101,3 ± 2,9 (n=6)	0,252
Serum CTx-telopeptide (ng/ml)				
Tikus sapih (jantan+betina)	<0,01 (n=4)	<0,01 (n=4)	<0,01 (n=4)	
Tikus induk	<0,01 (n=3)	<0,01 (n=3)	<0,01 (n=3)	
Tikus anak (jantan+betina)	<0,01 (n=5)	<0,01 (n=6)	<0,01 (n=6)	
Serum IGF-1 (ng/ml)				
Tikus sapih (jantan+betina)	< 25 (n=4)	< 25 (n=4)	< 25 (n=4)	
Tikus induk	< 25 (n=3)	< 25 (n=3)	< 25 (n=3)	
Tikus anak (jantan+betina)	< 25 (n=5)	< 25 (n=6)	< 25 (n=6)	

Ket: Tikus sapih dikorbankan awal: Rata-rata Serum Osteocalcin: 77,2 ± 34,7 ng/ml
Serum CTx_telopeptide: <0,01 ng/ml; Serum IGF-1 : < 25 ng/ml

Tabel 10 Rata-rata kadar Osteocalcin tikus sapih dengan uji t

Kelompok	Kadar Osteocalcin
Kelompok 1	81,14 ± 0,1 (n=4)
Kelompok 2	91,28 ± 1,8 (n=4)
	P=0,016*
Kelompok 1	81,14 ± 0,06 (n=4)
Kelompok 3	94,22 ± 0,3 (n=4)
	P= 0,000*

Rata-rata serum CTx-telopeptide pada tikus sapih pada 3 kelompok nilainya sama yaitu <0,01 ng/ml. Demikian juga rata-rata serum CTx-telopeptide untuk tikus induk dan tikus anak mempunyai nilai serupa untuk 3 kelompok yaitu <0,01 ng/ml

Rata-rata serum IGF-1 somatomedin pada tikus sapih untuk semua kelompok nilainya <25 ng/ml. Nilai serupa juga ditemukan pada tikus bunting dan tikus anak untuk semua kelompok.

3. Kadar Serum Zinc Hewan Coba

Selain biomarker protein dan tulang juga diambil serum zinc pada hewan coba: tikus sapih; tikus induk dan tikus anak pada 3 kelompok perlakuan. Serum zinc juga diambil dari tikus sapih yang dikorbankan pada awal penelitian.

Tabel 11. Kadar serum Zinc (mg/L) pada Hewan Coba

Hewan coba	Kelompok 1 (n)	Kelompok 2 (n)	Kelompok 3 (n)	P
Tikus sapih (jantan+betina)	1,47 ± 0,8 (n=8)	1,61 ± 0,7 (n=8)	1,68 ± 0,5 (n=8)	0,946
Tikus induk	1,02 ± 0,1 (n=6)	1,47 ± 0,1 (n=6)	1,83 ± 0,2 (n=6)	0,806
Tikus anak (jantan+betina)	0,94 ± 0,2 (n=6)	1,60 ± 0,3 (n=6)	1,35 ± 0,6 (n=6)	0,355

Ket: Tikus sapih yang dikorbankan awal: kadar Zinc: 1,2 ± 0,5 mg/L.

Pada seluruh tikus sapih pada akhir penelitian ditemukan rata-rata kadar serum zinc kelompok 1 sekitar 1,47 mg/L, sedangkan rata-rata kadar serum zinc pada kelompok 2 dan kelompok 3 ditemukan juga relatif sama yaitu sekitar 1,60 mg/L. Hasil uji statistik tidak ditemukan perbedaan yang bermakna rata-rata serum zinc antara kelompok pada tikus sapih, walaupun ada kecenderungan kenaikan rata-rata serum zinc lebih tinggi pada kelompok 2 dan kelompok 3.

Pada tikus induk, kenaikan kadar serum zinc tertinggi dibandingkan dengan kelompok 1 diamati terjadi pada kelompok 3. Dengan uji Anova tidak ditemukan perbedaan yang bermakna kadar zinc antara 3 kelompok ($p > 0,05$).

Pada tikus anak secara keseluruhan pada akhir penelitian tampak rata-rata kadar serum zinc kelompok 1 terendah. Rata-rata serum zinc kelompok 2 dan kelompok 3 lebih tinggi dibandingkan kelompok 1 yaitu sebesar 1,60 mg/L dan 1,35 mg/L. Dengan uji Anova tidak ditemukan perbedaan yang bermakna rata-rata serum zinc pada tikus sapih diantara 3 kelompok ($p = 0,355$), walaupun ada kecenderungan peningkatan pada kelompok 2 dan 3.

Kadar Kalsium dan protein Tulang

Analisa kadar kalsium dan protein tulang telah dilakukan pada tulang tikus sapih, tikus bunting dan tikus anak. Tulang yang diambil dari tulang femur tikus baik terhadap tikus yang dikorbankan awal dan tikus setelah diberikan perlakuan baik kontrol maupun diberikan ALT atau isoflavon.

Kadar kalsium tulang pada tikus sapih dan tikus bunting pada kelompok 2 lebih tinggi dibandingkan dengan dua grup lainnya. Kadar kalsium antara 3 kelompok berbeda bermakna ($p < 0,05$). lebih lanjut dengan uji Duncan ditemukan kadar kalsium kelompok 1 berbeda secara signifikan dengan kelompok 2 dan kadar kalsium kelompok 1 berbeda bermakna dengan kelompok 3 ($p < 0,05$). Walaupun kadar kalsium pada kelompok 2 dan 3 lebih tinggi dari kelompok 1, namun kadar kalsium tulang pada anak tikus tidak berbeda secara nyata antara 3 kelompok ($p > 0,05$).

Tabel 12 Kadar Kalsium Tulang dan Protein Tulang Hewan Coba

Kadar biokimia darah	N	Kelompok 1	Kelompok 2	Kelompok 3
Kalsium Tulang				
Tikus Sapih	8	2915,5 ± 158,5 ^a	4783,5 ± 789,6 ^b	4346,7 ± 337,9 ^c
Tikus Bunting	6	3370,0 ± 90,0 ^a	4285,0 ± 725,1 ^b	4256,0 ± 710,1 ^c
Tikus Anak	6	2909,2 ± 145,0 ^a	3307,7 ± 662,8 ^a	4630,7 ± 877,9 ^a
Protein Tulang				
Tikus Sapih	8	33,6 ± 10,0 ^a	37,2 ± 2,9 ^a	35,0 ± 4,8 ^a
Tikus Bunting	6	31,1 ± 0,1 ^a	54,6 ± 0,1 ^a	48,4 ± 0,1 ^a
Tikus Anak	6	39,5 ± 2,2 ^a	41,7 ± 1,01 ^a	39,6 ± 0,9 ^a

Ket: Angka yang diikuti huruf yang tidak sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$)

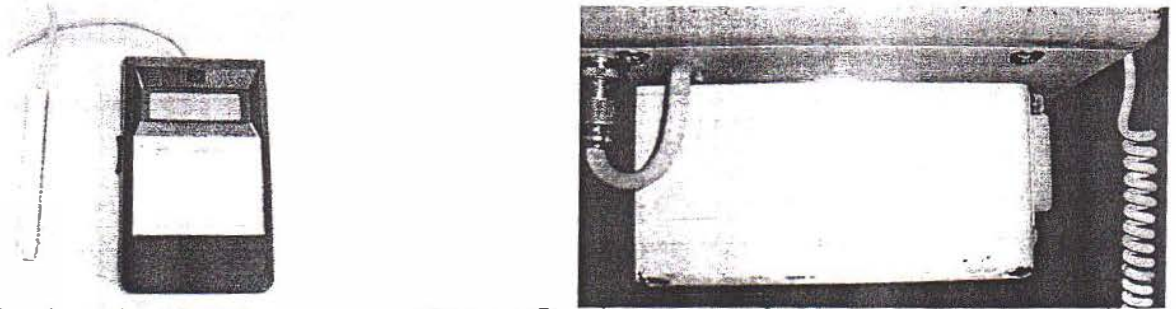
Kadar protein tulang pada tikus sapih, tikus bunting dan tikus anak terlihat lebih tinggi pada kelompok 2 dan kelompok 3, akan tetapi dengan uji anova tidak ditemukan perbedaan yang signifikan kadar protein tulang antara 3 kelompok ($p > 0,05$) Berat badan induk tikus ditimbang sejak kehamilan sedangkan anak tikus ditimbang sejak lahir dan akhir penelitian yaitu mencapai usia sapih. Adapun rincian Berat Badannya tikus induk dan anak tikus disajikan pada tabel dibawah ini.

F. Densitas Tulang Hewan Coba dan Rontgent

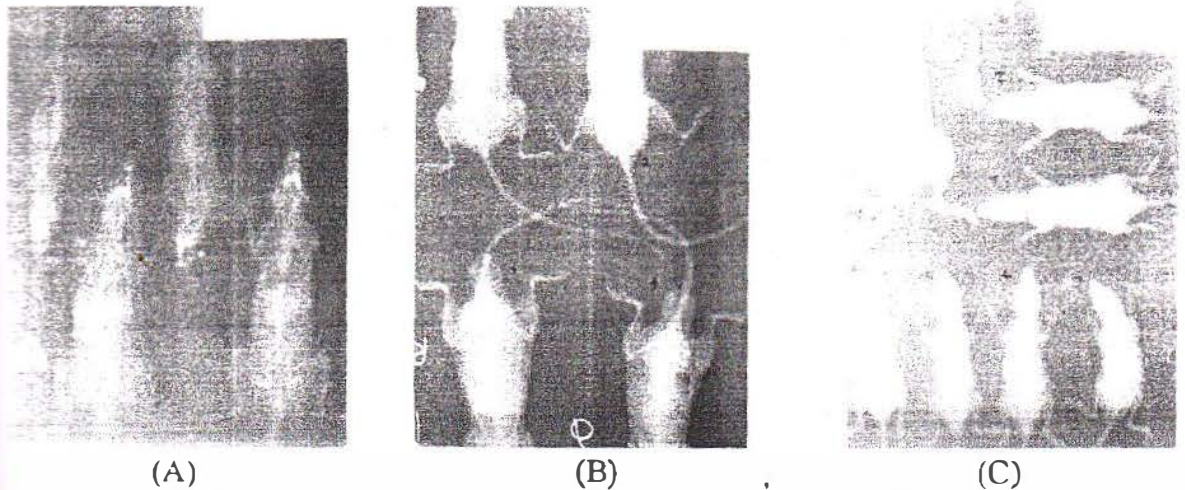
Hasil rongent disajikan dalam gambar ini dapat digunakan image tersebut diukur densitasnya dengan negatoscope dengan membandingkan kerapatan image rongten antara image tulang dengan film pada saat dilakukan pengukurannya.

Densitas tulang dihitung berdasarkan image tulang rongent dengan negatoscopen dengan membandingkan kerapatan ima rongentnya dengan rumus persentase densitas = pembacaan.

Pengukuran kepadatan (densitas) tulang pada hewan coba: tikus sapih, tikus induk dan tikus anak telah dilakukan dalam penelitian ini. Alat yang digunakan adalah alat X-ray khusus untuk hewan tikus kemudian dari photo rontgen dengan alat Negatoscop dapat diukur densitas tulang tikus.



Gambar 16. (A) Alat negatoscope Negato-Densitometer merk Gammatec GD-1A Pencil Type Digital, (B) Mesin Rontgen (X-ray) merk Collimax Model R 120 H Tokyo Jepang.



Gambar 17. Hasil Rontgen (A) Tikus Kontrol, (B) Tikus Sapih, (C) Tikus Induk dan Anak

Tabel 13. Densitas Tulang (%) pada Hewan Coba

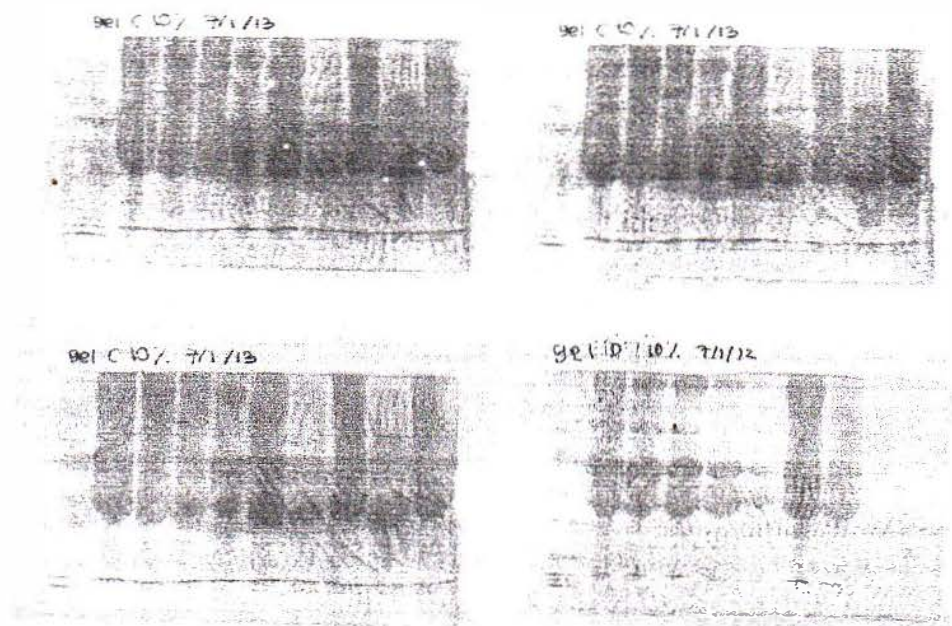
Hewan coba	Kelompok 1 (n)	Kelompok 2 (n)	Kelompok 3 (n)	P
Tikus sapih (jantan & betina)	66,3 ± 3,2 % (n=6)	73,0 ± 8,5 % (n=6)	89,5 ± 1,4 % (n=6)	0,016*
Tikus sapih jantan	64,0 ± 3,2% (n=3)	61,0 ± 8,5 % (n=3)	88,5 ± 1,4 % (n=3)	
Tikus sapih betina	68,5 ± 3,2% (n=3)	73,0 ± 3,2% (n=3)	90,5 ± 3,2 % (n=3)	
Tikus induk	55,5 ± 23,5%(n=5)	59,3 ± 5,1 % (n=5)	55,7 ± 6,4 % (n=5)	0,742
Tikus anak (jantan dan betina)	71,3 ± 11,8%(n=23)	72,0 ± 8,8 % (n=19)	73,5 ± 10,0% (n=18)	0,988
Tikus anak- jantan	70,4 ± 11,8%(n=12)	70,0 ± 8,8 % (n=9)	76,0 ± 10,0% (n=9)	
Tikus anak- betina	70,0 ± 3,2% (n=11)	66,5 ± 3,2% (n=10)	90,0 ± 3,2 % (n=9)	

Densitas tulang pada tikus sapih tampak terendah pada kelompok 1 yaitu 66,3 % dan tertinggi tampak pada kelompok 3 mencapai 89,5%. dengan uji Anova terdapat perbedaan yang bermakna densitas tulang pada 3 kelompok ($p=0,016$)

Densitas tulang pada tikus induk diamati pada kelompok 1; kelompok 2 dan kelompok 3 dibawah angka 60 %. Tidak ditemukan perbedaan yang bermakna densitas tulang pada tikus induk pada 3 kelompok selama penelitian ($p=0,742$)

Densitas tulang pada tikus anak terlihat pada kelompok 3 lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol. Namun secara statistik nilai rata-rata densitas tulang tikus anak antar 3 kelompok tidak signifikan ($p=0,988$).

Hasil Uji Biokimia Darah dan Serum



Gambar 7. SDS-PAGE Serum

Gambar 18. Gambar 1-4 menunjukkan Komponen Albumin yang merupakan transport bioaktif dalam darah tiap baris terdiri dari standar/marker, sampel tikus 1, 2, 3 dan seterusnya

VII. PEMBAHASAN

Pangan Suplemen.

Suplemen makanan tersebut menunjukkan bahwa komposisi suplemen mengandung 0,1 bagian ALT dibandingkan asupan makanan tiap harinya sedangkan isoflavon sebanyak 0,13 bagian serta 0,1 bagian antosianin. Jumlah ini dapat diberikan dalam bentuk makanan aslinya atau ekstrak pada makanan lengkap maka pembuatan suplemen dilakukan untuk memformulasikan makanan tambahan bagi anak-anak atau ibu hamil yang dikenal sebagai Makanan Pendamping ASI atau makanan tambahan ibu hamil (Direktorat Gizi). Formula tersebut dapat diberikan dalam bentuk minuman cair atau makanan padat. Teknologi tepat guna untuk memformulasikan suplemen tersebut dapat dikembangkan untuk lebih meningkatkan asupan gizi keluarga yang bermutu.

Ransum yang dikonsumsi pada kelompok perlakuan yang diberi ALT dan bioaktif lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (Tabel 6) dan diamati konsumsi ransum kelompok 2 dan kelompok 3 relatif sama. Ditemukan perbedaan yang bermakna konsumsi ransum diantara 3 kelompok ($P < 0.05$).

Berbeda pada tikus bunting sampai dengan menyusui konsumsi ransum kelompok 1 lebih tinggi dibandingkan dengan kedua kelompok lainnya ($p < 0.05$). Hal ini disebabkan karena pada tikus bunting terjadi perubahan fisiologis yang mempengaruhi nafsu makan sehingga konsumsinya rendah selain itu adanya tambahan suplemen tempe yang mengandung isoflavon yang berbau langu sehingga tidak disukai yang tercermin konsumsi ransum kelompok 3 terendah yaitu 5,5 g per hari (Tabel 6).

Berat Badan Tikus

Berat badan tikus induk pada masa menyusui menurun dibandingkan pada tikus induk bunting ($p > 0,05$) (Tabel 4) dan penurunan berat tikus selama bunting dan masa menyusui terendah pada kelompok 2 (Gambar 4). Sedangkan berat tikus anak yang lahir ternyata ditemukan lebih tinggi pada kelompok 2 dan kelompok 3 dibanding kelompok kontrol. Tampak ada perbedaan yang bermakna BB pada awal anak lahir dan peningkatan BB selama menyusui antara kelompok 1 dan kelompok 2 ($p < 0,05$). Berat badan tikus sapih kelompok perlakuan pada akhir penelitian meningkat, namun tidak ditemukan perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$),

Peningkatan berat badan pada kelompok perlakuan; kelompok 2 dan kelompok 3 disebabkan pemberian pakan yang mengandung ALT dan bioaktif (isoflavon dan antosianin).

Profil Biokimia (hemoglobin, albumin, osteocalcin, CTx-telopeptide, IGF-1, dan zinc)

Pada tikus induk, kadar hemoglobin lebih tinggi ditemukan pada kelompok yang diberikan ALT dan bioaktif terutama pada kelompok 2 dan kelompok 3 dengan kadar hemoglobin diatas 18,0 g/dl (Tabel 8). Demikian pula pada tikus anak, kadar hemoglobin tinggi ditemukan pada kelompok 2 dan kelompok 3. Pada tikus sapih, kadar hemoglobin darah juga lebih tinggi pada kelompok 2 dan kelompok 4. Hasil uji statistik tidak ditemukan perbedaan kadar hemoglobin tikus induk, tikus anak dan tikus selama penelitian antara 3 kelompok ($p>0,05$).

Serum albumin pada kelompok perlakuan yang diberi ALT dan bioaktif ternyata lebih tinggi dari pada kelompok kontrol (Tabel 8). Dengan uji Anova tidak ada perbedaan serum albumin pada tikus induk, tikus anak dan tikus sapih ($p>0,05$)

Serum Osteocalcin pada tikus induk ditemukan lebih tinggi pada kelompok yang diberi ALT (kelompok 2) lebih tinggi dibandingkan kontrol (Tabel 9). Pada tikus anak jelas terlihat kadar serum osteocalcin pada kelompok perlakuan lebih tinggi terutama pada kelompok 2. Pada tikus sapih dapat juga dilihat kadar serum osteocalcin kelompok yang diberi pakan ALT dan bioaktif lebih tinggi (kelompok 2 dan 3) dibandingkan kontrol, perbedaan kadar osteocalcin kelompok 2 dan 3 dibandingkan kontrol bermakna ($p<0,05$)

Dengan penambahan ransum pada kelompok 2 dan kelompok 3 berupa ALT dan bioaktif ternyata dapat meningkatkan kadar serum zinc pada hewan coba (Tabel 11). Namun dengan uji statistik tidak terbukti ada perbedaan kadar serum zinc pada tikus sapih, tikus induk dan tikus anak ($p>0,05$). Peningkatan kadar serum zinc pada tikus induk dan tikus sapih dimungkinkan karena tambahan mineral mix yang ada dalam pakan terutama dalam kelompok 2 dan 3 dapat digunakan lebih optimal dalam tubuh dengan bantuan ALT dan bioaktif sehingga metabolisme dalam tubuh terutama metabolisme zinc lebih efisien. Sedangkan peningkatan kadar zinc pada tikus anak masa menyusui disebabkan cadangan zinc pada air susu tikus induk masih cukup untuk anak yang dilahirkan sampai masa menyusui.

Densitas Tulang

Foto rongent tulang tikus menunjukkan bahwa desitas gambar relatif lebih besar pada pemberian suplemen ALT dan lebih tinggi lagi pada suplementasi dengan ALT dan bioaktif. Densitas tulang pada kelompok perlakuan yang diberi ALT dan bioaktif pada tikus induk, tikus anak dan tikus sapih lebih tinggi dari pada kelompok kontrol (Tabel 13). Pada tikus induk densitas tulang lebih baik pada kelompok 2. Demikian juga pada tikus anak densitas terbaik pada kelompok 3. Sedangkan pada tikus sapih densitas tinggi (89 %) pada kelompok 3 dan 73% pada kelompok 2. Dengan uji Anova diamati ada perbedaan yang signifikan densitas tulang tikus sapih ($p < 0,05$).

Bila dihubungkan dengan komponen biomarker untuk formasi tulang yaitu yang digunakan serum osteocalcin (Khusida K et al 1998) menunjukkan kadar lebih tinggi pada perlakuan ALT dan ALT dan bioaktif (Tabel 9 dan Tabel 10). Osteocalcin dihasilkan dari sel osteoblast (Gibson RS 2005). Tampak pembentukan tulang lebih baik pada kelompok 2 dan kelompok 3. Sedangkan serum beta cross (CTX-telopeptide) menunjukkan aktifitas sel osteoclast yang menunjukkan nilai rendah yang berarti tulang tidak mengalami pembongkaran. Tampak pembentukan tulang (formasi tulang) tinggi tanpa perombakan tulang pada kelompok 2 dan kelompok 3 sejalan dengan densitas tulang kelompok 2 dan kelompok 3 pada tikus sapih dan tikus anak yang lebih tinggi dari pada kelompok kontrol.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian lain yang menggunakan ALT dalam meningkatkan formasi tulang pada sel line osteoblast tikus (Watkins et al 2001) dan meningkatkan kandungan mineral tulang dan BMD dari tulang trabekular dan kortikal tikus (Banu J et al 2006).

Densitas tulang yang rendah dapat meningkatkan aktifasi sel osteoclast dan meningkatk kejadian fracture tulang (Legrand E et al 2000), oleh karena itu perlu upaya yang dilakukan untuk meningkatkan densitas tuangnya ng tinggi pada usia dini untuk mencegah kejadian fractur di usia dewasa.

VIII. KESIMPULAN DAN SARAN

1. Prototipe suplemen ALT dan bioaktif dijadikan tambahan bagi suplementasi makanan tambahan anak balita terutama kurang gizi serta ibu hamil dalam pencegahan dan penanggulangan pertumbuhan tulang (stunting) pada anak Indonesia. Data densitas tulang, biokimia serta pertumbuhan pada tikus coba menunjukkan suplemen tersebut membantu meningkatkan metabolisme dan pertumbuhan tulang.
2. Pengembangan untuk memanfaatkan hasil tersebut perlu penelitian lanjutan mengenai efikasi dan efektifitas suplemen ALT dan isoflavin dan antosianin pada masyarakat terutama pada anak balita dan ibu hamil.

IX. UCAPAN TERIMA KASIH

Tim peneliti berterima kasih atas bantuan semua pihak dalam melaksanakan kegiatan penelitian ini yang merupakan integrasi kegiatan formulasi, percobaan hewan dan tidak kalah pentingnya adalah fungsi administrasi. Juga kami berterima kasih atas bantuan dari koordinator laboratorium terutama imunologi untuk SDS-Page. Kami mengucapkan terima kasih atas dana penelitian yang dibiayai oleh DIPA Pusat BTDK tahun 2012.

X. DAFTAR KEPUSTAKAAN

- Anonym. Conyugated linoleic acid in human health. Proceedings of a Workshop. Winnipeg Canada. 2003
- Arnelia, Astuti Lamid and Rika Rachmawati. 2011. Pemulihan gizi buruk rawat jalan dapat memperbaiki asupan energi dan status gizi pada anak usia di bawah tiga tahun. Jurnal Gizi Klinik Indonesia 2011; 7(3): 105-111.
- Banu J, Bhattachrya A, Rahman M, O'Shea M., and Fernandes G. 2006. Effect of conyugated linoleic acid and exercise on bone mass in young male Balb/C mice. Lipids Health Dus 5:7.

- Chang H, Jin Ty, Jin WF, Gu SZ and Zhou YF. Modulation of isoflavones on bone-nodule formation in rat Calvaria Osteoblast *in vitro*. Biomedical and Environmental Science 2003; 16:83-89.
- Chen JH, Wu JS, Lin HC, Wu SL, Wang WF, Huang SK and Ho YJ. Dioscorea improves the morphometric and mechanical properties of bone in ovariectomised rats. Journal of the Science of Food and Agriculture 2008;88:2700-2706
- Chin SF, Liu W, Storkson JM, Ha YL, and Pariza MW. 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. J Food Comp Anal. 5(3):185-197
- Clarke B. 2008. Normal Bone Anatomy and Physiology. Clin J Am Soc Nephrol 3:S131-S139
- Futakuchi M, Cheng JL, Hirose M, Kimoto N, Cho Y-M, Iwata T, Kasai M, Tokudome S, and Shirai T. 2002. Inhibition of conjugated fatty acids derived from safflower or perilla oil of induction and development of mammary tumors in rats induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. Cancer Lett. 178(2):131-139.
- Ganong WF. 1995. Fisiologi Kedokteran. Diterjemahkan oleh P. Andrianto J. Oswari (Ed). Penerbit Buku Kedokteran EGC Jakarta
- Gao, Y.H., and Yamaguchi, M. 1999. Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclast: apoptosis is induced through Ca^{2+} signaling. Biol.Pharm Bull. 22(8), 805-809.
- Gibson RS. 2005. Principles of Nutritional Assessment. Second Edition. Oxford University Press. 2005.
- Gowen M 1991, Cytokines and skeletal Disorders. In Cytokine Interactions and Their Control. Baxter. A and Ross R (Eds). Jhon Wiley and son. West Sussex
- Hardinsyah dan Dodik Birawan. Efikasi pemberian biskuit fortifikasi zat gizi mikro terhadap pertumbuhan kehamilan (Efficacy of Micronutrients Fortified Biscuit on Pregnancy Growth). Dalam Seminar and Workshop on Fortified Wheat Flour and Cooking Oil. 19-20 Maret 2002, Bidakara Hotel, Jakarta.
- Ha YL, Grimm NK, and Pariza MW. 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: Heataltered derivatives of linoleic acid. Carcinogenesis. 8(12):1881-1887.

- Heany RP. 2006. Bone Biology in Health and Disease. In Modern Nutrition In Health And Disease. Maurice ES and Moshe S (Eds). Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia.
- Ishimi, Y., Arai, N., Wang, X., Wu, J., Umegaki, K., Miyaura, C., Takeda, A., and Ikegami, S. 2000. Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem.Biophys Res.Commun.* 274(3), 697-701.
- Kelly ●, Cusack S, Jewell C and Cashman KD. The effect of polyunsaturated fatty acids, including conyugated linoleic acid, on calcium absorption and bone metabolism and composition in young growing rats. *British Journal of Nutrition* 2003;90; 743-750.
- Kemenkes. Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2010. Badan Penelitian dan pengembangan Kesehatan, Kemkes. 2010.
- Khusida K, Takahashi M, Kawana K, Inoue T. 1998. Comparison of markers for bone formation and resorption in premenopausal and postmenopausal subjects. *J of Clin Endocrinol and Metab* 50:2447-8.
- Koba Y and Yanagita T. 2009. Beneficial Effects of Conyugated Linoleic Acid. In *Nutrigenomics and Proteomics in Health and Disease. Foods Factors and gene Interactions.* Mine Y, Miyashita K and Shahidi F. (Eds) Wiley Blackwell.
- Lamid A, Amelia, Puspitasari DS dan Irawati A. Optimalisasi pertumbuhan dan perkembangan anak balita gizi buruk melalui peningkatan pemulihan rawat jalan. Laporan Puslitbang Gizi dan Makanan. BadanLitbangKes. 2009
- Legrand E, Chappard D, Pascaretti C, Duquenne M, Krebs, Rohmer V et al. 2000.
- Lippman, M.E., and Dickson, R.B. 1989. Mechanisms of growth control in normal and malignant breast epithelium. *Recent Prog.Horm.Res.* 45:383-440.
- Pariza MW, Park Y, and Cook ME. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res.* 40(4):283-298.
- Park Y, Albright KJ, Liu W, Strokson JM, Cook ME, and Pariza MW. 1997. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids.* 32(8):853-858.
- Park Y, Pariza MW. 2008. Cosupplementation of dietary calcium and conyugated linoleic acid (CLA) improves bone mass in mice. *J Food Sci* 73:C556-C560

- Partodihardjo S. 1987. Ilmu Reproduksi Hewan. Mutiara Sumber Widya. Penabur Benih Kecerdasan, Jakarta
- Potter, S.M., Baum, J.A., Teng, H., Stillman, R.J., Shay, N.F., and Erdman, J.W.Jr. 1998. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am.J.Clin.Nutr.* 68(6 suppl), 1375S-1379S.
- Rahman MM, Bhattacharya A and Fernandes G. Conyugated linoleic acid inhibits osteoclast differentiation of RAW264.7 cells by modulating RANKL signaling. *Journal of Lipid Research* 2006; 47: 1739-1748
- Somekawa, Y., Chiguchi, M., Ishibasi, T., and Aso, T. 2001. Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipid, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Obstet Gynecol.* 97(1), 109-115.
- Steven WI and Martha AB. Impact of conyugated linoleic acid on bone physiology: proposed mechanism involving inhibition of adipogenesis. *Nutrition reviews* 2011;69(3): 123-131
- Sunawang, Utomo B, Hidayat A, Kusharisupeni and Subarkah. Preventing low birt weight through maternal multiple micronutrient supplementation: A cluster-randomized, control trial in Indramayu, West Java. *Food and nutrition Bulletin* 2009;30(4): S495
- Syaifuddin. 1992. Anatomi Fisiologi. Penerbit Buku Kedokteran,EGC. Jakarta
- Takahashi N, Okumura T, Motomura W, Fujimoto Y, Kawabata I, and Kohgo Y. 1999. Activation of PPAR γ inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells. *FES Lett.* 455(1-2):135-139.
- Tortora G and Anagnostakos N . 1990. Principles of Anatomy and Physiology. Harper&Row, Publisher. New York.
- Trabecular bone microarchitecture, bone mineral density, and vertebral fractures in male osteoporosis. *J Bone Miner Res* 15:13-19
- Watkins BA, Li Y, Lippman HE and Seifert MF. 2001. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and skeletal health. *Exp Biol Med*
- Wattkins, B.A., and M.F. Seifert. 2000. Conyugated linoleic acid and bone biology. *J.Am.Coll.Nutr.* 19(Suppl.):478-486.

Whigham LD, O'Shea M, Mohede IC, Walaski HP, and Atkinson RL. 2004. Safety profile of conjugated linoleic acid in a 12-month trial in obese humans. *Food Chem Toxicol.* 42(10):1701-1709.

Yoon, H.K., Chen, K., Baylink, D.J., and Lau, K.H. 1998. Differential effects of two protein tyrosine kinase inhibitors, tyrphostin and genistein, on human bone cell proliferation as compared with differentiation. *Caleif.Tissue Int.* 63(3), 243-249.

LAMPIRAN

LAMPIRAN ANALISIS PROSEDUR PENENTUAN BIOMARKER

1. PENENTUAN ANALISA HEMOGLOBIN (Metode Cyanmethemoglobin)

Prosedur :

1. Membuat larutan Drabkin yaitu dengan mencampurkan reagen (larutan 1 dan larutan 2) masing-masing sebanyak 5 ml ke dalam 1000 ml aquadest.
2. Pipet larutan drabkin sebanyak 5 ml masukkan ke dalam tabung reaksi
3. Pipet **20 μ L** darah kemudian masukkan ke dalam larutan drabkin dan homogenkan
4. Baca dengan Hb Meter
5. Baca juga blanko dengan standar
6. Hasil berupa konsentrasi dengan satuan g/dl.

Nilai normal balita : > 11 g/100 ml

2. PENENTUAN ANALISA SERUM ZINC (Metode Atomic Absorption Spectrophotometer/AAS)

Prosedur:

1. Semua peralatan (cup serum dan glass ware) yang digunakan untuk menampung dan analisa serum dicuci bersih dengan air bebas ion (deionized water, Barnstead 2002)
2. Kemudian rendam dengan HNO_3 10% untuk membebaskan alat-alat dari mineral selama 1x 24 jam
3. Bilas dengan air bebas mineral sebanyak 2 kali kemudian direndam dalam air bebas mineral selama 1x 24 jam
4. Selanjutnya keringkan dalam oven pada suhu 40-50 derajat celcius sampai kering
5. Simpan dalam container-container samapi waktu digunakan

Pembacaan Zinc

1. Buat working standar
2. Keluarkan serum dari freezer, ambil sebanyak **150 μ L** dibuat duplo
Serum bisa disimpan dalam refrigerator pada suhu 4 °C untuk 2-3 minggu sebelum analisa.
Untuk penyimpanan jangka panjang serum disimpan pada suhu ≤ -25 °C
3. Encerkan serum 10 kali dengan pelarut khusus (5-10 menit dalam larutan 6% aqueous butanol atau 10 % asam nitrat.
4. Baca working standar dengan alat AAS
5. Baca serum yang telah diencerkan dengan alat AAS
6. Baca absorbant sampel terhadap kurva standar

Nilai normal zink serum pada balita $\geq 0,7$ mg/L

3. PENENTUAN ANALISA SERUM IGF-1 (Metode ELISA)

Prosedur:

1. Siapkan semua reagen, serum/plasma (sampel) dan standar
2. Tambahkan **100 µL** standar atau sampel pada masing-masing sumur. Inkubasi selama 2 jam pada 37 °C.
3. Tambahkan 100 µL Detection Reagen A. Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C
4. Aspirate dan cuci selama 3 kali
5. Tambahkan 100 µL Detection Reagen B. Inkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C
6. Aspirasi dan cuci 5 kali
7. Tambahkan 90 µL larutan substrat. Inkubasi selama 15-25 menit pada suhu 37 °C
8. Tambahkan 50 µL Stop Solution . Baca pada panjang gelombang 450 nm

Penyimpanan sampel (serum/plasma):

1. Sampel disimpan pada suhu 2-8 °C bila digunakan dalam 5 hari. Jika tidak sampel disimpan – 20 °C (\leq 1 bulan) atau – 80 °C (\leq 2 bulan)

Catatan:

1. Prosedur ini hanya untuk riset dan in vitro buan untuk diagnostik/terapeutik

4. PENENTUAN ANALISA SERUM ALBUMIN (Metode Spectrofotometer)

Prosedur

1. Beri label pada tabung : blanko, standar, reference, pool, dan untuk masing-masing sampel
2. Tambahkan 5,0 ml reagen buffer pada masing-masing tabung.
3. Pada blanko tambahkan 20 µL distilled-deionized water. Pada standar tambahkan 20 µL larutan standar. Untuk reference tambahkan 20 µL reference serum. Pada pool tambahkan 20 µL pooled serum. Untuk masing-masing sampel tambahkan **20 µL serum** yang diuji.
4. Campur masing-masing tabung dan biarkan selama 2 menit.
5. Pindahkan isi masing-masing tabung ke dalam cuvet.
6. Atur spectrophotometer pada panjang gelombang 600 nm.
7. Nolkan lagi spectrophotometer setelah menggunakan reagen blanko.
8. Baca dan catat absorbansi standar, reference, pool dan sampel.
9. Warna akhir didapat paling cepat 1 jam. Sampel yang memiliki lebih dari 6 g/dL albumin akan diencerkan dengan isotonic saline dan diuji kembali kadarnya. Hasilnya akan dikoreksi dengan pengenceran ini.

5. PENENTUAN ANALISA SERUM OSTEOCALCIN (Metode ELISA)

Prosedur:

Sebelumnya siapkan: campuran antibodi.

1. Tambahkan 25 μL standar, control dan sample kedalam tabung reaksi yang sudah diberi tanda.
2. Tambahkan 200 μL campuran antibody ke dalam masing-masing tabung reaksi.
3. Tutup dengan plate sealer dan aluminium foil dan inkubasi selama 1 jam pada suhu ruang, goyangkan pada 350 rpm +/- 100 rpm selama 1 jam.
4. Cuci masing-masing tabung reaksi 5 kali dengan 350-400 μL larutan pencuci.
5. Tambahkan 200 μL HRP substrat pada masing-masing tabung reaksi.
6. Tutup dengan plate sealer dan aluminium foil dan inkubasi selama 20 menit pada suhu kamar.
7. Tambahkan 50 μL stop solution pada masing-masing tabung reaksi
8. Baca absorbansinya pada panjang gelombang 450nm selama 10 menit.

6. PENENTUAN ANALISA DEOXYPYRIDINOLINE (FDPyr) (Metode cross-linked carboxyl-terminal telopeptide)

Analisa cross-linked carboxyl-terminal telopeptide of type I collagen menggunakan Elecsys 2010 automated analyzer (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). (Crofton PM et al 1997).

Prosedur analisa selama 18 menit sebagai berikut:

1. Inkubasi pertama: ambil 50 μl serum sampel dan biotinylated monoklonal anti- β - Cross Lap antibody yang diinkubasi bersama
2. Inkubasi kedua: tambahkan streptavidin-coated microparticle dan monoklonal β - Cross Lap specific antibody label dengan ruthenium complex: kompleks yang terjadi terikat pada fase padat melalui interaksi biotin dan streptavidin
3. Campuran reaksi diaspirasikan ke sel dimana mikropartikel ditangkap ke permukaan elektroda. Senyawa yang tidak terikat kemudian dibuang dengan ProCell/ProCell M. Aplikasi voltase elektroda kemudian mengakibatkan emisi chemiluminescent yang diukur dengan photomultiplier.
4. Hasil ditentukan melalui kalibrasi kurve yang dibangkitkan dengan 2-point kalibrasi dan kurve master melalui reagen barcode

Reagen yang digunakan:

- M:** Streptavidin-coated-microparticles: 1 botol 6,5 mL
Streptavidin-coated-microparticles: 0,72mg/ mL, preservative
- R1:** Anti β -CrossLaps-Ab-biotin (gray cap): 1 botol 10mL
Biotinylated monoclonal anti- β -CrossLaps antibody (mouse) 2,5 mg/L; phosphate buffer 100 mmol/L, pH 7,2 preservative
- R2:** Anti- β Cross Laps-Ab-Ru(bpy) (black cap) ; 1 botol 8 mL
Monoclonal anti- β - CrossLap antibody (mouse) label dengan ruthenium complex 2.4 mg/L; phosphat buffer 100 mmol/L; pH 7,2 preservative

KEPUSTAKAAN:

1. Crofton PM, Wade JC, Taylor MRH and Holland CV. 1997. Serum concentrations of carboxyl-terminal propeptide of type I procollagen, amino-terminal propeptide of type III procollagen, cross-linked carboxyl-terminal telopeptide of type I collagen, and their

7. PENENTUAN ANALISA SERUM ISOFLAVON (Metode LC-MS)

Prosedur

1. Serum dicairkan pada suhu ruang dan diaduk. Ambil serum sebanyak **75 μ L** dan acetonitril sebanyak 1,5 ml ke dalam tabung Eppendorf.
2. Sampel diaduk kemudian disonic selama 10 menit, dan disentrifuse pada 15.000 rpm selama 5 menit untuk mengendapkan proteinnya.
3. Ambil 50 μ L serum campur dengan 1,0 ml citrate buffer (0,1 M, pH 5,0), dan enzyme yang cocok untuk selective dekonjugasi ditambahkan.
4. Enzym-enzym yang ditambahkan adalah 23 U sulfatase/glucuronidase, 0,84 U partially purified sulfatase dan 3,24 U recombinant glucuronidase.
5. Setelah diinkubasi 30 menit pada suhu 37 derajat Celcius, campuran deuterated internal standar berisi masing-masing 5 pmol d3- daidzein dan d4-genistein ditambahkan pada masing-masing sampel.
6. Isoflavon aglycones diekstraksi ke dalam ethyl acetate (3 x 1 ml), pelarutnya dipindahkan ke dalam aliran nitrogen dan residunya dimasukkan dalam methanol yang merupakan sebagian dari total volume akhir (50 μ L)
7. Volume yang tersisa berupa air dan sampel dianalisis dengan LC-ES/MS menggunakan metode ion monitoring untuk mendeteksi ion-ion (M+H)⁺ untuk genistein, daidzen, dan deuterated isotopmers.

8. PENENTUAN ANALISA SERUM ASAM LEMAK (Metode GC).

Prosedur analisa RBC

1. Tambahkan 1,8 ml chloroform, 540 μ L methanol dan 100 μ L larutan internal standar, ke dalam RBC sample yang sudah dicairkan untuk mendapatkan rasio chloroform-methanol 2:1 untuk ekstraksi lemak.
2. Larutan Sodium Chlorida (2%) ditambahkan ke dalam campuran larutan untuk mendapatkan fase pemisahan setelah sentrifugasi yang berikutnya selama 10 menit pss 3030 xg dan 4 derajat celcius.
3. Fase organic lipida adalah fase kering di bawah tekanan reduksi.
4. Ekstrak yang kering dilarutkan dalam 400 μ L chloroform/methanol di atas 20x20 cm silica gel plate dan lemak akan terpisah dengan menggunakan heptana, diisopropyl ether dan asam asetat sebagai fase bergerak. FAME disintesis dalam vial tertutup dengan 3 N methanolic HCl pada suhu 85 derajat celcius selama 45 menit. Sampel dinetralisir dengan campuran sodium karbonat, sodium hydrogen karbonat dan sodium sulfat (1:2:2). FAME diekstraksi 2 kali dengan 1 ml heksana dan dilarutkan dalam 50 μ L heksana berisi BHT (0,2 %).

Penyimpanan: Sampel disimpan dengan suhu -20 derajat celcius sampai analisis GC.

Prosedur analisa serum

1. 2 μ l serum ekstrak diinjeksi pada split mode dengan split rasio 1: 250

2. Temperatur program : 160 °C (10s) sampai 200 °C @ 1.3 °C/s, menjadi 230 °C @ 0,7 °C/s dan terakhir 250 °C (60s) @ 0,6 °C/s. Hidrogen pada 0,2 mL/menit digunakan sebagai carier gas

9. PENENTUAN ANALISA TOTAL PROTEIN

I. Metode : Biuret

II. Reagentia : 1. Reagentia Biuret

NaOH	0.1 N
K-Na-Tartrat	16 mmol/l
KJ	15 mmol/l
Cooper-sulfat	6 mmol/l

2. Blanko

NaOH	0.1 N
K-Na-Tartrat	16 mmol/l

3. Standard

Protein	6 g/100 ml
---------	------------

III. Prosedur :

1. Pipetkan ke dalam tabung reaksi serum atau plasma sebanyak 0,1 ml
2. Pipetkan juga reagentia 1 sebanyak 5,0 ml.
3. Dicampur kemudian diinkubasikan selama 30 menit pada suhu 20-25 derajat C.
4. Extinksi dari sampel diukur terhadap larutan 1 sebagai blanko reagentia (E sampel).
5. Apabila anda tidak dapat mengukur dengan Hg 546 nm, tentukanlah untuk setiap Test-Combination sekali extinksi dari standar (2 kali pemeriksaan). Untuk itu dipakai larutan 3 (standar) sebagai serum atau plasma seperti dalam point no.1 dan extinksi standar dicatat.

10. PENENTUAN KADAR KALSIMUM DAN FOSFOR

a. Pengabuan basah menggunakan HNO₃ dan H₂SO₄

1. Sampel (yang berupa tulang femur, lumbal ke empat dan serum darah tikus) telah diukur volumenya dimasukkan ke dalam labu kjedahl.
2. Ditambahkan 10 ml H₂SO₄ dan 10 ml (atau lebih) HNO₃ dan beberapa buah batu didih dan dipanaskan perlahan-lahan sampai larutan berwarna gelap.
3. Ditambahkan kembali 1-2 ml HNO₃ dan pemanasan dilanjutkan sampai larutan berwarna lebih gelap lagi.
4. Pemanasan dilanjutkan kembali selama 5-10 menit sambil ditambahkan HNO₃ hingga larutan tidak berwarna gelap lagi (semua zat organik telah teroksidasi) kemudian didinginkan.
5. Ditambahkan 10 ml aquadest dan dipanaskan sampai berasap.
6. Larutan didinginkan kembali dan kemudian ditambahkan 5 ml aquades dan dididihkan kembali sampai berasap.
7. Larutan selanjutnya didinginkan dan diencerkan hingga volume tertentu.

b. Penentuan Kadar Kalsium menggunakan Spektrofotometer Absorpsi Atom (AAS)

1. Larutan dari pengabuan basah (tahap A) dengan volume tertentu dipindahkan ke dalam labu takar 50 ml. Kemudian ditambahkan aquades hingga tanda tera dan dicampur rata.
2. Alat AAS di set sesuai dengan instruksi manual.

3. Diukur larutan kalsium standard an blanko.
4. Diukur larutan sampel. Selama penetapan sampel, nilai standar diperiksa secara periodic dan diatur agar tetap konstan.
5. Hasil pengukuran larutan standar selanjutnya dibuat kurva (nilai emisi vs konsentrasi kalsium dalam $\mu\text{g/ml}$).

2. Penetapan Kadar Fosfor metode Molibdat-Vanadat

1. Larutkan 20 g ammonium molibdat dalam 400 ml aquades hangat (50 derajat Celcius) dan kemudian didinginkan.
2. Melarutkan 1 g ammonium vanadat (ammonium meta vanadat) dalam 300 ml aquades mendidih, kemudian didinginkan. Perlahan-lahan ditambahkan 140 ml asam nitrat pekat sambil diaduk.
3. Larutan molibdat dimasukkan ke dalam larutan vanadat dan diaduk. Selanjutnya larutan diencerkan sampai volume 1 liter dengan aquades.

11. PENENTUAN MOLEKULER PROTEIN (Metode Elektroforesis –SDS_PAGE)

Prosedur:

1. Masukkan 10-20 μL sampel ke dalam *laemmli buffer* dengan perbandingan 1:2 atau 1:4 di *eppendorf*
2. Berilah 3 lubang pada tutup tabung *eppendorf*
3. Panaskan sample tersebut dengan *waterbath* 100 °C selama 5 menit
 - a. Siapkan glass plate 10-12 cm dan rangkaikan dengan frame dari Bio-Rad
 - b. Menyiapkan persentase suspensi akrilamid disesuaikan dengan berat molekul protein yang akan dianalisis
 - c. Suspensi akrilamid dimasukkan kedalam glass plate dan ditunggu sampai mengeras (*separating gel*). Lihat larutan *laemmli* no 9.
 - d. Sisir (*comb*) diangkat dengan hati-hati dan cuci dengan larutan penyangga elektroforesis
 - e. Glass plate diletakkan pada frame dan dimasukkan kedalam chamber selanjutnya diisi suspensi akrilamid sebagai *stacking gel*. Lihat larutan *laemmli* no 10.
 - f. Masukkan sisir tepat diatas gel diantara glass plate yang terisi oleh akrilamid dan dibiarkan sampai gel mengeras
 - g. Pada bak elektroforesis diisi *running buffer* dan sampel dimasukkan pada sumuran kolom sebanyak 20 ml. Sebelumnya sampel dilarutkan dalam RSB (*Resolving Sample Buffer*) dan dipanaskan pada air mendidih selama 5 menit
 - h. Elektroforesis (*running*) dijalankan pada kondisi voltase 200 V, 100 mA selama 1-2 jam, tergantung jumlah plate yang dipakai.

12. Foto Rontgent

Foto rontgent dilakukan di RS Hewan, IPN, Bogor

13. Analisis Densitas Tulang dengan negatoscope

Metode Perhitungan Persentase Densitas Dari Hasil Rontgen

$$\text{Persentase densitas tulang} = (A - RL) / (RO - RL) \%$$

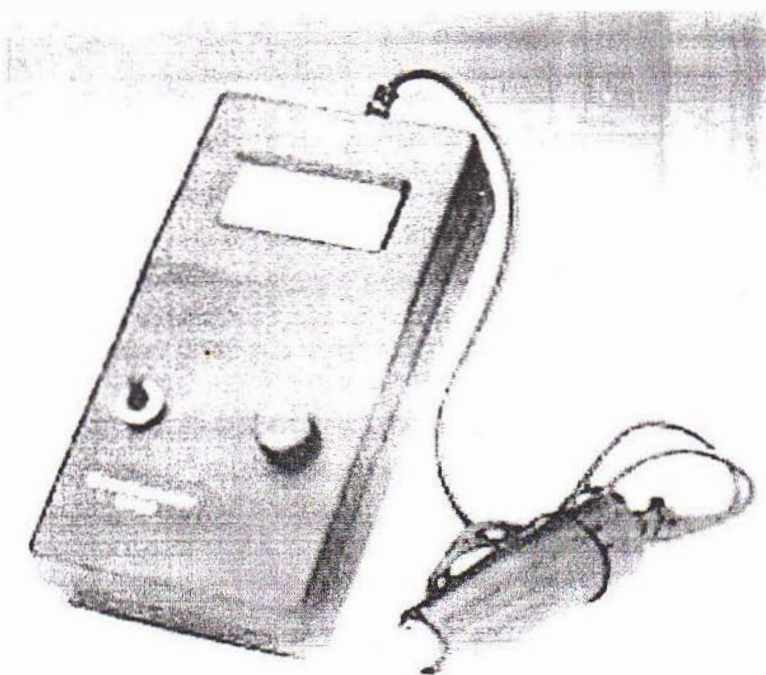
Dimana :n:

A : nilai rata-rata perhitungan densitas (pembacaan negatoscope pada tilang hasil rontgen)

RL : nilai radio lucent (pembacaan negatoscope pada film kosong)

RO : nilai radio opaque (pembacaan negatoscope pada film latar belakang image rontgen)

Gambar alat pembaca negatoscope untuk perhitungan densitas yang digunakan



Densitometer Negatoscope

KONSEP PATEN

Patent yang akan diajukan sebagai luaran penelitian ini akan berbasis pengarus suplementasi ALT dan bioaktif isoflavon dan antosianin terhadap densitas tulang.

Paten formula suplemen tersebut dapat dimanfaatkan dalam program pemberian makanan tambahan paa anak dan ibu hamil

Klaim yang akan diajukan:

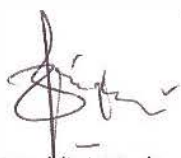
1. Formula suplement untuk makanan tambahan balita dan ibu hamil mengandung asam lemak terkonyugasi, tempe dan uwi
2. Formula itersebut mengandung 2,5% dan 7,0% energi dari total makanan tambahan
3. Formula tersebut diolah: (a) hirolisis (b) composit, (c) dibuat tepung (d) diformulasikan pada makanan tambahan

LEMBARAN PENGESAHAN

PERSETUJUAN ATASAN

Jakarta, 30 Desember 2012

Kepala Bidang
Teknologi Dasar Kesehatan



DR. Dra. Vivi Lisdawati, Apt.
NIP. 19681118199632001

Pengusul



Prof. Dr. Komari, Ph.D.
NIP.195405191979121001

DISETUJUI

Ketua Panitia Pembina Ilmiah



DR. drg Magdarina Destri Agtini, MSc
NIP.195012061984022001

Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar
Kesehatan, Kemkes RI



Drs Onen Dwi Sampurno, Msi, Apt
NIP. 196211191987031001