

Kualitas Tulang Tikus Betina Normal yang Diberi Ekstrak Sipatah-patah pada Masa Pertumbuhan

*THE QUALITY OF BONE GROWTH IN FEMALE RATS
THAT GIVEN SIPATAH-PATAH EXTRACT DURING GROWTH PERIOD*

**Sabri Mustafa¹, Nurhidayat², Koeswinarning Sigit²,
Bambang Pontjo Priosoeryanto³, Wasmen Manalu²**

¹Laboratorium Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Jln. T. Hasan Krueng Kalee No. 4, Telepon 0651 51977, Darussalam Banda Aceh

²Departemen Anatomi Fisiologi dan Farmakologi FKH IPB Bogor

³Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi FKH IPB Bogor

E-mail: mustafa_sabriyosa@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh pemberian ekstrak sipatah-patah (ESP) pada tikus betina masa pertumbuhan dalam mencegah terjadinya osteoporosis. Penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus betina, galur *Sprague Dawley* umur 20 hari yang dibagi secara acak menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol (NOV-0) dan kelompok yang diberi ESP mulai umur 30 hari (NOV-1) selama 150 hari, 60 hari (NOV-2) selama 120 hari, 90 hari (NOV-3) selama 90 hari, dan 120 hari (NOV-4) selama 60 hari dengan dosis 750 mg/kgBB/hari peroral. Pengambilan darah dilakukan setiap 30 hari sekali setelah pemberian ESP untuk pemeriksaan kadar kalsium dan fosfat dalam darah. Pada umur 180 hari, seluruh hewan coba dikorbankan dan selanjutnya dilakukan nekropsi untuk pemeriksaan mikroskopis tulang. Sayatan os tibia-fibula diwarnai dengan metode pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) untuk mengamati densitas osteoblas dan osteoklas dan Masson trichrome untuk mengamati struktur trabekula. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ESP selama masa pertumbuhan dapat meningkatkan pertumbuhan tulang. Kelompok NOV-1 dengan durasi pemberian ESP yang lebih lama (150 hari) menunjukkan pertumbuhan tulang yang lebih baik dengan tulang femur yang lebih panjang, kadar kalsium dan fosfat darah yang optimal, peningkatan densitas osteoblas dan menekan densitas osteoklas dibandingkan dengan tikus kontrol (NOV-0). Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa pemberian ESP lebih awal dan dalam waktu paling lama pada masa pertumbuhan dapat meningkatkan parameter pertumbuhan tulang yang diharapkan dapat meningkatkan kondisi tulang selama masa pertumbuhan.

Kata kunci: ekstrak sipatah-patah, osteoblas, osteoklas, trabekula, kalsium, dan fosfat serum.

ABSTRACT

The experiment was designed to study the effects of sipatah-patah extract (ESP) on bone growth in growing female rats in order to prevent osteoporosis during postmenopausal period. Twenty growing female Sprague Dawley rats in similar body weight were used with the average of age was 20 days old. The experimental rats were randomly divided into 5 (five) groups: control group (NOV-0, administered carboxyl methyl cellulose 1%) and groups administered ESP at the age of 30 days (NOV-1), 60 days (NOV-2), 90 days (NOV-3), and 120 days (NOV-4) with dosage of 750 mg/kg body weight daily. Blood samples were collected every 30 days to analyze serum calcium and phosphate concentrations. At the end of the treatment (180 day old), all of the animals were sacrificed to measure and analyze bone growth histologically. Os tibia-fibula slice was stained by using Hematoxylin Eosin (HE) method to observe osteoblast and osteoclast densities, while Masson trichrome was used to observe trabeculae structure. The results showed administration of ESP in rat during growing period improved bone growth. NOV-1 with longer duration (150 days) showed better growth rate with longer femur, optimum serum calcium, and phosphate concentrations, and higher number of osteoblast with lower osteoclast densities compared to control rats (NOV-0). It was concluded that giving ESP at earlier age with longer duration during growth period could improve bone growth. This condition was expected could also improve the bone conditions during growing period.

Keyword: sipatah-patah extract, osteoblast, osteoclast, trabeculae, serum calcium and phosphate.

PENDAHULUAN

Osteoporosis merupakan masalah kesehatan global dengan ciri kerusakan pada mikroarsitektur massa tulang, dan penyakit ini terjadi pada 150 juta orang di seluruh dunia per tahun. Osteoporosis terjadi karena berkurangnya jumlah estrogen, terutama pada wanita pascamenopause. Estrogen ini sangat diperlukan dalam pembentukan osteoblas di jaringan mieloid sumsum merah pada individu dewasa, di samping faktor nutrisi, hormon paratiroid, vitamin D, sitokin, kortisol, dan aktivitas individu (Smith, 1993). Selain itu, kepadatan tulang yang didapat selama masa pertumbuhan merupakan faktor yang menentukan terjadinya kasus osteoporosis di kemudian hari (Karlson et al., 1995). Kepadatan tulang yang tinggi pada masa pramenopause dapat mempertahankan deposit kalsium tulang sehingga mengurangi kehilangan atau penurunan kalsium pada masa menopause. Dengan demikian, individu dengan kepadatan tulang yang tinggi pada masa pertumbuhan sampai pramenopause akan terhindar dari kejadian osteoporosis pada masa pascamenopause (Compston et al., 1993).

Pencegahan osteoporosis yang baik adalah dengan menjaga keseimbangan kalsium dalam tulang. Hal ini dapat dilakukan dengan menghindari hilangnya kalsium yang berlebihan melalui ginjal dan gangguan penyerapan kalsium oleh usus (Preisinger et al., 1995). Saat ini, sebagian masyarakat berpendapat bahwa osteoporosis dapat dicegah dengan cara meningkatkan asupan kalsium, baik dalam bentuk suplemen tablet maupun dengan cara mengkomsumsi susu berkalsium tinggi.

Sejak dahulu, masyarakat telah mengenal beberapa tanaman untuk mengobati berbagai macam penyakit. Di India, Sri Lanka, dan Malaysia *Cissus quadrangularis* Linn (*Cq*) banyak dipakai untuk mengatasi sakit sendi, sipilis, penyakit kelamin, dan osteoporosis (Shirwaikar et al., 2003). Studi fitokimia pada *Cq* menunjukkan adanya kandungan flavonoid seperti kuersetin dan vitamin C, resveratrol, piceatannol, palidol, asam askorbat, ketosteroid, dan karoten (Swamy et al., 2006), g-amirin, damiron (Mehta et al., 2001), kalsium-fosfat (Tiangburanatham 1996; Sanyal et al. 2005). Di India, *Cq* dikenal sebagai obat tulang (*bone setter*) karena kemampuannya mempertahankan tulang dan di Sri Langka jus akar tanaman ini khusus digunakan untuk mengobati patah

tulang (Sivarajan dan Balachandran, 1994). Shirwaikar et al., (2003) menjelaskan bahwa akar *Cq* sangat berguna untuk pengobatan retak tulang baik diminum maupun digunakan sebagai plester eksternal. Semua senyawa ini mempunyai potensi efek metabolik dan fisiologik yang berbeda (Shirwaikar et al. 2003; Combaret et al., 2004).

Di Aceh, *C. quadrangularis* Salisb telah lama dikenal sebagai tanaman dengan nama sipatah-patah. Tanaman ini mengandung kalsium, fosfat, dan fitoestrogen (Sabri et al., 2009) yang sangat mujarab dipakai sebagai obat patah tulang. Mengingat besarnya potensi tanaman sipatah-patah dan khasiat yang dikandungnya sebagai obat patah tulang, *C. quadrangularis* Salisb yang ada di Aceh diduga berpotensi juga sebagai antiosteoporosis, seperti halnya *Cq* yang ada di India (Shirwaikar et al., 2003). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh sipatah-patah yang ada di Aceh pada tikus masa pertumbuhan. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari daya kerja ekstrak sipatah-patah dalam meningkatkan kualitas mikrostruktur tulang pada tikus betina masa pertumbuhan. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai sumber informasi ilmu pengetahuan dan sebagai bahan pertimbangan dalam penggunaan obat alami yang nantinya dapat dibuat obat herbal terstandar dalam mencegah osteoporosis.

METODE PENELITIAN

Pembuatan Ekstrak Sipatah-patah.

Pembuatan ekstrak sipatah-patah (ESP) dilakukan di Laboratorium Farmasi, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, FKH IPB. Bagian batang tanaman sipatah-patah yang diambil adalah batang yang kemudian dipotong-potong sepanjang sekitar 1 cm, lalu diangin-anginkan sehingga menjadi kering, selanjutnya dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 60°C selama 48 jam. Setelah kering, batang sipatah-patah kemudian dihaluskan dengan penggilingan sehingga menjadi serbuk. Serbuk ini kemudian dimaserasi dengan menggunakan etanol 95%. Ekstrak cair sipatah-patah tersebut selanjutnya dikentalkan dengan rotavapor (*Rotavapor R-205 Buchi® Switzerland*). Ekstrak yang diperoleh dipisahkan kembali dengan kompresor udara menjadi ekstrak kasar hingga mendapatkan

endapan kental. Untuk mempermudah pemberian kepada hewan coba, ekstrak dibuat dalam bentuk suspensi berupa ekstrak cair etanol.

Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus betina (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* umur 20 hari dengan bobot badan 95-100 g sebagai hewan coba. Tikus diberi pakan standar burung super P-588 (PT Indonesia Formula Feed) dan air minum *ad libitum*. Hewan coba ditempatkan di dalam kandang individu dan diadaptasikan terhadap pakan dan lingkungan selama sepuluh hari.

Pemberian Ekstrak Sipatah-patah

Tikus umur 20 hari dibagi secara acak menjadi lima kelompok perlakuan masing-masing sebanyak 4 ekor. Tikus-tikus pada kelompok kontrol diberikan karboksimetil selulosa (CMC) 1% (NOV-0), sedangkan tikus kelompok perlakuan diberi ESP mulai umur 30 hari (NOV-1), 60 hari (NOV-2), 90 hari (NOV-3), dan 120 hari (NOV-4). Pada tikus-tikus kelompok perlakuan, ESP diberikan setiap hari dengan dosis 750 mg/kgBB/hari (Shirwaikar *et al.*, 2003) dengan cara pencekokan (peroral) menggunakan sonde lambung. Penimbangan bobot badan dilakukan limabelas hari sekali dan pengambilan darah dilakukan setiap 30 hari sekali untuk pemeriksaan kadar kalsium dan fosfat darah. Analisis kadar kalsium dan fosfat dilakukan di Fakultas Perternakan, Institut Pertanian Bogor, dengan menggunakan *Atomic Absorbance Spectrophotometric* (AAS) Hitachi® 5000 untuk kalsium, sedangkan untuk analisis fosfat menggunakan metode *spectrophotometry* (*Spectronic Camspecs*® LW-200). Pada akhir perlakuan, yaitu umur pada 180 hari, seluruh hewan coba diambil sampel darahnya dan selanjutnya dieuthanasi untuk dilakukan nekropsi untuk pengambilan kerangka tulang, organ hati, dan ginjal. Sampel tulang tibia-fibula difiksasi dalam larutan pengawet paraformaldehid 4% dan dilakukan dekalsifikasi dalam larutan asam nitrat 5%, selanjutnya tulang diproses dengan metode histokimia standar (Humason, 1967) dan ditanam dalam blok parafin. Blok parafin dipotong dengan mikrotom rotary secara serial dengan ketebalan 5 µm. Sayatan tulang kemudian diwarnai dengan Hematoksin Eosin (HE) dan Masson Trichrome (Humason, 1967). Selanjutnya dilakukan

pengamatan atas mikrostruktur trabekula, osteoblas, dan osteoklas. Metode penghitungan jumlah osteoblas dan osteoklas dilakukan sebanyak sepuluh lapang pandang dengan perbesaran objektif 40X.

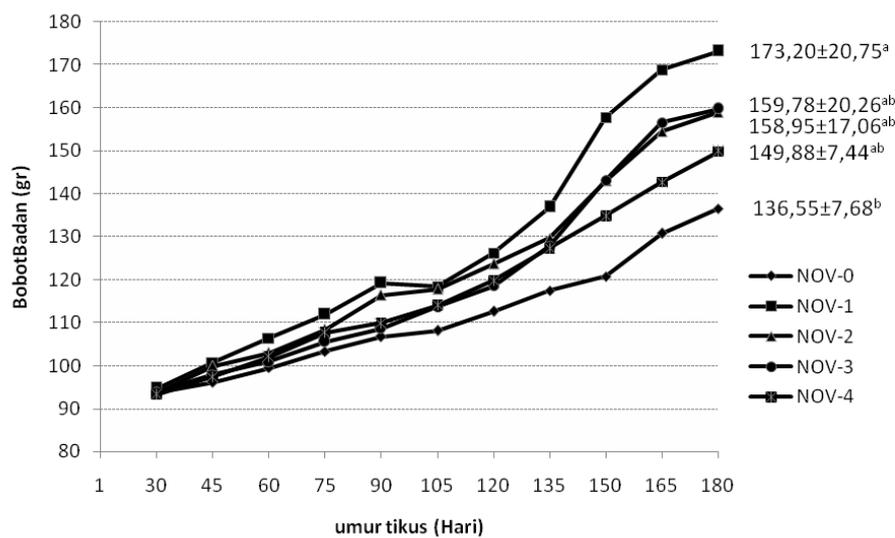
Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pemeriksaan kadar kalsium dan fosfat darah dianalisis dengan sidik ragam/anova dilanjutkan dengan Duncan tes sedangkan trabekula, osteoblas, dan osteoklas dianalisis secara diskriptif.

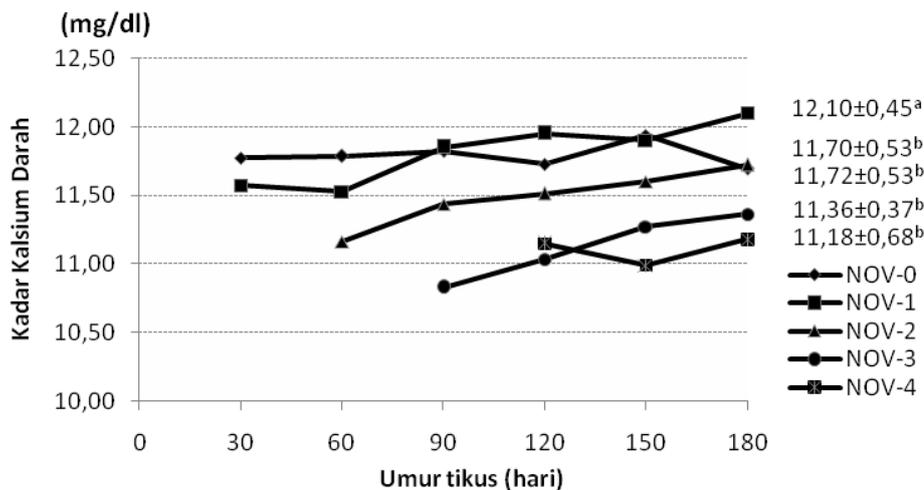
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, pertumbuhan tikus perlakuan yang diberi ESP dengan berbagai lama waktu pemberian menunjukkan bobot badan yang lebih berat dibandingkan dengan kelompok tikus kontrol (NOV-0). Tikus NOV-1 memiliki bobot badan 26,84% lebih berat dibandingkan dengan NOV-0, diikuti NOV-2 dan NOV-3 masing-masing sebesar 16,40%, dan 17,01%, serta kelompok NOV-4 mempunyai bobot badan hanya 9,76% lebih berat dibandingkan dengan kelompok kontrol (Gambar 1). Hal ini mengindikasikan bahwa pemberian ESP yang dilakukan selama 150 hari (NOV-1), 120 hari (NOV-2), 90 hari (NOV-3), dan 60 hari (NOV-4) ternyata memberi pengaruh nyata pada penambahan bobot badan dibandingkan dengan kelompok kontrol ($P < 0,05$).

Hasil pengukuran panjang tulang femur tikus diakhir penelitian (180 hari) pada kelompok NOV-1 adalah 31,88 mm, NOV-2 29,64 mm, NOV-3 29,44 mm, dan NOV-4 29,26 mm. Tulang femur tikus-tikus kelompok perlakuan ini semuanya lebih panjang dibandingkan dengan tulang femur kelompok kontrol (28,74 mm). Pertambahan panjang tulang femur pada tikus-tikus perlakuan akibat pemberian ESP sebagai akibat semakin besarnya ukuran rangka tubuh tikus-tikus tersebut. Dengan demikian, bobot badan tikus-tikus perlakuan lebih berat dibandingkan kelompok NOV-0 karena rangka tubuh tikus-tikus perlakuan lebih besar dibandingkan kelompok NOV-0. Kondisi ini diduga disebabkan oleh pemberian ESP yang dapat meningkatkan osifikasi, menstimulasi proliferasi, dan diferensiasi kondrosit sehingga meningkatkan panjang tulang pada fetus tikus (Potu *et al.*, 2007).



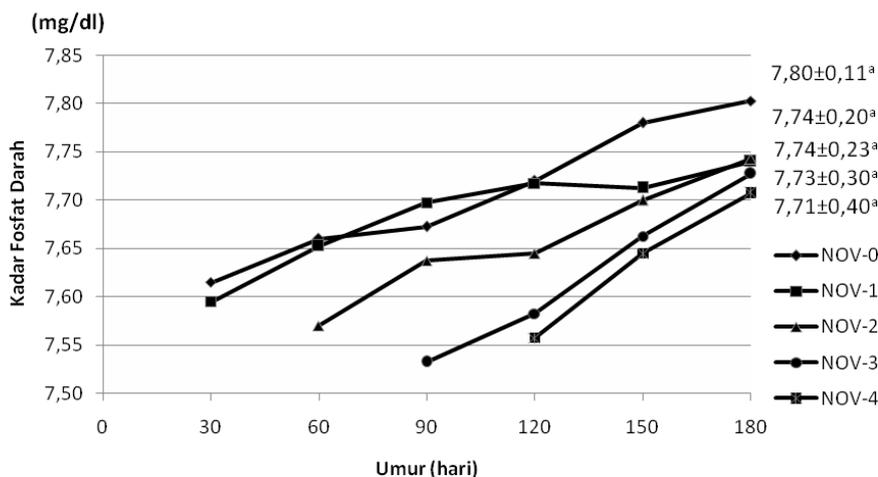
Gambar 1. Pertumbuhan tikus yang diberi ekstrak sipatah-patah pada umur 30 hingga 180 hari. NOV-0 = kelompok kontrol; kelompok perlakuan diberikan ESP selama 150 hari (NOV-1), 120 hari (NOV-2), 90 hari (NOV-3), dan 60 hari (NOV-4). Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan hasil uji berbeda nyata ($P < 0,05$).



Gambar 2. Kadar kalsium darah tikus yang diberi ekstrak sipatah-patah pada umur 30, 60, 90, dan 120 hari. NOV-0 = kelompok kontrol; kelompok perlakuan diberikan ESP selama 150 hari (NOV-1), 120 hari (NOV-2), 90 hari (NOV-3) dan 60 hari (NOV-4). Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan hasil uji berbeda nyata ($P < 0,05$).

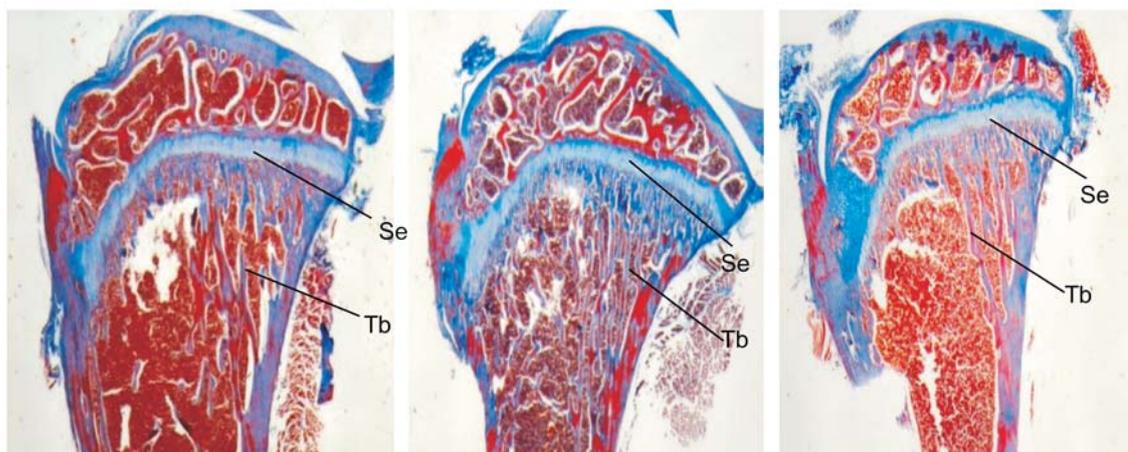
Pada kelompok NOV-1, kadar kalsium darah menunjukkan peningkatan yang nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok NOV-0 yang menurun. Tetapi, kenaikan kadar kalsium darah paling tinggi selama masa pemberian ESP ditunjukkan oleh kelompok NOV-2, disusul kelompok NOV-3, dan NOV-4 (Gambar 2). Kondisi ini disebabkan karena

kadar kalsium darah pada kelompok NOV-1 sudah mencapai optimum karena kadar ion kalsium dipertahankan konstan oleh mekanisme homeostasis (Manolagas 2000; Guyton dan Hall 2007). Kondisi kalsium dapat dikatakan optimum jika pemberian ESP secara terus menerus tidak meningkatkan kadar kalsium dalam darah, melainkan mendeposisi



Gambar 3. Kadar fosfat darah tikus putih diberi ekstrak sipatah- patah pada umur 30, 60, 90, dan 120 hari.

NOV-0 = kelompok kontrol; kelompok perlakuan diberikan ESP selama 150 hari (NOV-1), 120 hari (NOV-2), 90 hari (NOV-3) dan 60 hari (NOV-4).



Gambar 4. Trabekula pada tikus non-ovariektomi pada hari ke -180. A. kelompok kontrol. B. kelompok perlakuan yang diberikan ESP selama 150 hari menunjukkan densitas trabekula yang padat. C. kelompok perlakuan yang diberikan ESP selama 60 hari menunjukkan densitas trabekula yang jarang. Tb: trabekula, Se: sasaran epifisis.

kalsium pada tulang atau kelebihan kalsium yang diekskresikan melalui ginjal (Cunningham, 1992). Kadar kalsium darah pada kelompok NOV-2 dan NOV-3 mengalami peningkatan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok NOV-0, NOV-1, dan NOV-4. Hal ini diduga karena rentang waktu pemberian ESP pada kedua kelompok (NOV-2 dan NOV-3) tersebut masih dalam periode peningkatan kadar kalsium darah untuk mencapai level optimum. Pada kelompok tikus NOV-4, peningkatan kadar kalsium darah relatif lebih rendah karena rentang waktu pemberian ESP terlalu singkat untuk dapat meningkatkan kadar kalsium

darah. Kondisi ini menunjukkan bahwa kadar kalsium darah jelas dipengaruhi oleh awal dan lamanya pemberian ESP selama masa perlakuan.

Berbeda dari hasil yang diperoleh pada pengukuran kadar kalsium darah, pemberian ESP tidak mempengaruhi ($P>0,05$) kadar fosfat darah, dan diduga kadar fosfat darah sudah berada dalam level optimum (Gambar 3). Asupan kalsium, fosfat, dan fitoestrogen dalam ESP ikut berperan dalam proses peningkatan kadar kalsium, fosfat serta mengoptimalkan level kadar kalsium dan fosfat dalam darah, terutama pada hewan muda. Kondisi kadar

Tabel 1. Densitas osteoblas dan osteoklas pada tikus nonovariektomi pada hari ke-180

Perlakuan	Osteoblas		Osteoklas
	Aktif	Pasif	
Kelompok NOV-0	34,58±8,05 ^b	50,67±17,37 ^a	6,99±3,35 ^{bc}
Kelompok NOV-1	38,92±8,09 ^a	57,21±17,51 ^a	2,50±2,96 ^a
Kelompok NOV-2	34,88±6,62 ^b	47,63±8,69 ^a	4,29±4,44 ^b
Kelompok NOV-3	20,25±8,99 ^c	35,04±13,32 ^b	5,58±2,60 ^b
Kelompok NOV-4	18,08±3,68 ^c	34,96±6,38 ^b	6,75±3,55 ^{bc}

Keterangan : NOV-0 = kelompok kontrol; kelompok perlakuan diberikan ESP selama 150 hari (NOV-1), 120 hari (NOV-2), 90 hari (NOV-3) dan 60 hari (NOV-4).

kalsium darah yang optimum akan menunjang deposisi kalsium ke dalam tulang (Boskey, 1992). Sebaliknya, turunnya kadar ion kalsium plasma di bawah batas normal akan memacu kelenjar paratiroid untuk meningkatkan sekresi hormon paratiroid. Hormon paratiroid memulihkan konsentrasi kalsium cairan ekstrasel menjadi normal dengan bekerja langsung pada tulang dan ginjal, dan bekerja tidak langsung pada mukosa usus melalui perangsangan sistem kalsitriol (Banks, 1993; Guyton and Hall, 2007).

Secara mikroskopis, kondisi pertulangan dapat ditentukan antara lain oleh densitas trabekula, osteoblas, dan osteoklas yang terdapat di bagian diafisis maupun metafisis. Trabekula merupakan jaringan ikat yang berbentuk anyaman-anyaman. Secara umum, trabekula dibentuk dari sasaran epifisis yang mengalami osifikasi yang mengarah ke distal. Dengan pewarnaan Masson trichrome, trabekula memberikan aspek biru dan umumnya memanjang sejajar dengan sumbu tulang. Aktivitas osteoblas dan osteoklas di daerah metafisis lebih dominan ditemukan pada bagian sentral, dan jarang ditemukan di bagian tepi tulang, sebagai akibat tarikan atau tekanan ligamentum serta tendo. Selain itu, pembuluh darah juga lebih banyak ditemukan di daerah metafisis, yang berdekatan dengan keberadaan osteoklas dalam proses resorpsi tulang. Peningkatan pembuluh darah ini berhubungan erat dengan peningkatan aktivitas tulang, sebagai sarana transportasi hasil metabolisme tulang (Anderson, 1996).

Aktivitas *remodelling* tulang, dimulai dari trabekula di bagian epifisis dan metafisis tulang (Banks, 1993). Kelompok NOV-1 memiliki trabekula yang lebih padat dan rapat dengan intensitas warna biru yang lebih pekat

dibandingkan dengan kelompok NOV-0, maupun tikus-tikus kelompok perlakuan lainnya (NOV-2, NOV-3, dan NOV-4), baik di daerah epifisis maupun metafisis. Tikus NOV-1 menunjukkan struktur mikroskopis trabekula tulang lebih baik dibandingkan tikus kontrol, sedangkan tikus NOV-4 menunjukkan hasil yang hampir sama dengan kelompok NOV-0 (Gambar 4).

Pada kelompok perlakuan, selain gambaran mikroskopi trabekula tulang yang meningkat kualitasnya, juga ditunjang oleh meningkatnya jumlah osteoblas dan berkurangnya jumlah osteoklas tulang sejalan dengan lamanya pemberian ESP. Osteoblas dan osteoklas dapat dijadikan petunjuk mengenai kondisi proses pertumbuhan tulang, yang dalam masa resorpsi atau *remodelling*. Densitas osteoblas pada kelompok NOV-1 lebih padat ($P < 0,05$) dibandingkan pada kelompok NOV-0, tetapi densitas osteoklas pada kelompok NOV-1 lebih rendah dibandingkan pada kelompok NOV-0 dan kelompok perlakuan lainnya ($P < 0,05$) (Tabel 1). Pemberian ESP meningkatkan kadar kalsium darah, osteoblas aktif, dan trabekula yang lebih padat. Peningkatan osteoblas aktif dan kepadatan trabekula ini disebabkan karena adanya proses *modelling* dan *remodelling* yang masih berjalan (Banks, 1993). Sebagai jaringan yang dinamis, trabekula secara konstan akan selalu memperbaharui dirinya. Pada kelompok NOV-1, yang memperoleh ESP di awal perlakuan dan dalam waktu yang lebih lama secara relatif meningkatkan densitas osteoblas dan kepadatan trabekula. Fitoestrogen yang terdapat pada *C. quadrangularis* tersebut juga berperan dalam meningkatkan densitas osteoblas (Jainu *et al.*, 2006) dan merangsang pembentukan kolagen sebagai bahan dasar dari trabekula tulang (Shirwaikar *et al.*, 2003).

Peningkatan kualitas trabekula tulang dapat menjadi tempat deposisi kalsium dan fosfat darah.

SIMPULAN

Pemberian ekstrak sipatah-patah pada tikus betina normal masa pertumbuhan selama 150 hari, 120 hari, 90 hari, dan 60 hari memberikan efek peningkatan kualitas mikrostruktur dan fisiologis tulang.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson JJB. 1996. Calcium, phosphorus and human bone development. *J Nutr* 126:1153S-1158S.
- Banks WJ. 1993. *Applied Veterinary Histology*. 3rd Ed : Toronto. Mosby Year Book. Pp 107-126.
- Boskey AL. 1992. Mineral-matrix interaction in bone and cartilage. *Clin Orthop* 281.
- Combaret L, Taillandier D, Dardevet D, Bechet D, Ralliere C, Claustre A, Grizard J, Attaix D. 2004. Glucocorticoids regulate mRNA levels for subunits of the 19 S regulatory complex of the 26 S proteasome in fast-twitch skeletal muscles. *Biochem J* 378:239-246.
- Compston JE, Garrahan NJ, Croucher PI, Wright CDP, Yamaguchi K. 1993. Quantitative analysis of trabecular bone structure. *Bone* 14:187-192.
- Cunningham JG. 1992. Textbook of Veterinary Physiology. Philadelphia. W.B. Saunders Company. Hlm. 416-423.
- Guyton AC, Hall JE. 2007. *Fisiologi Kedokteran*. Penerjemah: Setiawan I, Tengadi, LMA KA, Santoso A. Jakarta. EGC.
- Humason GL. 1967. *Animal Tissue Technique*. 2ndEd. San Francisco: WH Freeman
- Jainu M, Vijaimohan K, Shyamala Devi CS. 2006. Protective effect of *Cissus quadrangularis* on neutrophil mediated tissue injury induced by aspirin in rats. *J Ethnopharmacol* 104:302-305.
- Karlson MK, Vergnauld P, Delmos PD, Obrant KJ. 1995. Indicators of bone formation in weight lifters. *Calcif Tissue Int* 56(3) 177-180.
- Manolagas SC. 2000. Bone marrow, cytokines and bone remodelling emerging insight into the pathophysiology of osteoporosis. *N Eng J Med* 332 (21):115-137.
- Mehta M, Kaur N, Bhutani KK. 2001. Determination of marker constituents from *Cissus quadrangularis* Linn. and their quantitation by HPTLC and HPLC. *Phytochem Anal*, 12:91-105.
- Potu BK, Rao MS, Swamy NVB, Kutty GN. 2007. *Cissus quadrangularis* plant extract enhances the ossification of fetal bones. *Pharmacologyonline* 1:63-70.
- Preisinger E, Alaclamioglu Y, Pils K, Saradeth T and Scheider B, 1995. Therapeutic exercise in the prevention of bone loss. *Am J Phys Med Rehabil* 74: 120-123.
- Sabri M, Nurhidayat, Sigit K, Priosoeryanto BP, Manalu W, 2009. Analysis of phytochemical and mineral content of Sipatah-patah Plant (*Cissus quadrangularis*) from Aceh as osteoporosis premedication. *J Rona Lingkungan* 2: 109-117.
- Sanyal A, Ahmad A, Sastry M. 2005. Calcitonin growth in *Cissus quadrangularis* plant extract, a traditional Indian bone-healing aid. *Curr Sci* 89:1742-5.
- Shirwaikar A, Khan S, Malini S. 2003. Antiosteoporotic effect of ethanol extract of *Cissus quadrangularis* Linn. on ovariectomized rat. *J Ethnopharmacol* 89: 245-250.
- Sivarajan VV, Balachandran I. 1994. *Ayurvedic Drugs and Their Plant Sources*. New Delhi. Oxford and India Book House Publishing Co. Pvt. Ltd. p. 496.
- Smith R. 1993. Bone physiology and the osteoporotic process. *Resp Med* 87 (Suppl A). 3-7
- Swamy VAHM, Thippeswamy AHM, Manjula DV, Cumar CBM. 2006. Some Neuropharmacological effects of the methanolic root extract of *Cissus quadrangularis* in mice. *Afr J Biomed Res* 9: 69-75.
- Tiangburanatham, W. 1996. *Dictionary of Thai Medicinal Plants*. Bangkok. Prachumtong Printing. pp. 572-3.