

Pemberian Kalsium Laktat dan Berenang Meningkatkan *Osteoblast* pada *Epiphysis* Tulang Radius Mencit *Perimenopause*

(ORALLY LACTATE CALCIUM AND SWIMMING INCREASE OSTEOBLAST IN EPIPHYSIS
RADIAL PERIMENOPAUSE MICE BONE)

Muliani¹, I Nyoman Mangku Karmaya¹, Ketut Tirtayasa²

¹Bagian Anatomi, ²Bagian Faal
Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana,
Jl.Sudirman, Denpasar, Bali
Telepon 0361-222510 Email: yumulien@yahoo.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kalsium laktat peroral dan berenang terhadap peningkatan *osteoblast* pada *epiphysis* tulang radius mencit (*Mus musculus*) *perimenopause*. Penelitian dengan *pretest and post-test control group design* ini menggunakan mencit berusia 15-16 bulan yang dibagi menjadi empat kelompok perlakuan (tiap kelompok berjumlah 22 ekor), yaitu: kontrol, kalsium laktat, berenang, dan kombinasi kalsium laktat dan berenang. Perlakuan diberikan selama enam minggu (42 hari). Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata jumlah *osteoblast* setelah perlakuan (*post-test*) pada kelompok kontrol adalah $9,46 \pm 1,81$, kalsium laktat adalah $26,58 \pm 2,82$, berenang adalah $25,05 \pm 2,68$, kalsium laktat dan berenang adalah $59,38 \pm 2,91$. Terdapat perbedaan rata-rata jumlah *osteoblast post-test* antara kelompok kontrol dengan perlakuan ($p < 0,05$) dan tidak terdapat perbedaan antara kelompok kalsium laktat dengan berenang ($p > 0,05$). Peningkatan rata-rata jumlah *osteoblast* pada kelompok kombinasi kalsium laktat dan berenang lebih besar daripada kelompok perlakuan lainnya. Disimpulkan bahwa pemberian kalsium laktat dan berenang dapat meningkatkan jumlah *osteoblast* mencit, dan peningkatan *osteoblast* lebih besar bila keduanya diberikan secara bersamaan.

Kata-kata kunci : osteoporosis, kalsium laktat, berenang, *osteoblast*

Abstract

The aim of this study is to measure the effect(s) of orally administered calcium lactate and swimming activity to the increase of osteoblasts in the epiphysis of radial bone at perimenopause stage. We used mice of *Mus musculus* species age 15-16 months as experimental animals in this particular study. For experimental design we used Pre-test and Post-test Control Group Design. There were 4 experimental groups: Control; Calcium lactate administration; Swimming activity; and Combination of calcium lactate and swimming activity. Each group contained 22 mice and treatments were given to each group for six weeks (42 days). Our results showed that following treatment, the average numbers of osteoblasts were 9.46 ± 1.81 ; 26.58 ± 2.82 ; 25.05 ± 2.68 ; 59.38 ± 2.91 in Control, Calcium lactate administration, Swimming activity, and Combination of calcium-lactate administration and swimming activity groups respectively. There was a significant difference in average osteoblasts between the Control group and the other 3 groups ($p < 0.05$) and there was no significant difference between the Calcium lactate administration and Swimming activity groups ($p > 0.05$). The increase number of osteoblasts in the Combination group was larger than the other groups. In conclusion, administration of calcium lactate or swimming activity could increase the number of osteoblasts in mice, and the increase is larger when applied in combination.

Keyword : osteoporosis, calcium lactate, swimming, *osteoblast*

PENDAHULUAN

Manusia lanjut usia mengalami penurunan fungsi tubuh dan hormon. Penurunan tersebut dapat mengakibatkan timbulnya berbagai penyakit pada orang-orang lanjut usia. Penurunan hormon estrogen pada wanita lanjut

usia yang telah mengalami *menopause* akan mempercepat pembentukan *osteoclast* sehingga resorpsi tulang lebih besar daripada pembentukan tulang dan terjadi osteoporosis yang ditandai dengan penurunan densitas tulang (Sana, 1995; Sambo *et al.*, 2009). Densitas tulang wanita berkurang sebesar 5-15% ketika

memasuki periode *perimenopause* dan 80% dari persentase tersebut terjadi pada tulang-tulang trabekuler (Chahal dan Drake, 2007). Fraktur tulang radius terjadi lebih awal dibandingkan fraktur panggul dan punggung sehingga merupakan tanda pertama osteoporosis (Oyen *et al.*, 2011).

Olahraga dapat meningkatkan pembentukan tulang kortikal, struktur, densitas dan kekuatan tulang pada tikus dengan ovariektomi (Hart *et al.*, 2001; Teerapornpuntakit *et al.*, 2009). Selain itu, osteoporosis dapat dicegah dengan memberikan suplemen-suplemen antara lain: estrogen, kalsium di samping aktivitas fisik.

Hasil penelitian pendahuluan yang telah dilakukan penulis terhadap 12 ekor mencit, didapatkan hasil bahwa rata-rata jumlah *osteoblast* pada *epiphysis* tulang radius mencit (*Mus musculus*) *perimenopause* kelompok kontrol adalah: 25,73 sel, kalsium laktat: 34,53 sel, berenang: 35,47 sel dan kalsium laktat dan berenang: 49,67 sel. Pemberian kalsium laktat dan berenang selama enam minggu (42 hari), cenderung meningkatkan rata-rata jumlah *osteoblast*.

Sehubungan dengan hasil penelitian tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kalsium laktat dan aktivitas fisik terhadap peningkatan *osteoblast* pada *epiphysis* tulang radius mencit *perimenopause*. Penelitian ini bermanfaat secara klinis untuk membantu perempuan *perimenopause* dalam mencegah berlanjutnya proses osteoporosis dengan cara mengkonsumsi cukup kalsium dan berolahraga secara rutin.

METODE PENELITIAN

Penelitian eksperimental ini, menggunakan rancangan acak kelompok pola faktorial 2 X 2 dengan faktor I adalah kalsium laktat (+ -), dan faktor II adalah berenang (+ -). Penelitian dilaksanakan selama tiga bulan, di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana, Denpasar. Pembuatan dan pembacaan preparat histologi dilakukan di Laboratorium Patologi Balai Besar Veteriner (BBVet), Denpasar.

Penelitian ini menggunakan mencit betina (*Mus musculus*) hidup yang berusia 15-16 bulan atau setara dengan usia 45 tahun pada manusia (Flurkey *et al.*, 2007) dengan bobot badan antara 27-33 gram yang telah memasuki fase

perimenopause dan tidak memiliki cacat fisik.

Besar sampel ditentukan dengan rumus Pocock (2008), yaitu:

$$n = \frac{2\delta^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2} \times f(\alpha, \beta)$$

Dalam rumus ini, n = Jumlah sampel; μ_2 = Rataan hasil kelompok perlakuan; μ_1 = Rataan hasil kelompok kontrol; δ = Simpang baku (SD) kontrol; α = Tingkat Kesalahan I = 0,05; β = Tingkat Kesalahan II = 0,1; f(α, β) = Besarnya dilihat pada tabel Pocock (10,5)

Sehubungan dengan hasil penelitian pendahuluan, maka didapatkan: rata-rata hasil kelompok perlakuan kalsium laktat (μ_2) adalah 34,53, kelompok kontrol (μ_1): 25,73, simpangan baku kontrol: 2,52. Perhitungan besar sampel dalam penelitian ini menggunakan $\alpha = 0,05$ dan $\beta = 0,1$ sehingga jumlah sampel untuk setiap kelompok adalah delapan. Jumlah ini ditambahkan lagi 30% untuk mengantisipasi *drop out* sehingga berjumlah 11. Total mencit yang digunakan untuk *pretest* maupun *post-test* pada keempat kelompok perlakuan adalah 88 ekor.

Kalsium. Dalam penelitian ini kalsium yang digunakan berupa larutan kalsium laktat dibentuk dari 0,25 tablet kalsium laktat (Kimia Farma, Indonesia), dengan cara satu tablet kalsium laktat (500 mg) dihancurkan lalu ditimbang dan dibagi menjadi empat bungkus. Setiap bungkus dilarutkan dalam 19,2 mL akuades serta diberikan pada mencit dengan bantuan sonde sebanyak 0,4 mL (1000 mg), dibagi dalam dua dosis (pagi dan sore) selama enam minggu (42 hari).

Berenang. Perlakuan berenang dilakukan satu kali sehari selama tujuh menit, sebanyak empat kali seminggu (setiap hari Senin, Selasa, Kamis, dan Jumat), selama enam minggu, dalam sebuah ember berukuran 30 x 30 cm yang diisi air bersuhu 32-34°C, dengan ketinggian air 25 cm.

Osteoblast. Jumlah sel-sel *osteoblast* pada permukaan tulang radius mencit diamati dengan menggunakan mikroskop binokuler (Olympus Japan). Diamati dengan pembesaran 400 kali, dinyatakan dalam lima lapangan pandang, pada pengecatan dengan *hematoxyllin eosin* (HE), sel-sel *osteoblast* terlihat berwarna basofil, berbentuk kuboid dan berinti satu (*mononucleus*).

Persiapan Hewan Percobaan

Sebanyak 88 ekor mencit betina laboratorium (*Mus musculus*) berusia 15-16 bulan yang telah memasuki fase *perimenopause*, dipilih secara acak. Bobot badan mencit berkisar 27-33 gram. Mencit diadaptasikan selama satu minggu. Mencit dibagi empat secara acak, menjadi kelompok I, II, III, dan IV. Setiap kelompok terdiri dari 22 ekor mencit betina *perimenopause*, masing-masing dipelihara dalam kandang sendiri yang terbuat dari plastik. Kandang ini ditutup kawat kasa, di dalamnya terdapat sekam sebagai alas kandang, tempat makanan, dan botol minum. Setiap kelompok dibagi dua secara acak menjadi kelompok *pretest* dan *post-test* sehingga pada setiap kelompok terdapat 11 ekor mencit.

Seluruh mencit dari kelompok I, II, III, dan IV pada grup *pretest* dikorbankan nyawanya pada hari ke-8 dengan memasukkannya ke dalam toples berisi kapas yang mengandung *chloroform*. Tulang radius mencit diambil untuk pemeriksaan jumlah sel-sel *osteoblast*. Jaringan tulang dari kelompok *pretest* sejumlah 44 buah segera diperiksa.

Mencit kelompok I (11 ekor) merupakan kelompok control, dibiarkan hidup bebas dalam kandang selama enam minggu (42 hari). Mencit kelompok II (11 ekor) diberikan perlakuan berupa larutan kalsium laktat 0,4 mL (1000 mg) dibagi dalam dua dosis (pagi dan siang). Kalsium laktat diminumkan secara paksa pada mencit dengan menggunakan sonde 1 cc selama enam minggu (42 hari). Mencit kelompok III (11 ekor) diberikan perlakuan olahraga renang dengan prosedur sebagai berikut: empat ember diisi air dengan kedalaman 25 cm dengan suhu 32-34° C. Sebelas ekor mencit dilepaskan pada masing-masing ember yang telah disiapkan tersebut dan dibiarkan berenang bebas setiap hari.

Mencit pada kelompok IV (11 ekor) diberi minum larutan kalsium laktat 0,4 mL (1000 mg) dibagi dalam dua dosis (pagi dan sore) dengan sonde satu cc dan olahraga renang dengan prosedur seperti pada kelompok III. Perlakuan diberikan selama enam minggu (42 hari). Seluruh mencit grup perlakuan kelompok I, II, III, dan IV dikorbankan nyawanya setelah enam minggu (hari ke-43) dengan cara seperti yang telah diuraikan di atas. Jaringan tulang dari kelompok *pretest* sejumlah 44 buah segera diperiksa dengan cara tersamar tunggal di Laboratorium Patologi BBVet Denpasar.

Proses Pembuatan Preparat

Mencit dikorbankan nyawanya dengan cara memasukkan mereka ke dalam toples yang mengandung *chloroform*. Tulang radius dipotong dengan pisau tajam setebal 5 mm lalu dimasukkan ke dalam larutan fiksatif (*formalin buffer netral* 10%) selama 24 jam lalu dicuci dengan air. Dilakukan dekalsifikasi dengan *nitric acid* 5% aquosa selama semalam dan dicuci dengan air untuk menghilangkan asam lalu jaringan didehidrasi dalam *tissue processor*, kemudian diinfiltrasi pada mesin *Tissue-Tek TEC* sehingga terbentuk blok jaringan. Setiap blok jaringan kemudian dipotong menggunakan mikrotom (Microm HM 315) dengan ketebalan empat mikron. Preparat kemudian diapungkan dalam penangas air lalu diambil dengan gelas objek. Preparat lalu dikeringkan dalam inkubator selama satu malam pada suhu 37-38°C, diberi warna dengan Harris HE. Proses pewarnaan dilanjutkan dengan *mounting* (penutupan preparat dengan *cover glass*, menggunakan *permount* sebagai perekat). Jumlah sel-sel *osteoblast* diperiksa secara mikroskopis dengan pembesaran 40, 100, dan 400 kali.

Penghitungan Sel-sel Osteoblast

Sel-sel *osteoblast* pada permukaan tulang radius dari masing-masing preparat diperiksa di bawah mikroskop dalam lima lapang pandang. Sel-sel *osteoblast* dari lima lapang pandang dijumlah lalu hasilnya dibagi lima untuk mencari rata-rata jumlah sel-sel *osteoblast*.

Analisis Data

Data yang dikumpulkan dianalisis secara statistika untuk mengetahui nilai minimum, maksimum, rata-rata (*mean*), dan standar deviasi pada tingkat kepercayaan 95% atau signifikansi 5% (Santoso, 2003).

Uji normalitas dilakukan dengan uji Shapiro-Wilk, untuk mengetahui rata-rata berdistribusi normal atau tidak. Data yang distribusinya tidak normal akan ditransformasi. Uji homogenitas dilakukan dengan *Levene's Test* untuk mengetahui homogenitas antar kelompok.

Analisis efek perlakuan dan interaksi dilakukan dengan uji statistika parametrik dengan menggunakan uji sidik ragam dua arah/*Two Way Anova*. Data yang tidak berdistribusi normal dan tidak homogen, dianalisis dengan uji statistika non parametrik Kruskal-Wallis.

Analisis perbedaan efek antar kelompok (untuk kelompok *pretest* maupun *post-test*) dengan uji statistika parametrik menggunakan uji sidik ragam searah/*One Way Anova* dan dilanjutkan dengan *Post hoc* (LSD).

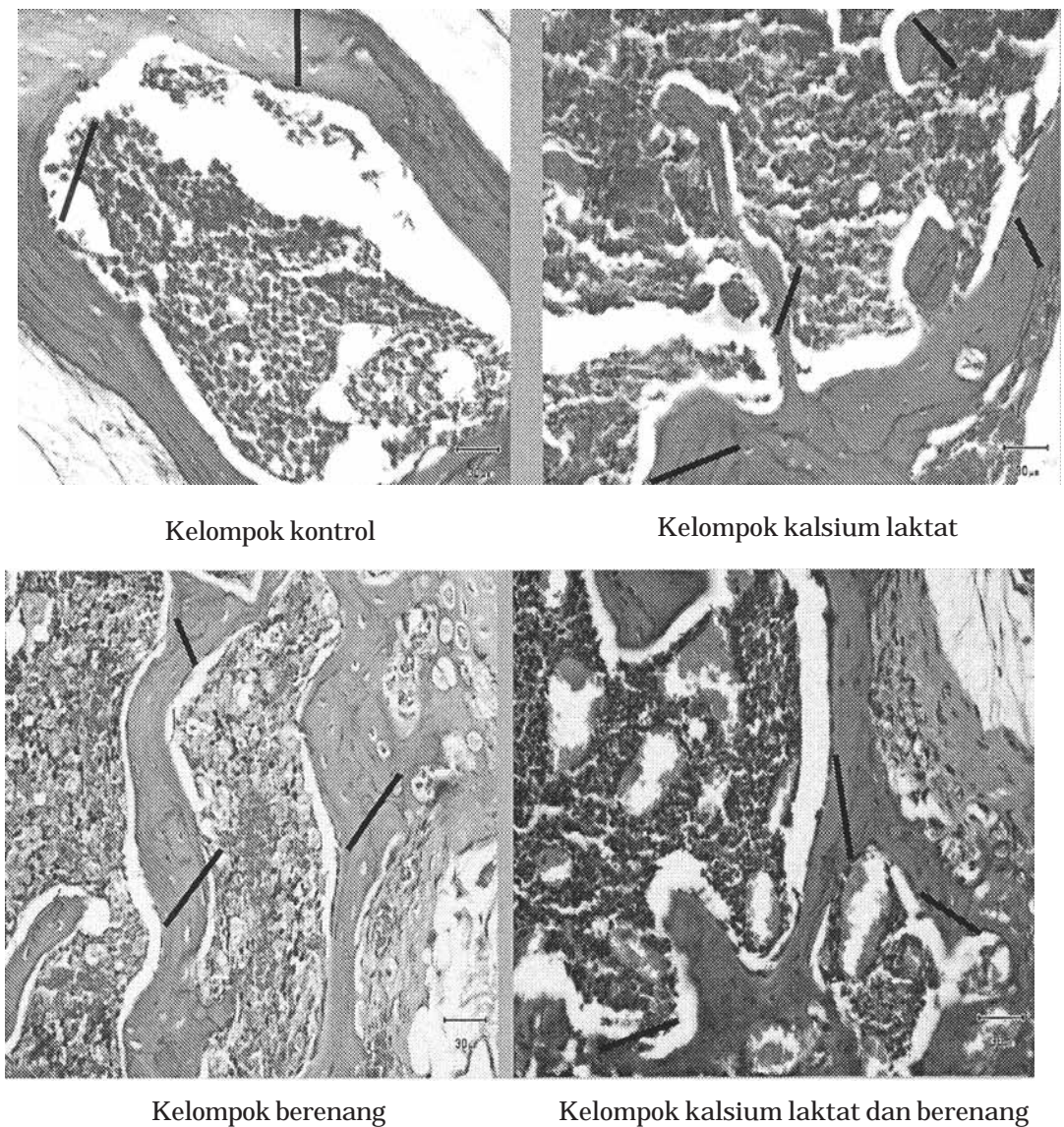
HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil analisis statistika, didapatkan rata-ran jumlah *osteoblast* masing-masing kelompok sebelum diberikan perlakuan (*pretest*) adalah sebagai berikut: kontrol $9,31 \pm 4,13$, kalsium $9,40 \pm 3,71$, berenang

$9,36 \pm 3,69$ dan kombinasi kalsium berenang $10,00 \pm 3,33$. Rataan jumlah *osteoblast* setelah perlakuan pada kelompok kontrol adalah $9,46 \pm 1,81$, kalsium laktat adalah $26,58 \pm 2,82$, berenang adalah $25,05 \pm 2,68$, kalsium laktat dan berenang adalah $59,38 \pm 2,91$.

Hasil uji normalitas dengan Shapiro-Wilk dan uji homogenitas dengan Levene's test menunjukkan data jumlah *osteoblast* sebelum dan setelah perlakuan pada semua kelompok berdistribusi normal dan homogen.

Hasil analisis dengan metode *One Way Anova*, menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang berarti antar kelompok sebelum

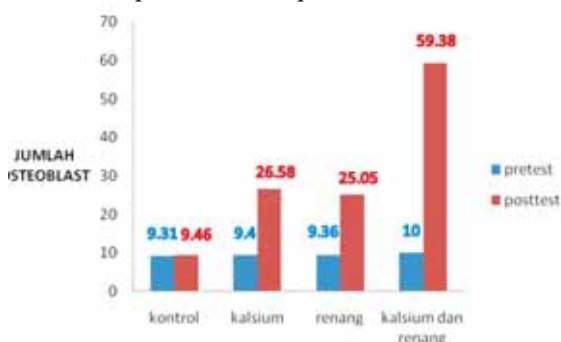


Gambar 1. Histologis *epiphysis* tulang radius mencit *perimenopause* setelah perlakuan (*Post-test*). *Osteoblast* (tanda panah) kelompok perlakuan tampak lebih padat daripada kontrol (HE, 40X lensa objektif, 10X lensa okuler)

perlakuan. Hasil perbedaan rata-rata jumlah *osteoblast* setelah perlakuan antara kelompok kontrol yang dianalisis dengan metode *One Way Anova* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antar kelompok setelah perlakuan.

Setelah dianalisis dengan LSD, didapatkan bahwa kelompok perlakuan yang terdiri dari kalsium laktat, berenang, dan kombinasi kalsium laktat dan berenang, memberikan efek peningkatan rata-rata jumlah *osteoblast* yang lebih besar daripada kontrol. Perlakuan kombinasi kalsium laktat dan berenang memiliki efek meningkatkan rata-rata jumlah *osteoblast* yang paling tinggi dibandingkan kelompok kalsium laktat dan berenang. Kelompok perlakuan kalsium laktat dan kelompok perlakuan berenang tidak memberi efek yang berbeda. Peningkatan rata-rata jumlah sel-sel *osteoblast* tulang radius setelah *post-test* pada kelompok perlakuan, disajikan pada Gambar 1

Gambaran rata-rata jumlah *osteoblast* sebelum perlakuan (*pretest*) dan setelah

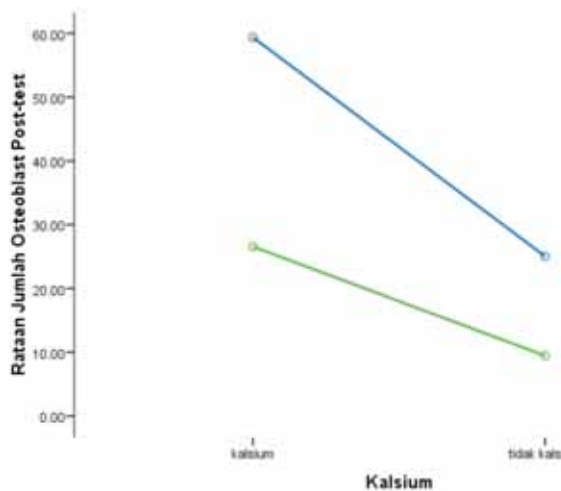


Gambar 2. Perbandingan rata-rata jumlah *osteoblast* *pretest* dan *post-test* antara kelompok kontrol dengan perlakuan.

Pada Gambar 2 tersebut ditunjukkan bahwa kombinasi kalsium laktat dan berenang memberikan efek yang paling baik dibandingkan kelompok kalsium laktat atau berenang.

Hasil analisis dengan uji sidik ragam dua arah menunjukkan bahwa kelompok perlakuan memberikan efek peningkatan jumlah sel *osteoblast* dan efek tersebut bermakna secara statistika.

Interaksi antara kalsium laktat dan berenang disajikan pada Gambar 3. Pada grafik tersebut tergambar adanya interaksi antara



Gambar 3. Grafik interaksi kalsium laktat dan berenang.

kalsium laktat dan berenang karena kedua garis tersebut tidak sejajar. Hasil uji interaksi menunjukkan terjadi peningkatan rata-rata jumlah *osteoblast* yang lebih besar, bila kalsium laktat diberikan bersama-sama dengan berenang dibandingkan hanya diberikan kalsium laktat atau berenang.

Secara umum dapat dinyatakan bahwa terjadi peningkatan bermakna jumlah *osteoblast* pada kelompok perlakuan yang diberikan kalsium laktat, berenang, dan kombinasi keduanya. Peningkatan *osteoblast* yang bermakna, terbesar terdapat pada kelompok yang diberi kombinasi kalsium laktat dan berenang karena berenang meningkatkan absorpsi kalsium di usus halus terutama duodenum melalui transpor *transcellular* dan *paracellular* (Charoenphandhu, 2007). Peningkatan absorpsi kalsium meningkatkan kadar kalsium ekstraseluler sehingga meningkatkan kalsium intraseluler, proliferasi, dan kemotaksis *osteoblast*.

Asupan kalsium laktat meningkatkan kadar kalsium ekstraseluler, kalsium intraseluler, dan proliferasi *osteoblast*. Hasil ini sesuai dengan Zayzafoon (2006), yang melaporkan bahwa peningkatan kalsium ekstraseluler menstimulasi pembentukan tulang secara signifikan, meningkatkan proliferasi dan atau kemotaksis *osteoblast*. Sementara itu Uusi-Rasi *et al.*, (2002), melaporkan bahwa asupan kalsium yang tinggi berpengaruh positif terhadap tulang radius. Wagner *et al.*, (2007), menemukan adanya penurunan yang signifikan pada *alpha helical peptide* urin (suatu penanda resorpsi tulang) pada kelompok kalsium laktat

sehingga diduga kalsium memiliki efek positif pada tulang. Kalsium laktat diabsorpsi lebih baik dibandingkan kalsium fosfat dan kalsium dalam susu, serta lebih menstimulasi aktivitas tulang dibandingkan kalsium karbonat atau kalsium sitrat pada tikus coba yang tidak meminum susu ataupun kalsium fosfat sehingga sangat bagus terutama dalam metabolisme tulang. Charoenphandhu (2007), berhasil membuktikan adanya hubungan langsung antara tingginya absorpsi kalsium di usus halus dengan tingginya densitas tulang puncak atau kekuatan tulang.

Penelitian Rosa *et al.*, (2010), menunjukkan bahwa latihan fisik jangka pendek pada tikus betina mengakibatkan remodeling tulang. Aktivitas fisik dapat menimbulkan beban mekanik pada tulang yang menstimulasi beberapa *physical signal* sehingga *osteocyte* teraktivasi dan menstimulasi pembentukan tulang oleh *osteoblast*, menekan aktivitas *osteoclast* dan meningkatkan aktivitas *osteoblast* (Bergmann *et al.*, 2011). Berenang direkomendasikan bagi penyakit osteoporosis dan memiliki keuntungan yang lebih besar dibandingkan berlari karena meminimalkan peluang terjadinya cedera (Charoenphandhu, 2007). Da Silva *et al.*, (2011), melaporkan bahwa berenang dengan intensif berpengaruh terhadap mineralisasi remodeling tulang. Sementara itu McVeigh *et al.*, (2010), menemukan bahwa berenang 30 menit sehari, sebanyak lima kali seminggu, selama enam minggu efektif meningkatkan *bone mineral content* (BMC) dan *bone mineral density* (BMD). Bergmann *et al.*, (2011), melaporkan bahwa kurangnya aktivitas dalam jangka waktu yang lama akan meningkatkan permukaan resorpsi, penanda biologi resorpsi dan penurunan pembentukan tulang.

Kalsium yang diberikan bersamaan dengan perlakuan berenang membuat kalsium diabsorpsi lebih banyak dibandingkan bila diberikan secara tersendiri, sehingga efek kalsium meningkat. Keadaan ini mengakibatkan jumlah *osteoblast* pada kelompok yang diberikan kombinasi kalsium laktat dan berenang lebih tinggi dibandingkan diberikan secara sendiri-sendiri. Hasil ini sesuai dengan Sanders *et al.*, (2009), yang melaporkan bahwa kombinasi aktivitas fisik (*weight bearing*) dan asupan kalsium memberikan efek aditif. Diperkirakan olahraga menghasilkan efek pada daerah yang spesifik, sementara

asupan kalsium yang tinggi menghasilkan efek yang lebih menyeluruh sebagai hasil tambahan terhadap manfaat olahraga. Hasil penelitian yang dilaporkan oleh Derman *et al.*, (2008), menunjukkan bahwa diet tinggi kalsium pada kelompok perenang memiliki efek remodeling lebih besar dibandingkan kelompok kontrol (bukan perenang) yang lebih banyak meminum *soft drinks*. Berenang selama satu jam, sebanyak lima kali seminggu dalam dua minggu, akan menstimulasi transpor kalsium di usus halus dan mengubah ekspresi gen-gen dalam absorpsi kalsium sedangkan imobilisasi akan menurunkan absorpsi kalsium (Teerapornpuntakit *et al.*, 2009). Absorpsi kalsium oleh usus halus merupakan satu-satunya sumber kalsium bagi pembentukan tulang sehingga mempengaruhi densitas dan kekuatan tulang yang secara langsung mempengaruhi aktivitas fisik, karena itu efek olahraga yang menguntungkan tidak dapat terjadi tanpa peningkatan absorpsi kalsium (Charoenphandhu, 2007). Berolahraga dengan intensitas sedang, meningkatkan BMD, kekuatan, dan rataan pembentukan tulang serta absorpsi kalsium. Kombinasi antara aktivitas fisik dan asupan kalsium yang cukup dapat meningkatkan kekuatan tulang pada masa kanak-kanak (Charoenphandhu, 2007).

SIMPULAN

Kesimpulan yang didapat berdasarkan hasil penelitian adalah: pemberian kalsium laktat maupun berenang meningkatkan jumlah *osteoblast* dan kombinasinya meningkatkan jumlah sel *osteoblast* lebih banyak dibandingkan hanya diberikan kalsium atau berenang.

SARAN

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui aspek biologi molekuler mekanisme pengaruh kalsium, olahraga dan kombinasi kalsium dan olahraga dalam terbentuknya *osteoblast*. Penelitian ini dilakukan pada hewan coba (mencit), maka harus dilakukan penelitian lebih lanjut sebelum digunakan pada manusia namun dapat digunakan sebagai acuan untuk menjaga integritas tulang dengan asupan kalsium yang cukup dan olahraga teratur.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Bagian dan staf di *Animal Laboratory Unit*, Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana yang telah memberikan tempat untuk melakukan penelitian. Terima kasih pula kepada Drh. Ketut Wirata, Bapak Wayan Sudiarka dari Laboratorium Patologi, Balai Besar Veteriner (BBVet), Denpasar yang telah banyak membantu dalam pembuatan preparat, pembacaan, dan pemotretan sediaan histologi tulang mencit.

DAFTAR PUSTAKA

- Bergmann P, Body JJ, Boonen S, Boutsen Y, Devogelaer JP, Goemaere S, Kaufman J, Reginster JY, Rozenberg S. 2011. Loading and Skeletal Development and Maintenance. *Journal of Osteoporosis*: 1-15.
- Chahal H, Drake W. 2007. The Endocrine System and Ageing. *The Journal of Pathology* 211: 173-80.
- Charoenphandhu N. 2007. Physical Activity and Exercise Affect Intestinal Calcium Absorption: A Perspective Review. *J Sports Sci Technol* 7(1): 171-81.
- da Silva FF, de Souza RA, Pacheco MTT, Ribeiro W, da Silva MASR, Miranda H, Salgado MAC, Castilho JCM, Silveira L. 2011. Effects of Different Swimming Exercise Intensities on Bone Tissue Composition in Mice: A Raman Spectroscopy Study. *Photomedicine and Laser Surgery* 29(4): 217-25.
- Derman O, Cinemre A, Kanbur N, Dogan M, Kilic M, Karaduman E. 2008. Effect of Swimming on Bone Metabolism in Adolescents. *The Turkish Journal of Pediatrics* 50: 149-54.
- Flurkey K, Curren JM, Harrison DE. 2007. Mouse model in Aging. In: Fox JG. *The Mouse in Biomedical Research*. 2nd. Ed. Philadelphia: Elsevier. P 637-68.
- Hart KJ, Shaw JM, Vajda E, Hegsted M, Miller SC. 2001. Swim-Trained Rats Have Greater Bone Mass, Density, Strength and Dynamics. *J Appl Physiol* 91: 1663-1668.
- McVeigh J, Kingsley S, Gray D, Loram LC. 2010. Swimming enhances bone mass acquisition in growing female rats. *Journal of Sports Science and Medicine* 9: 612-9.
- Oyen J, Brudvik C, Gjesdal CG, Tell GS, Lie SA, Hove LM. 2011. Osteoporosis as a risk factor for distal radial fractures: a case-control study. *J Bone Joint Surg Am* 93(4): 348-56.
- Pocock SJ. 2008. *Clinical Trials A Practical Approach*. New York: John Wiley and Sons. Pp.123-30.
- Rosa BV, Firth EC, Blair HT, Vickers MH, Morel PCH, Cockrem JF. 2010. Short-term Voluntary Exercise in the Rat Causes Bone Modeling Without Initiating a Physiological Stress Response. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 299(4): 1037-43.
- Sambo AP, Umar H, Adam JMF. 2009. Causes of Secondary Osteoporosis. *The Indonesian Journal of Medical Science* 2(1):41-50.
- Sana IGNP. 1995. Fisiologi Tulang dan Proses Menua. *Simposium Pencegahan dan Tata Laksana Osteoporosis yang Rasional*. Bali 25 November. p. 1-5
- Sanders KM, Nowson CA, Kotowicz MA, Briffa K, Devine A, Reid IR. 2009. Calcium and Bone Health: Position Statement for The Australian and New Zealand Bone and Mineral Society, Osteoporosis Australia and The Endocrine Society of Australia. *MJA* 190(6): 316-320.
- Santoso S. 2003. *Mengatasi Berbagai Masalah Statistik dengan SPSS Versi 11.5*. Jakarta: PT Elex Media Komputindo, Kelompok Gramedia. p.291-304
- Teerapornpuntakit J, Dorkkam N, Wongdee K, Krishnamra N, Charoenphandhu N. 2009. Endurance swimming stimulates transepithelial calcium transport and alters the expression of genes related to calcium absorption in the intestine of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E775-E786.
- Uusi-Rasi K, Sievanen H, Pasanen M, Oja P, Vuori I. 2002. Associations of Calcium Intake and Physical Activity with Bone Density and Size in Premenopausal and Postmenopausal Women: A Peripheral Quantitative Computed Tomography Study. *Journal of Bone and Mineral Research* 17(3): 544-51.
- Wagner G, Kindrick, S, Hertzler S, DiSilvestro RA. 2007. Effects of Various Forms of Calcium on Body Weight and Bone Turnover Markers in Women Participating in a Weight Loss Program. *Journal of the American College of Nutrition* 26(5): 456-61.
- Zayzafoon M. 2006. Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* 97(1): 56-70.