

HYPERVITAMINOSIS IN ANIMALS

TESIS

**PENGARUH DIET TINGGI GARAM (NaCl) TERHADAP RISIKO
PATAH TULANG PADA TIKUS PUTIH JANTAN**
(Rattus norvegicus)

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



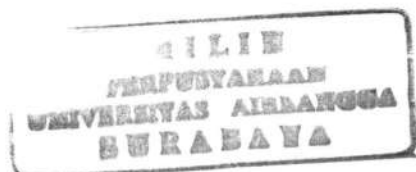
KKA
KK
TKD 12/07
Kus
P

SUNARYO KUSUMO

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2004

i



TESIS

**PENGARUH DIET TINGGI GARAM (NaCl) TERHADAP RISIKO
PATAH TULANG PADA TIKUS PUTIH JANTAN
(*Rattus norvegicus*)**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

**SUNARYO KUSUMO
NIM 090214753/M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2004

**PENGARUH DIET TINGGI GARAM (NaCl) TERHADAP RISIKO
PATAH TULANG PADA TIKUS PUTIH JANTAN**

(Rattus norvegicus)

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

**Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Klinik
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

SUNARYO KUSUMO

NIM 090214753/M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2004

Tanggal 28 Juni 2004

*“Tidak sepatutnya bagi orang-orang mukmin itu pergi semuanya
(ke medan perang). Mengapa tidak pergi dari tiap-tiap golongan diantara mereka,
beberapa orang untuk memperdalam ilmu pengetahuan mereka tentang agama
dan untuk memberi peringatan bagi kaumnya,
apabila mereka telah kembali kepadanya,
supaya mereka itu dapat menjaga dirinya”
(QS At-Taubah : 122)*

Kupersembahkan Tesis ini kepada :
Almamater tercinta Universitas Airlangga,
Kedua orang tuaku, Bapak dan Ibu guruku,
Istri dan anak-anakku tersayang.

Lembar pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 18 JUNI 2004

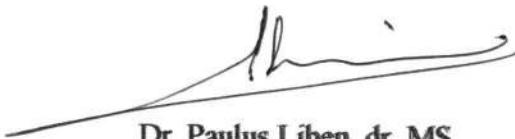
Oleh

Pembimbing Ketua



Prof Dr Djoko Roeshadi, dr, SpB, SpOT
NIP 130 325 838

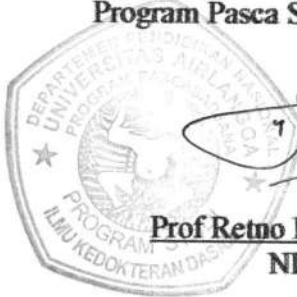
Pembimbing



Dr Paulus Liben, dr, MS
NIP 130 531 788

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga



Prof Retno Handayani, dr, MS, PhD
NIP 130 541 984

Telah diuji pada

Tanggal 28 Juni 2004

PANITIA PENGUJI TESIS

- Ketua : Dr Sunarko Setyawan, dr, MS
- Anggota : 1. Prof Dr Djoko Roeshadi, dr, SpB, SpOT
2. Dr Paulus Liben, dr, MS
3. Moh Cholil Munif, dr, AIF
4. Hamzah, dr, SpFK

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrohmaanirrohiim.

Puji syukur kehadirat Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Prof Dr Djoko Roeshadi, dr, SpB, SpOT pembimbing ketua yang dengan penuh perhatian telah meluangkan waktu memberikan dorongan, bimbingan dan saran serta wawasan keilmuan bagi terselesaikannya tesis ini.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Dr Paulus Liben, dr, MS pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberi dorongan, bimbingan, arahan dan saran.

Saya ucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Menteri Pertahanan Republik Indonesia cq Sekretaris Jenderal Departemen Pertahanan melalui Direktur Kesehatan serta penghormatan sepenuhnya kepada Kepala Biro Umum Sekretariat Jenderal Departemen Pertahanan Republik Indonesia yang telah memberikan dukungan finansial, sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Menyadari bahwa tesis ini tidak mungkin terwujud tanpa bantuan dan peran serta berbagai pihak maka perkenankan penulis dengan setulus hati mengucapkan terima kasih kepada Yth :

Rektor Universitas Airlangga Prof Dr Med Puruhito dr, SpB, SpBTKV; Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Prof Dr HMS Wiyadi, dr, SpTHT; Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof Dr H Muhammad Amin, dr, SpP; dan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Prof Retno Handayani, dr, MS, PhD serta

Ketua Program Studi Orthopaedi dan Traumatologi Prof Dr Djoko Roeshadi, dr, SpB, SpOT yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menempuh dan menyelesaikan studi di Program Magister ini.

Dr Sunarko Setyawan, dr, MS yang telah meluangkan waktunya untuk berdiskusi dan memberi masukan dan arahan dalam penyusunan tesis. Hamzah, dr, SpFK yang telah memberikan koreksi dan perhitungan terhadap dosis dan jenis intervensi. Moh Cholil Munif, dr, AIF yang telah memberikan bimbingan dan saran dalam pengolahan data penelitian ini.

Seluruh staf dan karyawan di Laboratorium Orthopaedi dan Traumatologi Universitas Airlangga yang telah bekerjasama dan membantu mulai awal kuliah sampai penyelesaian tesis ini.

Herry Soemantoro dan Khairul yang telah banyak membantu dalam pemeliharaan dan pengambilan unit analisis penelitian hewan coba di Laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Unair.

Kedua orang tua tercinta, Ayahanda H Abdur Rohman (almarhum) dan Ibunda Hj Sudarmi, kedua mertua saya, Bapak H Palendra dan Ibu Seminarwati serta kakak-kakak dan adik-adikku tersayang, yang telah memberi dukungan, nasehat dan cinta serta selalu berdoa dengan ketulusan hati demi keberhasilan pendidikan penulis.

Istri tercinta, Yudha Khairunik, dr beserta anak-anakku terkasih, Avicenna Ahmada Kusuma dan Nawwaf Laththufa Mahdy, yang selalu setia mendampingi, memberikan cinta, semangat dan dorongan serta mengorbankan waktu dan tenaganya untuk membantu penulis menyelesaikan tesis ini.

Semua pihak yang ikut membantu dan mendukung selama masa pendidikan yang tidak dapat penulis sebut namanya satu persatu.

Akhirnya dengan segenap kerendahan hati penulis sebagai manusia biasa mohon maaf atas segala kekurangan.

Surabaya, Juni 2004

Penulis

RINGKASAN

Pengaruh Diet Tinggi Garam (NaCl) Terhadap Risiko Patah Tulang Pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*)

Sunaryo Kusumo

Penelitian ini bermula dari perhatian peneliti terhadap banyaknya kasus osteoporosis yang berakibat meningkatnya angka kejadian patah tulang yang sangat berpengaruh terhadap produktivitas dan keadaan sosial ekonomi. Telah banyak peneliti yang menunjukkan bahwa pemberian diet dengan kadar garam (NaCl) tinggi berpengaruh terhadap kualitas maupun kuantitas tulang. Asupan tinggi garam (NaCl) menyebabkan peningkatan laju filtrasi ginjal yang berakibat langsung terhadap peningkatan ekskresi natrium pada urin yang juga diikuti oleh peningkatan ekskresi kalsium urin. Mekanisme utama inilah yang dianggap berpengaruh terhadap keseimbangan kalsium plasma yang berujung pada penurunan kepadatan tulang dengan akibat penurunan kekuatan tulang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian diet tinggi garam (NaCl) terhadap risiko patah tulang.

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *The Posttest Only Control Group Design*. Penelitian dilakukan terhadap 40 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) jenis jantan berumur 3 bulan yang dibagi secara acak menjadi 4 kelompok. Kelompok tersebut terdiri dari 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol mendapat air minum ad libitum/200gr BB/hari (K1). Kelompok perlakuan mendapat larutan NaCl sebanyak 72 mg/200gr BB/hari dengan perincian dosis sebagai berikut : untuk kelompok perlakuan pertama mendapat dosis 72 mg NaCl/200 gr BB/hari (K2), kelompok perlakuan kedua mendapat 144 mg NaCl/200 gr BB/hari (K3) dan kelompok perlakuan ketiga mendapat 216 mg

NaCl/200 gr BB/hari (K4), semuanya diberikan per oral. Setelah 8 minggu perlakuan, kepadatan tulang diukur pada metafisis femur semua binatang coba menggunakan alat ultrasound densitometri DBM Sonic 1200, ketebalan tulang kortikal diafisis tulang femur diukur melalui foto roentgen anteroposteriornya serta kekuatan tulang diukur dengan alat *Unconfined Compressive Strength Machine Modified*.

Hasil penelitian menunjukkan rerata kepadatan tulang bagi kelompok kontrol adalah sebesar $1707,000 \pm 40,383$ m/det, sedang rerata ketebalan tulang kortikal dan rerata kekuatan tulang masing-masing $0,9589 \pm 0,0394$ mm dan $664,111 \pm 17,446$ Newton. Sementara itu, pada kelompok perlakuan NaCl 72 mg diperoleh rerata kepadatan tulang, rerata ketebalan tulang kortikal dan rerata kekuatan tulang adalah masing-masing sebesar $1667,000 \pm 27,898$ m/det, $0,9079 \pm 0,0412$ mm dan $609,714 \pm 8,499$ Newton. Pada kelompok perlakuan NaCl 144 menghasilkan rerata kepadatan tulang, rerata ketebalan tulang kortikal serta rerata kekuatan tulang sebesar $1635,500 \pm 2,157$ m/det, $0,8610 \pm 0,0317$ dan $589,900 \pm 15,707$ Newton. Sedangkan pada kelompok perlakuan NaCl 216 mg didapatkan masing-masing $1602,5 \pm 24,897$ m/detik, $0,833 \pm 0,031$ mm dan $570,5 \pm 21,267$ Newton untuk rerata kepadatan tulang, rerata ketebalan tulang kortikal serta rerata kekuatan tulang.

Pada pengukuran lain didapatkan rerata respon kepadatan tulang, rerata respon ketebalan tulang kortikal dan rerata respon kekuatan tulang pada kelompok perlakuan 72 mg NaCl adalah $40,000 \pm 27,898$ m/det, $0,0510 \pm 0,0412$ mm dan $54,397 \pm 8,499$ Newton. Sedangkan pada kelompok perlakuan 144 mg NaCl diperoleh rerata respon kepadatan tulang, rerata respon ketebalan tulang kortikal dan rerata respon kekuatan tulang masing-masing sebesar $71,500 \pm 22,157$ m/det, $0,0979 \pm 0,0317$ mm dan $74,211 \pm$

15,702 Newton. Sementara itu kelompok perlakuan 216 mg NaCl menunjukkan rerata respon kepadatan tulang, rerata respon ketebalan tulang kortikal dan rerata respon kekuatan tulang masing-masing sebesar $104,500 \pm 24,897$ m/det, $0,1259 \pm 0,0312$ mm dan $93,611 \pm 21,267$ Newton.

Hasil penelitian selanjutnya disajikan secara deskriptif dan dianalisis menggunakan analisis multi varians yang dilanjutkan dengan uji beda (*pairwise comparisons*). Hasil analisis menunjukkan semua kelompok hewan coba yang diberi garam (NaCl) mempunyai perbedaan yang signifikan terhadap kontrol ($p < 0,05$). Dari uji beda didapatkan juga adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan yang mendapat garam (NaCl) 72 mg dengan 144 mg dan 216 mg ($p > 0,05$) serta antara perlakuan dengan 144 mg dengan 216 mg ($p < 0,05$). Analisis uji *Equality of Group Means*, didapatkan nilai perbedaan yang sangat bermakna dengan pemberian NaCl dalam respon kepadatan tulang, respon ketebalan tulang kortikal maupun respon kekuatan tulang dengan $p = 0,000$ ($p < 0,05$) untuk respon kepadatan tulang dan respon kekuatan tulang serta $p = 0,001$ ($p < 0,05$) untuk respon ketebalan tulang. Pada uji diskriminan dengan *stepwise statistics* didapatkan bahwa respon kepadatan tulang akan muncul lebih dulu disusul respon ketebalan tulang pada pemberian diet tinggi garam NaCl ($p < 0,05$). Dari hasil analisis regresi linier didapatkan persamaan linier yang menyatakan besarnya pengaruh setiap pemberian 1 mg garam (NaCl) terhadap penurunan kecepatan hantaran gelombang suara melalui tulang sebesar 0,479 m/detik, penurunan ketebalan tulang kortikal sebesar 0,001 milimeter serta penurunan kekuatan tulang sebesar 0,416 Newton.

Penelitian ini menyimpulkan bahwa pemberian diet tinggi garam (NaCl) menyebabkan peningkatan risiko patah tulang dan peningkatan dosis pemberian garam (NaCl) secara langsung akan diikuti oleh peningkatan risiko patah tulang. Akan tetapi masih sangat diperlukan penelitian lanjutan dengan menggunakan metode dan media pengukuran yang lain sebagai pembanding terutama agar diketahui seberapa besar dosis garam (NaCl) asupan yang mampu meningkatkan risiko patah tulang.

SUMMARY

The Effect of High Salt (Sodium Chloride) Intake on Fracture Risk in Male White Rats

Sunaryo Kusumo

This research was begun from the attention of the author to the high prevalence of osteoporosis cases that tend to increase the likelihood of fracture. Several researches had indicated that high salt (sodium chloride) intake influenced the quality and quantity of bone. High salt (sodium chloride) intake increase glomerular filtration rate that would lead to increased sodium as well as calcium excretion in the urine directly. This mechanism is believed to influence plasma calcium imbalance which lead to the decrease in the bone density thus the bone strength. The objective of this study was to explain the effect of high salt (sodium chloride) intake on fracture risk.

The design of this study was *The Posttest Only Control Group Design*. The research was done using 40 three months old male wistar strain white rats. These rats were randomly divided into four groups. They consists of one control group and three treatment groups. The control group were given orally 2 ml of distilled water/200 g BW/day (K1). The treatment groups were given salt (sodium chloride) orally in the dose of 72 mg/200 g BW/day (K2), 144 mg/200 g BW/day (K3) and 216 mg/200 g BW/day (K4) respectively, all of which were dissolved in 2 ml of distilled water. After 8 weeks, the bone density measurement was undertaken at metaphysial part of femoral bone of all experimental animals using ultrasound densitometry DBM Sonic 1200, the cortical width diaphyses using x-ray and the bone strength using *Unconfined Compressive Strength Machine Modified*.

The results showed the mean of bone density in control group was $1707,000 \pm 40,383$ m/sec, whereas the mean of cortical width and bone strength were $0,9589 \pm 0,0394$ mm and $664,111 \pm 17,446$ Newton respectively. The treatment groups, that were given sodium chloride of 72 mg, showed that the mean of bone density, cortical width and bone strength were $1667,000 \pm 27,898$ m/sec, $0,9079 \pm 0,0412$ mm and $609,714 \pm 8,499$ Newton. The treatment group given sodium chloride of 144 mg revealed that the mean of bone density, cortical width and bone strength were $1635,500 \pm 22,157$ m/sec, $0,8610 \pm 0,0317$ and $589,900 \pm 15,707$ Newton respectively. The last treatment group indicated that the means of bone density, cortical width and bone strength were $104,500 \pm 24,897$ m/sec, $0,1259 \pm 0,0312$ mm and $93,611 \pm 21,267$ Newton respectively.

On the other measurements it was found that the mean of bone density response, cortical width response and bone strength response in the treatments group given sodium chloride of 72 mg were $40,000 \pm 27,898$ m/sec, $0,0510 \pm 0,0412$ mm and $54,397 \pm 8,499$ Newton respectively, whereas the group given sodium chloride of 144 mg showed that the mean of bone density response, cortical width response and bone strength response were $71,500 \pm 22,157$ m/sec, $0,0979 \pm 0,0317$ mm and $74,211 \pm 15,702$ Newton respectively. The last treatment group revealed that the mean of bone density response, cortical width response and bone strength response were $104,500 \pm 24,897$ m/det, $0,1259 \pm 0,0312$ mm dan $93,611 \pm 21,267$ Newton respectively.

The result was subsequently presented descriptively and analyzed using multi variants analysis and discriminants analysis. It was shown that all experimental animals treated with high salt (sodium chloride) intake had a significant difference to control ($p < 0.05$). Pairwise comparisons showed that significant difference ($p < 0.05$) occurred

between treatment groups of 72 mg and the group of 144 mg and 216 mg. The significant difference was also found between the group of 144 mg and that of 216 mg. The tests of *Equality of Group Means*, showed that the significant difference occurred in the response of bone density, bone width and bone strength among all ($p < 0,05$). The stepwise statistics revealed that the response of bone density will appear firstly followed by the response of bone width in associated with high salt (sodium chloride) intake ($p < 0,05$). Linear regression analysis resulted in linear equation which showed that with increment of every 1 mg of salt (sodium chloride) administration there would be a decrease in the sound wave velocity through the bone of about 0.478 m/second, decrease in cortical width of about 0.001 millimeter and decrease in bone strength of about 0.416 Newton.

This study concluded that high salt (sodium chloride) intake would cause increase in fracture risk and the increase of its doses administration would be followed by further increase in fracture risk. However, further studies with different methods and measurement devices, were needed so as to know the doses of salt (sodium chloride) intake that can increase the fracture risk.

ABSTRACT

The Effect of High Salt (Sodium Chloride) Intake on Fracture Risk in Male White Rats

Sunaryo Kusumo

The past epidemiologic studies did not have definite explanation about the effect of consuming high salt (sodium chloride) on fracture risk and they just showed that high salt (sodium chloride) diet influence the bone density. The objective of this study was to explain the effect of high salt (sodium chloride) intake on fracture risk. Experimental animals used in this study were three months old male wistar strain white rats. Those rats were randomly divided into four groups, 10 rats for each group, which consist of one control group and three treatment groups. The control group were given orally 2 ml of distilled water/200 g BW/day, while the treatment groups were subjected to three salt (sodium chloride) suspension orally of 72 mg/200 g BW/day, 144 mg/200 g BW/day and 216 mg/200 g BW/day respectively, all of which were dissolved in 2 ml of distilled water. After 8 weeks, the bone density was measured at the metaphysial part of femoral bone of all experimental animals using ultrasound densitometry DBM Sonic 1200, the cortical width with radiograph, and the bone strength with *Unconfined Compressive Strength Machine Modified*. The result was subsequently presented descriptively and analyzed using multi variants analysis and discriminants analysis. It showed that all of the experimental animals with high salt (sodium chloride) intake had a significant difference to control ($p < 0.05$). Pairwise comparisons showed that significant difference ($p < 0.05$) occurred between the treatment groups of 72 mg and those of 144 mg and 216 mg. The significant difference was also found between the group of 144 mg and that of 216 mg. The tests of *Equality of Group Means*, showed that the significant difference occurred in the response of bone density, bone width and bone strength among all ($p < 0,05$). The pairwise statistics revealed that the response of bone density will appear firstly followed by the response of bone width in associated with high salt (sodium chloride) intake ($p < 0,05$). Linear regression analysis resulted in linear equation which showed that with increment of every 1 mg of salt (sodium chloride) administration there would be a

decrease in the sound wave velocity through the bone of about 0.478 m/second, decrease in cortical width of about 0.001 millimeter and decrease in bone strength of about 0.416 Newton.

This study concluded that high salt (sodium chloride) intake would cause increase in fracture risk and the increase of its doses administration would be followed by further increase in fracture risk. However, further studies with different methods and measurement devices, were needed so as to know the doses of salt (sodium chloride) intake that can increase the fracture risk.

Keywords: salt (sodium chloride) intake, bone strength, bone density, fracture risk.

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	v
Penetapan Panitia	vi
Ucapan terima kasih	vii
Ringkasan	x
Summary	xiv
Abstract	xvii
DAFTAR ISI	xix
DAFTAR TABEL	xxi
DAFTAR GAMBAR	xxii
DAFTAR LAMPIRAN	xxiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Metabolisme Sel-Sel Tulang dan Proses Resorpsi Tulang	6
2.1.1 Osteoblas	6
2.1.2 Faktor-faktor dan hormon yang mengontrol osteoblas	8
2.1.3 Osteosit	9
2.1.4 Osteoklas	9
2.1.4.1 Hormon Paratiroid	13
2.1.4.2 1,25-dihidroksikalsitriol	14
2.1.4.3 Kalsitonin	14
2.1.5 Mekanisme penyerapan tulang secara molekuler	14
2.2 Pengaruh Perubahan Natrium Plasma Terhadap Volume Cairan Ekstraseluler dan Produksi Urin	16
2.3 Pengaruh Peningkatan Diet Natrium Terhadap Metabolisme Kalsium	19
2.3.1 Peningkatan ekskresi kalsium urin	19
2.3.2 Penurunan konsentrasi kalsium terionisasi pada plasma	21
2.4 Aktivitas Penyerapan Tulang Karena Pengaruh Hormon Paratiroid	22
2.4.1 Aktivitas subseluler hormon paratiroid	23
2.5 Biomekanika Tulang	24

2.5.1	Gaya yang bekerja pada sistem muskuloskeletal	26
2.5.2	Pengaruh perubahan arsitektur tulang terhadap risiko patah tulang....	27
2.5.3	Perkiraan risiko patah tulang	28
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN		
3.1	Kerangka Konseptual	30
3.2	Dasar Teori	31
3.3	Hipotesis	34
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN		
4.1	Rancangan Penelitian	35
4.2	Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel....	36
4.3	Variabel Penelitian	37
4.3.1	Klasifikasi variabel	37
4.3.2	Definisi operasional variabel ..	37
4.4	Bahan dan Instrument	39
4.5	Prosedur Penelitian	40
4.6	Lokasi dan Waktu Penelitian	45
4.7	Analisis Data	45
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN		
5.1	Data Penelitian	47
5.2	Hasil Uji Statistik Diskriptif	50
5.3	Hasil Uji Normalitas	51
5.4	Hasil Analisis Multi Varian	53
5.5	Hasil Analisis Diskriminan	56
5.6	Hasil Analisis Regresi	58
BAB 6 PEMBAHASAN		
6.1	Metode Penelitian	63
6.2	Pembahasan Hasil Penelitian	64
BAB 7 PENUTUP		
7.1	Kesimpulan	72
7.2	Saran	72
LAMPIRAN		
AFTAR PUSTAKA		74
AMPIRAN		79

DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 5.1	: Data hasil pengukuran kepadatan tulang (m/det) dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.....	48
Tabel 5.2	: Data hasil pengukuran ketebalan tulang kortikal (mm) dari kelompok kontrol dan perlakuan.....	49
Tabel 5.3	: Data hasil pengukuran kekuatan tulang (N) kelompok kontrol dan kelompok perlakuan	49
Tabel 5.4	: Rerata dan simpangan baku variabel tergantung dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan	50
Tabel 5.5	: Rerata dan simpangan baku respon dari variabel tergantung dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.....	51
Tabel 5.6	: Hasil uji distribusi data kelompok terhadap kepadatan tulang, ketebalan dan kekuatan tulang	52
Tabel 5.7	: Hasil uji distribusi data kelompok terhadap respon kepadatan tulang, respon ketebalan dan respon kekuatan tulang.....	52
Tabel 5.8	: Hasil perhitungan uji multi varian untuk kepadatan tulang, ketebalan tulang dan kekuatan tulang	53
Tabel 5.9	: Hasil perhitungan uji multi varian untuk respon kepadatan tulang, respon ketebalan tulang dan respon kekuatan tulang ...	53
Tabel 5.10	: Hasil perhitungan uji beda untuk variabel kepadatan tulang ketebalan tulang kortikal dan kekuatan tulang	54
Tabel 5.11	: Hasil perhitungan uji beda untuk variabel respon kepadatan tulang respon ketebalan tulang kortikal dan respon kekuatan tulang ...	55
Tabel 5.12	: Hasil uji <i>Equality of group of means</i>	57
Tabel 5.13	: Hasil uji diskriminan	58
Tabel 5.14	: Hasil uji analisis regresi linier terhadap kepadatan tulang, ketebalan tulang dan kekuatan tulang	59

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Kurva Stress-strain.....	25
Gambar 5.1 : Hubungan antara NaCl dengan kepadatan tulang	61
Gambar 5.2 : Hubungan antara NaCl dengan ketebalan tulang	62
Gambar 5.3 : Hubungan antara NaCl dengan kekuatan tulang	62

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1	: Perhitungan besar sampel	79
Lampiran 2	: Perhitungan dosis hewan coba menggunakan tabel konversi Laurence & Bacharach	81
Lampiran 3	: Konversi perhitungan dosis natrium untuk hewan coba.	82
Lampiran 4	: Pemberian volume larutan obat maksimal pada perlakuan hewan coba	83
Lampiran 5	: Daftar kandungan mineral pada makanan standar.....	84
Lampiran 6	: Cara membuat larutan garam (NaCl)	85
Lampiran 7	: Cara pengukuran densitas tulang	86
Lampiran 8	: Cara pengukuran kekuatan tulang	87
Lampiran 9	: Cara pengukuran ketebalan tulang pada hewan coba ...	88
Lampiran 10	: Data hasil pengukuran kepadatan tulang, ketebalan tulang dan kekuatan tulang	90
Lampiran 11	: Hasil perhitungan statistik diskriptif.....	92
Lampiran 12	: Hasil perhitungan One-sample Kolmogorov-Smirnov kelompok variabel tergantung	93
Lampiran 13	: Hasil perhitungan One-sample Kolmogorov-Smirnov kelompok respon I tergantung	95
Lampiran 14	: Hasil perhitungan uji analisis multi varian	97
Lampiran 15	: Hasil uji beda antar kelompok	98
Lampiran 16	: Hasil Analisis Diskriminan	99

Lampiran 17 :	Curve fit	100
Lampiran 18 :	Profil plot variabel tergantung	103
Lampiran 19 :	Profil plot respon variabel tergantung	104

DAFTAR SINGKATAN

ADH	: Anti Diuretic Hormone
ANP	: Atrium Natriuretic Protein
BMP	: Bone Morphogenic Protein
BRC	: Bone Resorption Complex
BSP	: Bone Sialoprotein
CA II	: Carbonic Anhydrase II
SSF-1	: Colony Stimulating Factor
FGF	: Fibroblast Growth Factor
GFR	: Glomerular Filtration Rate
GM-CFU	: Granulocyte/Monocyte-Colony Forming Unit
IFN- γ	: Interferon- γ
IGF-1	: Insulin-like Growth Factor-1
IL-1	: Interleukin-1
LT	: Limfotoksin
OP	: Osteopontin
OPG	: Osteoprotegerin
OPGL	: Osteoprotegerin-Ligand
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
PGE2	: Prostaglandin E2
PTH	: Parathyroid hormone
RAAS	: Renin Angiotensin Aldosterone
RANK	: Receptor Activator of NF- κ B Signaling

- RANKL** : Receptor Activator of NF- κ B Signaling Ligand
- TGF- α** : Tumor Growth Factor- α
- TNF** : Tumor Necrosis Factor
- TRAP** : Tartrate Resistance Acid Phosphatase
- cAMP** : cyclic Adenosine Mono Phosphate

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Osteoporosis merupakan masalah kelainan tulang yang paling umum di negara-negara barat maupun Amerika (Maddison, 1998). Di Amerika Serikat pada tahun 1999 diperkirakan terjadi 1,3 juta kejadian patah tulang yang berhubungan dengan osteoporosis tiap tahun, yang membutuhkan dana lebih dari 10 milyar \$US pertahun (Tjokroprawiro, 2003). Sedangkan di Indonesia secara keseluruhan belum pernah dilakukan penelitian mendalam tentang osteoporosis, baik dalam kejadian maupun dampaknya (Roeshadi, 1997 ; Tjokroprawiro, 2003). Tetapi menurut Roeshadi (2002) angka kejadian osteoporosis di Surabaya mencapai 26 % pada wanita paska menopause.

Osteoporosis, menurut Concensus Development Conference 1991, didefinisikan sebagai suatu penyakit yang ditandai oleh menurunnya massa tulang serta diikuti kerusakan mikroarsitektur tulang yang berakibat meningkatnya kerapuhan tulang dan mengakibatkan tulang mudah patah (Maddisson, 1998). Definisi ini telah disempurnakan oleh WHO pada tahun 1994 dengan tambahan definisi berdasar pada densitas tulang, dimana densitas tulang penderita osteoporosis lebih rendah dari 2,5 standar deviasi dari massa tulang pada periode puncak (Maddison, 1998 ; Roeshadi, 2000).



Salah satu usaha pencegahan terjadinya osteoporosis dini adalah dengan pengaturan diet yang salah satu diantaranya adalah pengaturan asupan natrium (Tjokroprawiro, 2003).

Menurut Matkovic et al (1996) terjadi peningkatan ekskresi kalsium urin sebesar 50 mg/hari setiap penambahan asupan natrium sebesar 500 mg/hari. Sedangkan menurut penelitian Sellmeyer (2002), terjadi peningkatan ekskresi kalsium dan tanda-tanda peningkatan resorpsi tulang pada wanita yang secara random diberi diet tinggi natrium sebesar 225 mmol/hari. Sementara itu Evans et al (1997), mendapatkan terjadinya peningkatan tanda-tanda resorpsi tulang akibat peningkatan asupan natrium dari sebesar 300 mmol/hari dibanding dengan asupan 50 mmol/hari. Sedangkan Blackwood (2000) pada penelitiannya mendapatkan bahwa kalsium yang hilang melalui urine akibat diet natrium yang meningkat 100 mmol/hari selama 10 tahun akan sebanding dengan 10 % kalsium tubuh total.

Sementara itu menurut Melton dan Riggs (1993), di bidang biomekanika kejadian patah tulang ditentukan oleh 3 hal, yaitu 1) struktur geometri tulang 2) komposisi zat yang menyusun tulang yang diwakili oleh densitas massa tulang dan 3) lokasi dan arah gaya yang bekerja. Hal ini sesuai dengan penelitian Watts (2003) bahwa densitas massa tulang tidak dapat digunakan sebagai pedoman untuk mengetahui pengurangan risiko patah tulang non-vertebra, tetapi harus dikonfirmasi dengan petanda yang lain, karena peningkatan densitas massa tulang hanya mampu menghitung 6-12 % dari pengurangan risiko patah tulang non-vertebra.

Sementara itu Barzel (1997) dan Lin (2001) dalam penelitian yang dilakukan oleh Sacks (2001) menyebutkan bahwa memang terdapat perbedaan jika

dibandingkan antara kelompok kontrol dengan kelompok yang memperoleh diet natrium baik dalam penurunan pembentukan tulang maupun penurunan resorpsi tulang. Tetapi secara umum mereka mendapatkan bahwa diet natrium tidak mempengaruhi metabolisme tulang secara signifikan. (Barzel, 1997)

Atas dasar beberapa data di atas tentang pengaruh diet tinggi natrium terhadap kepadatan tulang yang masih kontroversi serta adanya faktor perancu pada manusia yang kurang diperhatikan pada penelitian-penelitian tersebut, maka diperlukan penelitian dengan metode lain untuk mengetahui pengaruh diet tinggi garam (NaCl) terhadap kepadatan tulang serta hubungannya dengan risiko patah tulang. Berangkat dari kontroversi inilah peneliti ingin mengetahui apakah diet tinggi garam (NaCl) berpengaruh terhadap kepadatan tulang dan ketebalan tulang. Selanjutnya peneliti ingin mengetahui bagaimana pengaruh diet tinggi garam (NaCl) ini terhadap risiko patah tulang yang ditentukan oleh besarnya gaya yang dapat ditahan oleh tulang sampai terjadi patah tulang yang dalam penelitian ini dilakukan pada tikus putih jantan.

Menurut Burhanudin (2001), kebutuhan konsumsi garam penduduk Indonesia meningkat tiap tahun seiring dengan bertambahnya penduduk serta meningkatnya produk-produk makanan kering berpengawet yang membutuhkan garam. Sepanjang tahun 2000, konsumsi garam penduduk Indonesia adalah sebesar 3 kg/orang/tahun atau sebesar 8,2 g/orang/hari. Sedangkan menurut Favus (1993) konsumsi diet garam harian normal adalah sebesar 10 mmol – 350 mmol/orang/hari atau sebesar 230 mg – 8.050 mg/orang/hari.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan sebelumnya, maka rumusan permasalahan pada penelitian ini disusun seperti berikut ini :

1. Apakah diet tinggi garam (NaCl) menurunkan kepadatan tulang ?
2. Apakah diet tinggi garam (NaCl) menurunkan ketebalan tulang ?
3. Apakah ada hubungan antara peningkatan diet garam (NaCl) dengan peningkatan risiko patah tulang ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Membuktikan pengaruh diet tinggi garam (NaCl) terhadap kepadatan tulang serta ketebalan tulang kortikal dan mengetahui hubungan antara peningkatan diet garam (NaCl) terhadap peningkatan risiko patah tulang.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan bahwa diet tinggi garam (NaCl) menyebabkan penurunan kepadatan tulang.
2. Membuktikan bahwa diet tinggi garam (NaCl) menyebabkan penurunan ketebalan tulang.
3. Mengetahui pengaruh peningkatan diet garam (NaCl) terhadap peningkatan risiko patah tulang.

1.4 Manfaat Penelitian

Apabila telah diketahui bahwa diet tinggi garam (NaCl) berpengaruh terhadap penurunan kepadatan tulang maupun penurunan ketebalan tulang serta terdapat hubungan dengan peningkatan risiko patah tulang, maka dapat diupayakan pembatasan konsumsi garam (NaCl) bagi masyarakat umum sehingga dapat mencegah timbulnya osteoporosis dini yang secara langsung akan mengurangi risiko patah tulang. Sehingga secara keseluruhan akan dapat meningkatkan kualitas hidup manusia Indonesia.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Metabolisme Sel-Sel Tulang dan Proses Resorpsi Tulang

2.1.1 Osteoblas

Osteoblas adalah sel pembentuk tulang yang berasal dari sel mesenkim lokal yang pluripoten yang disebut sebagai sel prekursor. Sel prekursor ini, oleh suatu rangsangan yang adekuat, akan mengalami proliferasi dan diferensiasi menjadi preosteoblas dan setelah matang menjadi osteoblas (Favus, 1993 ; Riggs, 1995).

Sel-sel osteoblas bertanggungjawab baik bagi produksi maupun mineralisasi matriks tulang (kolagen maupun substansi dasar pendukung mineralisasi yang lain). Terdapat tiga bentuk osteoblas yaitu osteoblas progenitor (preosteoblas), osteoblas dan osteosit (Apley, 1993; Favus, 1993).

Sel-sel progenitor yang akan menjadi osteoblas memiliki gambaran yang khas yaitu : 1) sel ini secara fisik terletak dekat dengan permukaan pembentukan tulang, 2) memiliki kapasitas untuk membelah, 3) sel ini biasanya dapat dicat secara nyata untuk alkali fosfatase dan tidak banyak didapatkan retikulum endoplasma kasar (Favus, 1993).

Sel-sel osteoblas yang tidak aktif akan tampak sebagai sel-sel yang berbentuk pipih yang terdapat di sepanjang permukaan tulang trabekular (endosteum), permukaan tepi tulang (periosteum) maupun pada kanal Haversian. Sel-sel ini biasa disebut sebagai *lining cells*.

Sel-sel osteoblas yang aktif akan berbentuk bulat, oval atau polihedral serta banyak mengandung retikulum endoplasma, membran golgi dan mitokondria (Favus, 1993).

Osteoblas berhubungan satu sama lain dan dengan osteosit melalui juluran sitoplasma atau prosesus seluler yang disebut kanalikuli (Favus, 1993; Vigorita, 1999). Kontak antar sel ini mengatur aktivitas seluler kedua sel (Smith, 1998).

Osteoblas mempunyai peranan dalam mengendalikan gelombang elektrolit pada cairan intersisial dan mempengaruhi mineralisasi matrik tulang melalui sintesa komponen matrik organik tulang dan produksi vesikel matrik. Osteoblas mengatur konsentrasi kalsium dalam matrik melalui pelepasan kalsium dari intraseluler (Bostrom, 2000). Difusi kalsium dari osteoblas ke matrik dilakukan melalui bundle dari filamen tipis yang terdapat pada tonjolan-tonjolan osteoblas (Resnick, 1995).

Pada tingkat ultrastruktur osteoblas ditandai dengan : 1) adanya retikulum endoplasma kasar yang berkembang dengan baik dengan sisterna yang melebar dengan isi granuler yang padat, dan 2) adanya kompleks Golgi sirkuler yang besar berisi berbagai tumpukan produknya serta mitokondria pada sekeliling kompleks Golgi dengan partikel-partikel padat pada membran dalamnya yang diduga mengandung banyak kalsium dan fosfor yang menggambarkan mineralisasi (Vigorita, 1999). Pada membran plasma osteoblas ditemukan banyak sekali alkali fosfatase (kadar alkali fosfatase serum seringkali dipakai sebagai petunjuk dari pembentukan tulang) (Favus, 1993).

Osteoblas memiliki reseptor untuk hormon paratiroid, tapi tidak untuk kalsitonin; osteoblas juga memiliki reseptor untuk estrogen dan 1,25-dihidroksikalsitriol disamping beberapa reseptor lain yang berguna bagi proliferasi, diferensiasi maupun remodeling tulang. Osteoblas tidak mengalami mitosis, dan bila hal ini terjadi dikatakan sel tersebut merupakan bentuk progenitor osteoblas atau osteoblas yang kembali menjadi progenitornya. Setelah waktu pembentukan tulang berakhir, osteoblas akan menjadi *lining cells* atau osteosit (Favus, 1993).

2.1.2 Faktor-faktor dan hormon yang mengontrol fungsi osteoblas

Hormon-hormon sistemik, sitokin lokal dan juga stress mekanik dapat mempengaruhi aktivitas osteoblas untuk melepaskan mediator yang banyak terdapat di tempat pembentukan tulang termasuk tempat remodeling tulang dan tempat penyembuhan fraktur. Aktivitas osteoblas antara lain dirangsang oleh hormon paratiroid, 1,25 dihidroksi kolekalsiferol, IL-1, T3 dan T4, IGF-1, hGH, PGE2 dan TNF, serta dihambat oleh kortikosteroid (Smith, 1998 ; Ganong, 1999).

a. Faktor sistemik

PTH memediasi transport ion dan asam amino, merangsang produksi cAMP, mengatur sintesa kolagen, serta menyebabkan perubahan pada sitoskeleton osteoblas sehingga mengalami pengkerutan (Guyton, 1997).

1,25-dihidroksikalsitriol merangsang sintesa matrik dan alkali fosfatase, produksi protein spesifik tulang, dan terikat pada reseptor khusus (Favus, 1993).

b. Faktor lokal.

Minimal terdapat 10-15 faktor lokal telah diketahui berperan dalam mengatur seluruh aspek dari fungsi osteoblas. Faktor-faktor local tersebut antara lain adalah TGF β -1-2-3, BMP 1-7, IGF 1-2, PDGF serat FGF (Bronner,1991).

2.1.3 Osteosit

Osteosit adalah osteoblas yang telah berhenti berkalsifikasi. Sekitar 10-20 % osteoblas akhirnya akan menjadi osteosit dan benar dikatakan bahwa seluruh osteosit berasal dari osteoblas. Perubahan dari preosteoblas menjadi osteoblas memerlukan beberapa hari sedang osteoblas akan menjadi osteosit setelah berumur maksimal 12 minggu. Secara ultrastruktur, osteosit mirip dengan osteoblas dengan inti yang prominen serta retikulum endoplasma kasar yang berlimpah. Terdapat daerah alat Golgi yang jelas, mitokondria, mikrotubulus serta mikrofilamen (Favus, 1993).

Osteoblas dan osteosit muda masih memiliki aktivitas alkali fosfatase pada membrannya. Aktivitas ini berhubungan dengan ikatannya dengan molekul atau ion yang bermuatan positif seperti kalsium. Sehingga alkali fosfatase ini sangat penting peranannya dalam transport kalsium melalui membran sel osteoblas serta osteosit muda (Vigorita, 1999).

2.1.4 Osteoklas

Osteoklas berasal dari sel mononuklear hematopoitik pada sumsum tulang. Prekursor osteoklas mononuklear dapat bersirkulasi dalam darah (Roodman, 1999). Pada permukaan endosteal tulang, prekursor berproliferasi, berfusi membentuk sel

multinuklear, membentuk *ruffled border*, dan meresorpsi tulang. Sel asal dari osteoklas berdiferensiasi membentuk granulosit atau monosit. Sel utama dari jalur tersebut umumnya adalah seri granulosit makrofag (Granulocyte-Macrophage Colony Forming-Units = GM-CFU)(Vigorita, 1999).

Osteoklas terdapat pada permukaan endosteum, dalam sistem Havers dan terkadang pada permukaan periosteum. Sel-sel ini biasanya tidak tampak pada permukaan sel normal, tapi seringkali pada tempat yang secara aktif mengalami remodeling, seperti metafisis tulang yang sedang tumbuh atau di sekeliling proses patologis seperti tumor (Favus, 1993 ; Smith, 1998).

Osteoklas merupakan sel yang bergerak dan sel utama yang bertanggung jawab terhadap resorpsi tulang (Udagawa;1992). Sel ini merupakan sel besar dengan inti banyak (4-20 inti) dan biasanya ditemukan berhubungan dengan permukaan tulang yang terkalsifikasi dan dalam suatu lakuna (lakuna Howship) yang merupakan hasil dari aktivitas resorpsi oleh osteoklas sendiri. Biasanya hanya ditemukan satu atau dua osteoklas tiap tempat resorpsi, tetapi kadang ditemukan empat atau lima osteoklas (Favus, 1993).

Dengan mikroskop cahaya, inti tampak sangat bervariasi dalam satu sel : kadang bulat dan eukromatik atau sangat irreguler dan heterokromatik, mungkin menggambarkan tingkat fusi dari prekursor mononuklearnya. Inti osteoklas terletak pada tengah sel, biasanya memiliki 1-2 nukleolus. Jumlah inti dan besarnya osteoklas ini sangat mempengaruhi kemampuan resorpsi dari osteoklas (Lees ; 2000).

Gambaran ultrastruktur osteoklas ditandai dengan melimpahnya kompleks Golgi di sekeliling inti, mitokondria, dan vesikel yang penuh dengan enzim-enzim lisosomal. Gambaran yang paling terkenal dari osteoklas adalah lipatan yang dalam dari membran plasma pada permukaan yang berhadapan dengan matrik tulang : bentuk ini disebut *ruffled border* yang dikelilingi oleh suatu cincin protein kontraktil yang menjamin perlekatan osteoklas pada permukaan tulang dan memisahkan kompartemen penyerapan tulang di bawah osteoklas (*sealing zone*), kompartemen ini berfungsi sebagai lisosom sekunder bagi osteoklas. Perlekatan osteoklas dan tulang melalui reseptor integrin, yang terikat pada rantai protein spesifik pada matrik (Favus, 1993).

Plasma membran pada daerah *ruffled border* mengandung beberapa protein yang akan membantu bagi pelepasan enzim lisosomal dan suatu tipe spesifik dari proton ATPase yang terlibat dalam asidifikasi lisosom sekunder. Membran plasma basolateral osteoklas diperkaya dengan pompa natrium ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase), pertukaran $\text{HCO}_3^- / \text{Cl}^-$ dan pertukaran Na^+ / H^+ (Vigorita, 1999).

Osteoklas sulit dibedakan dengan makrofag polikarion yang merupakan sel dengan asal yang sama. Gambaran yang bisa membedakannya adalah kemampuan meresorpsi tulang, kemampuan membentuk *ruffled border*, adanya kontraksi pada sitoplasma karena paparan terhadap osteokalsin, adanya reaksi silang dengan antibodi monoklonal spesifik bagi osteoklas serta responsif terhadap hormon-hormon kalsiotropik. Adanya tartrat-resistance-acid phosphatase (TRAP) suatu petanda yang sangat membantu tapi tidak dapat digunakan untuk membedakan osteoklas dengan

makrofag polikarion (Bronner, 1991). Untuk memudahkan pembedaan osteoklas dengan sel lain disetujui bahwa osteoklas aktif adalah yang membentuk lubang penyerapan, multinuklear dan merespon sitoplasma terhadap kalsitonin (Favus, 1993).

Senyawa-senyawa perangsang osteoklas (PTH, IL-1, TNF, TGF- α , 1,25-dihidoksikalstriol, dan LT) akan mengaktifkan osteoklas. Sedangkan senyawa senyawa kalsitonin, IFN- γ , dan TGF- β menghambat osteoklas. Tetapi tidak semua senyawa tersebut bekerja langsung pada osteoklas. Sebagai contoh, reseptor PTH terdapat pada membrane sel osteoblas yang akan mengaktifkan proses proliferasi dan diferensiasi osteoklas. Jadi aktivasi osteoklas oleh PTH tidak terjadi secara langsung (Favus,1993).

Beberapa sitokin lokal sangat mempengaruhi baik pematangan maupun aktivitas osteoklas. Sitokin seperti interleukin-1 (IL-1), limfotoksin (LT), tumor necrosis factors (TNF), colony stimulating factor-1 (CSF-1), transforming growth factor- α (TGF- α) dan glukokortikoid merangsang osteoklas baik pada tingkat proliferasi maupun diferensiasi. Sedangkan interferon- γ (IFN- γ), transforming growth factor- β (TGF- β), glukokortikoid dan hormone seks seperti estrogen jelas menekan aktivitas osteoklas baik melalui hambatan terhadap diferensiasi sel prekursor maupun hambatan terhadap proliferasi sel progenitor. TGF- β menghambat aktivitas osteoklas matur dengan penurunan produksi superoksida dan hambatan terhadap akumulasi TRAP pada osteoklas, sedang estrogen menekan produksi sitokin peresorpsi tulang seperti IL-1 (Favus, 1993 ; Vigorita 1999).



Suasana asam juga sangat mendukung aktivitas resorpsi oleh osteoklas. pH yang berubah turun 0,1 unit dari 7,25 menjadi 7,15 sudah menyebabkan perubahan aktivitas resorpsi osteoklas yang sangat besar yaitu sekitar 6 kali aktivitas sebelumnya (Arnett 1996 ; Bushinsky 2001).

Faktor-faktor lain yang mempengaruhi aktivitas osteoklas diantaranya adalah vitamin A, beberapa leukotrin seperti prostaglandin serta radikal bebas derivat oksigen diketahui terlibat dalam penyerapan tulang oleh osteoklas. Hal ini terbukti dari jaringan-jaringan yang kekurangan radikal seperti superoksida dismutase, akan terhenti proses resorpsi tulang oleh osteoklas meski dirangsang oleh PTH ataupun IL-1. Fosfat menghambat aktivitas osteoklas pada kultur organ, sedang senyawa-senyawa farmakologis seperti plicamycin (mithramycin), gallium nitrat dan bisfosfonat menghambat resorpsi tulang (Bronner, 1991).

2.1.4.1 Hormon paratiroid (PTH)

PTH merangsang proliferasi progenitor untuk berfusi membentuk osteoklas polinuklear matur. PTH juga mengaktivasi osteoklas untuk melakukan resorpsi. Aktivasi ini terjadi baik secara langsung maupun tidak langsung. Secara langsung (Anderson , 1986) PTH akan mempengaruhi kerja enzim karbonik anhidrase sehingga suasana BRC (*Bone Resorption Complex*) menjadi lebih asam, sedang tidak langsung melalui sel-sel jalur pembentukan osteoblas yang diantaranya adalah *lining cell* (Vigorita, 1999).

2.1.4.2 1,25-dihidroksikalsitriol

1,25-dihidroksikalsitriol merupakan stimulator penyerapan tulang yang kuat. Seperti PTH, hormon ini merangsang diferensiasi progenitor osteoklas dan fusiya. Tapi juga memiliki efek serupa pada makrofag polikarion yang bukan osteoklas. Hormon ini juga mengaktivasi osteoklas matur untuk melakukan resorpsi. Vitamin ini juga memiliki efek tidak langsung melalui hambatan terhadap proliferasi sel-T dan produksi IL-2. Hormon ini meningkatkan produksi IL-1 dari sel monosit, dimana IL-1 merupakan activator kuat bagi osteokals baik proliferasi, diferensiasi maupun proses resorpsinya (Favus, 1993).

2.1.4.3 Kalsitonin

Kalsitonin merupakan hormon polipeptida yang merupakan penghambat kuat bagi resorpsi tulang, tetapi efeknya hanya sementara. Sehingga penderita dengan hiperkalsemia bila diterapi dengan kalsitonin akan membaik hanya beberapa saat saja sebelum hiperkalsemianya berulang (48-72 jam). Kalsitonin juga melarutkan osteoklas matur menjadi sel mononuklear. Ia juga menghambat pembentukan osteoklas melalui hambatan pada proliferasi progenitor maupun diferensiasinya. Efek kalsitonin pada osteoklas diperantarai oleh cAMP (Guyton, 1997).

2.1.5 Mekanisme molekuler penyerapan tulang

Proses resorpsi tulang oleh osteoklas berawal ketika *lining cell* (yang merupakan asal dari osteoblas) terpapar senyawa peresorpsi tulang (PTH ataupun 1,25-dihidroksikalsitriol). Reaksi pertama yang terjadi adalah retraksi dari *lining cell*

sehingga memberi ruang bagi osteoklas untuk membentuk tangan pada daerah tersebut serta membentuk *ruffled border* (Riggs, 1995).

Permukaan dimana osteoklas meresorpsi tulang terlebih dahulu akan dipersiapkan oleh osteoblas dengan pelepasan enzim kolagenase dan stromelysin (Vigorita, 1999). Sejalan dengan itu, *lining cells* telah teraktivasi yang akan berubah menjadi preosteoblas lalu menjadi osteoblas. Bersamaan itu pula muncullah RANK pada sisi membran luar osteoblas yang akan berikatan dengan RANKL pada sel progenitor osteoklas yang menyebabkan aktivasi terhadap proliferasi dan diferensiasi osteoklas (Shiotani, 2002).

Selanjutnya osteoklas yang terbentuk akan melekat pada tulang melalui protein integrin (reseptor vitronectin) yang terikat dengan protein matrik tulang (Osteopontin dan Bone Sialoprotein). Ikatan dengan protein matrik tulang melibatkan rantai amino khusus Arg-Gly-Asp (RGD) pada protein matrik tulang dan peptida sintetik. Akibat ikatan ini terbentuk lacuna (disebut sebagai lacuna Howship) yang sekelilingnya tertutup dengan ikatan tadi yang disebut sebagai *sealing zone* (Bronner, 1991).

Selanjutnya osteoklas memproduksi enzim proteolitik dan ion hidrogen yang akan disekresikan ke dalam lacuna atau *bone resorption complex* (Lees ; 2000). Ion hidrogen dihasilkan oleh osteoklas melalui enzim karbonik anhidrase II (CA II) (Smith, 1998 ; Inoue 1999). Mereka dipompa melalui *ruffled border* oleh pompa proton (proton-ATPase) (Ganong, 1999).

Suasana asam akibat tingginya ion hidrogen dalam lacuna akan menyebabkan mineral pada tulang menjadi larut disamping menjadi suasana yang optimal bagi enzim proteolitik untuk mendegradasi matrik tulang (Razaq, 2000 ; Kim HM,2001).

Tirosin kinase spesifik dibutuhkan untuk pembentukan lubang resorpsi. Protoonkogen src merupakan tirosin kinase berlimpah yang terikat pada membran serta berhubungan erat dengan sitoskeleton. Hilangnya src akan mengakibatkan tidak terbentuknya *ruffled border* sehingga tidak terjadi penyerapan tulang yang berakibat osteopetrosis (Favus, 1993)).

Beberapa sel juga terlibat dalam penyerapan tulang, diantaranya adalah osteosit, monosit, sel tumor dan osteoblas. Resorpsi tulang oleh karena osteosit, juga disebut "osteosit osteolisis". Monosit dan makrofag biasanya berfungsi sebagai prekursor penyerapan tulang. Bukti terakhir menyatakan bahwa osteoblas mungkin sebagai sel pembantu dalam proses resorpsi oleh osteoklas dengan menyediakan permukaan tulang yang akan diresorpsi oleh enzim-enzim osteoklas. Meski osteoklas sebagai sel utama dalam penyerapan tulang namun aktivitasnya bergantung pada sel lain terutama osteoblas dan sel imun (Vigorita ; 1999).

2.2 Pengaruh Perubahan Natrium Plasma Terhadap Perubahan Volume Cairan Ekstraseluler dan Produksi Urin

Natrium merupakan kation yang paling banyak pada cairan ekstraseluler dan lebih dari 90 % garam natrium merupakan zat terlarut yang sangat aktif secara

osmotik pada plasma maupun cairan intersisial. Konsekuensinya, muatan natrium menjadi determinan utama dari volume ekstraseluler (Ganry, 2003).

Volume cairan ekstraseluler terutama ditentukan oleh keseimbangan antara asupan dan keluaran air serta garam. Perubahan kandungan natrium klorida dalam cairan ekstraseluler biasanya menyebabkan perubahan yang searah pada cairan ekstraseluler sehingga osmolalitas dan konsentrasi natrium plasma dipertahankan konstan (Guyton, 1997).

Bila osmolaritas (konsentrasi natrium plasma) meningkat di atas normal akibat kekurangan air atau asupan natrium yang tinggi, maka sel osmoreseptor pada hipotalamus anterior mengirimkan sinyal ke nukleus supraoptikus yang selanjutnya nukleus ini mengirim sinyal untuk merangsang hipofise posterior melepaskan ADH. ADH akan meningkatkan permeabilitas tubulus terhadap air sehingga menyebabkan peningkatan reabsorpsi air dan menyebabkan meningkatnya jumlah volume cairan ekstraseluler. Jadi air disimpan dalam tubuh sedangkan natrium dan zat terlarut lainnya terus dikeluarkan dalam urin (Favus, 1993 ; Guyton, 1997).

Ginjal memiliki kemampuan yang mengagumkan dalam menyesuaikan ekskresi garam dan airnya, yaitu dari sepersepuluh nilai normal sampai 10 kali normal. Sewaktu asupan natrium meningkat, pada awalnya ekskresi natrium sedikit ketinggalan di belakang asupan, selanjutnya dihasilkan sedikit peningkatan pada keseimbangan natrium kumulatif yang menyebabkan sedikit peningkatan volume cairan ekstraseluler. Peningkatan volume ekstraseluler ini memicu refleksi reseptor bertekanan rendah yang berasal dari reseptor regang pada atrium kanan dan

pembuluh darah pulmonal yang akan mengeluarkan *atrium natriuretic peptide* (ANP). ANP ini akan menurunkan reabsorpsi natrium pada tubulus (Guyton, 1997).

Mekanisme lain terjadi melalui peningkatan tekanan arterial kecil pada ginjal akibat kenaikan volume ekstraseluler yang akan meningkatkan ekskresi natrium melalui natriuresis tekanan. Jadi, natriuresis dan penekanan sistem penahanan natrium dan air akan menimbulkan peningkatan ekskresi natrium saat asupan natrium meningkat (Ganong 1995 ; Guyton,1997).

Peningkatan volume cairan ekstraseluler juga menyebabkan peningkatan GFR yang secara langsung akan meningkatkan jumlah aliran natrium pada *ansa Henle* serta konsentrasi natrium pada *macula densa*. Konsentrasi natrium yang tinggi pada *macula densa* akan menurunkan sekresi sistem renin-angiotensin. Penurunan angiotensin II menyebabkan beberapa perubahan penting dalam reabsorpsi natrium, yaitu :

1. Penghambatan sekresi aldosteron sehingga permeabilitas sisi luminal sel tubulus menurun terhadap natrium, serta kerja pompa sodium-potasium akan menurun dengan akibat akhir meningkatnya jumlah natrium dalam lumen tubulus.
2. Penurunan tahanan arterioler eferen yang menyebabkan peningkatan tekanan hidrostatik kapiler peritubuler dengan akibat menurunnya reabsorpsi natrium oleh kapiler peritubuler sehingga ekskresi natrium akan meningkat.

3. Penurunan angiotensin II secara langsung akan menurunkan aktivitas pompa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase pada tubulus proksimal, sehingga reabsorpsi natrium akan menurun.

Jadi, jika terjadi peningkatan asupan natrium maka ginjal akan bekerja untuk memaksimalkan fungsinya untuk meningkatkan ekskresi natrium sampai sejumlah peningkatan asupan yang terjadi sehingga konsentrasi natrium plasma akan dipertahankan normal. Peningkatan asupan natrium setinggi 6 kali normal hampir tidak memberi pengaruh terhadap konsentrasi natrium plasma selama mekanisme rasa haus dan ADH berfungsi normal (Guyton, 1997).

Pengaturan keseluruhan ekskresi natrium pada kondisi normal ditentukan oleh asupan. Ekskresi natrium ini diatur oleh penghambatan filtrasi oleh glomerulus atau kecepatan reabsorbsinya di tubulus (Guyton, 1997).

2.3 Pengaruh Peningkatan Asupan Natrium Terhadap Metabolisme Kalsium

2.3.1 Peningkatan ekskresi kalsium urin

Tubuh manusia mengandung sekitar 1 kg kalsium. 99% dari kalsium ini membentuk hidroksiapatit pada tulang, dan 1 % sisanya terdapat pada jaringan lunak dan cairan ekstraseluler. Sekitar 1 % dari kalsium yang terdapat pada tulang, berfungsi sebagai kalsium yang dapat dipertukarkan dengan kalsium pada cairan ekstraseluler (Favus, 1993).

Terdapat tiga bentuk senyawa kalsium dalam plasma, yaitu 40 % (1 mmol/liter) kalsium terikat pada protein plasma dan dalam bentuk ini kalsium tidak dapat berdifusi melalui membran kapiler, 10 % kalsium (0,2 mmol/liter) terikat pada anion (misalnya sitrat dan fosfat), sisanya 50 % kalsium (1,2 mmol/liter) dalam bentuk ion yang dapat melewati membran kapiler (Guyton, 1997).

Absorpsi kalsium di usus dipengaruhi oleh banyak hal diantaranya oleh vitamin D, kortikosteroid dan diet yang lain. Menurut Setyohadi (1998), diet natrium yang tinggi akan menurunkan absorpsi kalsium di usus, melalui mekanisme yang belum diketahui dengan jelas.

Dari sejumlah kalsium plasma, hanya sekitar 50 % yang dapat difiltrasi oleh glomerulus. Kalsium yang terfiltrasi ini sebagian besar (>98 %) akan direabsorpsi oleh tubulus ginjal, sedang sisanya diekskresi ke dalam urin (Martini, 2001).

Mekanisme ekskresi kalsium sebagian besar mengikuti pola seperti ekskresi natrium. Di tubulus proksimal, reabsorpsi kalsium biasanya bersamaan dengan natrium dan air. Oleh karena itu pada beberapa keadaan dimana volume cairan ekstraseluler atau tekanan arterial meningkat, yang keduanya menurunkan reabsorpsi natrium dan air, juga akan terjadi penurunan reabsorpsi kalsium yang berakibat peningkatan ekskresi kalsium pada urin (Guyton, 1997).

Peningkatan tiap mmol natrium pada urin akan menyebabkan peningkatan ekskresi urin sebesar 0,01 mmol (Nordin, 1991 ; Massey 1996), sedang Matkovic et al (1995) secara nyata memberikan formulasi sebagai berikut :

$$\text{Konsentrasi kalsium urin (mmol/liter)} = (0,01154 \times \text{konsentrasi natrium urin (mmol/liter)}) + 0,823.$$

Seperti pada mekanisme reabsorpsi natrium, reabsorpsi kalsium juga terutama terjadi pada tubulus proksimal. Reabsorpsi ini sebagian besar melalui dua jalur, yaitu 1) melalui pompa kalsium yang tergantung ATPase yang terdapat pada membran basolateral sel-sel tubulus proksimal dan 2) melalui jalur transport aktif sekunder melalui protein pengikat pada sisi luminal sel-sel tubulus. Gangguan pada mekanisme pompa ATPase ataupun pada pembentukan protein pembawa pada sisi luminal membran menyebabkan gangguan reabsorpsi kalsium dengan hasil akhir peningkatan ekskresi kalsium pada urin. Hal seperti ini jelas terjadi pada peningkatan asupan natrium seperti yang telah digambarkan diatas (Guyton, 1997).

2.3.2 Penurunan konsentrasi kalsium terionisasi pada plasma.

Menurut Blackwood (2001) kehilangan kalsium urin akibat asupan tinggi natrium tidak mampu dikompensasi oleh absorpsi kalsium intestinal dan memiliki kecenderungan untuk menurunkan kalsium plasma yang terionisasi sehingga mengaktifkan mekanisme kompensasi hormonal untuk memperbaiki kadar kalsium plasma melalui peningkatan aktivitas resorpsi tulang.

Peningkatan asupan natrium akan meningkatkan jumlah ion positif pada plasma darah sebelum mekanisme kompensasi peningkatan volume cairan ekstraseluler terjadi. Peningkatan jumlah ion positif ini akan merubah derajat disosiasi kalsium yang terikat dengan protein plasma, sehingga kalsium plasma yang terionisasi akan cenderung menjadi terikat dengan protein plasma. Hal ini menyebabkan konsentrasi kalsium plasma yang terionisasi menurun (Smith, 1991 ; Blackwood, 2001).

2.4 Aktivitas Penyerapan Tulang Karena Pengaruh Hormon Paratiroid

1. Fase cepat absorpsi kalsium dan fosfat (osteolisis).

Hormon paratiroid menyebabkan pemindahan garam-garam tulang dari : (1) matriks tulang disekitar osteosit dan (2) di sekitar osteoblas di sepanjang permukaan tulang. Garam-garam tulang dari matriks ini diangkut dari cairan tulang ke cairan ekstraseluler oleh sistem membran osteositik yang terdapat pada sambungan membran antara osteosit dengan osteosit maupun dengan osteoblas (Guyton, 1997).

Bila kadar hormon paratiroid tinggi, maka aktivitas pompa ini menjadi sangat aktif sehingga banyak kalsium yang dipindahkan ke cairan ekstraseluler karena aktivitas penyerapan tulang yang meningkat. Proses ini disebut sebagai osteolisis. Hal ini terjadi karena adanya reseptor PTH pada kedua jenis sel ini (Guyton, 1997).

2. Fase lambat absorpsi tulang dan pelepasan kalsium dan fosfat (aktivasi osteoklas)

Hormon paratiroid meningkatkan jumlah dan aktivitas osteoklas. Peningkatan jumlah osteoklas karena PTH terjadi secara tidak langsung melalui perangsangan osteoblas oleh PTH. Sel-sel dalam jalur terjadinya osteoblas mengeluarkan senyawa yang akan mengaktifkan osteoklas karena rangsangan oleh PTH. Pada penelitian in vitro juga ditemukan bahwa PTH merangsang diferensiasi dan proliferasi sel-sel jalur terjadinya osteoklas (Favus, 1993).

2.4.1 Aktivitas subseluler hormon paratiroid.

PTH tidak secara langsung bekerja pada sitoplasma pada sel sasaran, tetapi terikat pada membran sel yang selanjutnya diteruskan oleh *second messenger* yang berpengaruh terhadap metabolisme sel sasaran. Pengikatan PTH ke reseptornya terjadi dengan pengikatan rantai awal dari PTH yang terdiri dari 34 asam amino. Rantai ini akan terikat pada reseptor PTH pada membran sel yang selanjutnya terjadi aktivasi cAMP (Bronner, 1991).

Pada osteoblas paratiroid meningkatkan diferensiasi tetapi menghambat proliferasinya. Hal ini terjadi dengan penghambatan siklus sel sehingga sel-sel progenitor osteoblas tidak dapat memasuki fase S. Hambatan ini diketahui dari menurunnya jumlah topoisomerase (suatu petanda proliferasi osteoblas) yang akan menggagalkan penyatuan timidin. Melalui jalur ini juga PTH menghambat ekspresi dan sintesa protein matrik termasuk kolagen tipe I, osteokalsin, dan alkali fosfatase. PTH juga menyebabkan retraksi osteoblas pada permukaan tulang melalui modifikasi proteolitik dari sitoskeleton osteoblas (Favus, 1993).

Pada osteoklas, PTH mengontrol aktivitasnya melalui sel-sel stroma dan osteoblas yang mengatur diferensiasi osteoklas. Diferensiasi ini diatur oleh hubungan antara sel-sel tersebut melalui sintesa osteoprotegerin (OPG) dan ligan bagi activator NF- κ B (RANKL/OPGL) (Oshiro 2002 ; Shiotani, 2002). Jika RANKL berikatan pada RANK di sel-sel jalur pembentukan osteoklas, maka sel-sel ini teraktivasi untuk berdiferensiasi dan berproliferasi. Proses ini berlangsung dengan bantuan adanya M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) yaitu melalui aktivasinya terhadap fusi pre osteoklas menjadi osteoklas serta peningkatan pembentukan pompa proton



ATPase, sedangkan osteoprotegerin bekerja menghambat proses penyerapan tulang melalui hambatan terhadap pembentukan *ruffled border*. Sebaliknya PTH menghambat ekspresi OPG melalui cAMP dan protein kinase A (Oshiro, 2002).

2.5 Biomekanika Tulang

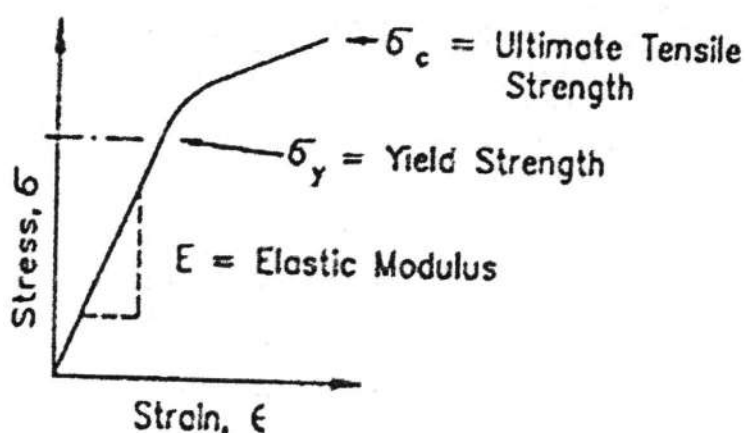
Biomekanika adalah ilmu yang mempelajari bagaimana sistem muskuloskeletal bekerja (Resnick, 1995).

Jika suatu gaya diberikan pada suatu benda padat, obyek akan diubah dari bentuk asalnya. Perubahan relatif yang terjadi pada tiap titik dinyatakan sebagai *strain* (regangan = ϵ) pada titik tersebut, dimana besarnya didapatkan dari membagi pertambahan panjang (ΔL) dengan panjang awal benda (L) yang mendapatkan beban (Resnick, 1995). Sedangkan gaya internal (F) yang terjadi tiap satuan luas (A) dinyatakan sebagai *stress* (tekanan = σ) (Hayes, 1991; Resnick, 1995). Dimana satuan tekanan adalah Newton/m^2 atau Pascal (Pa) {1Newton = 0,0225 pound, 1 Pa = $145,04 \times 10^{-6}$ pound per inch² (psi)} (Hayes; 1991).

Hubungan antara *stress* dan *strain* tampak sebagai kurva *stress-strain* (gambar 1). Perbandingan antara *stress* dan *strain* ini dikenal sebagai Modulus Young, yang menyatakan elastisitas dari suatu benda. Suatu benda dikatakan elastis jika dibutuhkan tekanan yang kecil yang menyebabkan regangan yang besar (Resnick, 1995). Modulus Young tulang kortikal dan trabekuler masing-masing sebesar 17 GPa dan 1 GPa (Dee, 1988 ; Nordin, 1999).

Suatu silinder tulang jika diberi sebuah gaya maka strukturnya akan berubah. Perubahan itu akan menghasilkan suatu daerah linier (juga dikenal sebagai daerah elastis) yang diikuti oleh daerah nonlinier dimana terjadi penyusunan ulang struktur internal tulang, yang seringkali melibatkan akumulasi kerusakan. Setelah itu, jika gaya diperbesar maka kerusakan struktural akan terjadi sampai akhirnya terjadi fraktur. Titik dimana gaya menyebabkan fraktur disebut sebagai *ultimate tensile strength*. Kurva ini sangat penting untuk menggambarkan keadaan struktur tulang karena kurva ini akan berbeda bentuknya bagi silinder yang berbeda baik dalam luas penampang maupun panjang (Hayes, 1991).

Seperti pada gambar berikut :



Gambar 1 : Kurva Stress-strain.

Dikutip dari : Hayes, WC. Biomechanics of Cortical and Trabecular Bone : Implications For Assessment of Fracture Risk.(1991)

Perbedaan akan terjadi pada kurva yang dihasilkan dari silinder dengan ukuran dan bentuk berbeda meski dari bahan yang sama (dengan modulus Young yang sama)(Hayes,1991).

2.5.1 Gaya yang bekerja pada sistem muskuloskeletal.

Terdapat dua bentuk gaya yang dapat menyebabkan rusaknya susunan molekuler jaringan yaitu : gaya tekan (kompresi) dan gaya regang (tension). Gaya tekan menyebabkan kerusakan pada sekitar gaya itu bekerja sedang gaya regang merusak pada jarak yang lebih jauh dari tempat gaya bekerja (Resnick, 1995)

Bentuk yang paling umum dari kerusakan tulang dan jaringan lunak adalah karena gaya yang menyebabkan pembengkokan tulang (Resnick, 1995).

Ujung-ujung tulang terutama mendapat beban dari gaya kompresi dari sendi di atasnya. Tetapi karena struktur anatomis tulang panjang yang pada beberapa tempat terdapat kelengkungan menyebabkan tulang mendapat sekaligus gaya kompresi aksial dan pembengkokan (Resnick, 1995).

Bila sebuah gaya diberikan pada pertengahan tulang panjang melampaui batas elastisitasnya maka akan terjadi patah tulang. Patah tulang akan terjadi pertama kali pada sisi cembung (sisi yang berseberangan dengan tempat persentuhan antara gaya dan tulang) tulang, karena tulang lebih tahan terhadap gaya kompresi daripada gaya regang. Patah tulang yang terjadi bisa berbentuk patah tulang linier atau oblik (Resnick, 1995). Menurut Hayes (1991), besarnya tekanan maksimum pada permukaan cembung tulang yang mendapat gaya melintang pada sumbu panjangnya dapat dihitung melalui persamaan di bawah ini.

$$\sigma = \frac{FLd}{2I}$$

Dimana σ adalah tekanan (Newton/m²), F gaya (Newton), panjang tulang dinyatakan dengan L (m), d melambangkan diameter tulang serta I mewakili momen inersianya.

Untuk tulang panjang yang bentuknya mirip tabung, besarnya momen inersia didapatkan dari persamaan :

$$I = \frac{\pi (R^4 - r^4)}{4}$$

Dimana $\pi = 3,14$; R adalah diameter luar tulang kortikal (mm); r diameter dalam tulang kortikal (mm). Dari persamaan tersebut diketahui bahwa besarnya momen inersia berbanding lurus secara langsung dengan besarnya diameter dari tulang.

2.5.2 Pengaruh perubahan arsitektur tulang terhadap risiko patah tulang

Beberapa mekanisme adaptasi pada tulang terjadi untuk memperbaiki dan menjaga keutuhan struktur tulang. Sebagai contoh adalah perubahan susunan penampang tulang panjang untuk mengkompensasi pengurangan kepadatan tulang karena penuaan. Dalam kenyataannya pengurangan kepadatan tulang kortikal karena penuaan tidak disertai peningkatan insiden patah tulang panjang yang nyata pada orang tua, sehingga diduga terjadi mekanisme kompensasi. Akan tetapi mekanisme kompensasi ini tidak cukup untuk melindungi tulang yang mengalami penuaan melawan patah tulang pada tempat-tempat lain seperti tulang panggul, tulang belakang dan distal radius (Mow,1991).

Perubahan susunan penampang tulang panjang dengan perubahan pada ketebalan tulang kortikal akan menyebabkan perubahan kekuatan tulang dalam menahan beban. Perubahan ini secara langsung akan mengakibatkan penurunan gaya tekan maksimal yang mampu ditahan oleh tulang sehingga meningkatkan risiko fraktur (Hayes, 1991).

Pengurangan diameter dalam tulang kortikal sebesar 2 mm menyebabkan penurunan kekuatan menahan beban sebesar 25 % (Hayes, 1991). Hal ini terjadi terutama pada orang tua dan wanita paska menopause dimana terjadi penurunan massa tulang yang berakibat menurunnya diameter dalam tulang kortikal serta perubahan arsitektur tulang (Resnick, 1995).

Menurut Dee (1988) penurunan itu sebesar seperempat dari massa tulang kortikalnya, serta setengah dari massa tulang trabekulernya, sehingga separuh dari wanita ini menderita fraktur karena tidak adekuatnya kepadatan tulang.

2.5.3 Perkiraan risiko patah tulang

Dalam bidang teknik, bentuk struktur yang mempengaruhi terjadinya fraktur ditentukan oleh 3 hal yaitu : (1) struktur geometri, (2) komposisi zat yang menyusun tulang dan (3) lokasi dan arah gaya yang bekerja (Hayes, 1991).

Berdasarkan hal-hal tersebut dapat diperhitungkan besarnya tekanan akibat gaya yang diberikan pada suatu benda. Suatu perbandingan antara gaya yang diberikan dengan gaya yang dapat menyebabkan fraktur disebut sebagai faktor risiko fraktur. Jika faktor risikonya rendah, gaya yang dibutuhkan untuk menyebabkan

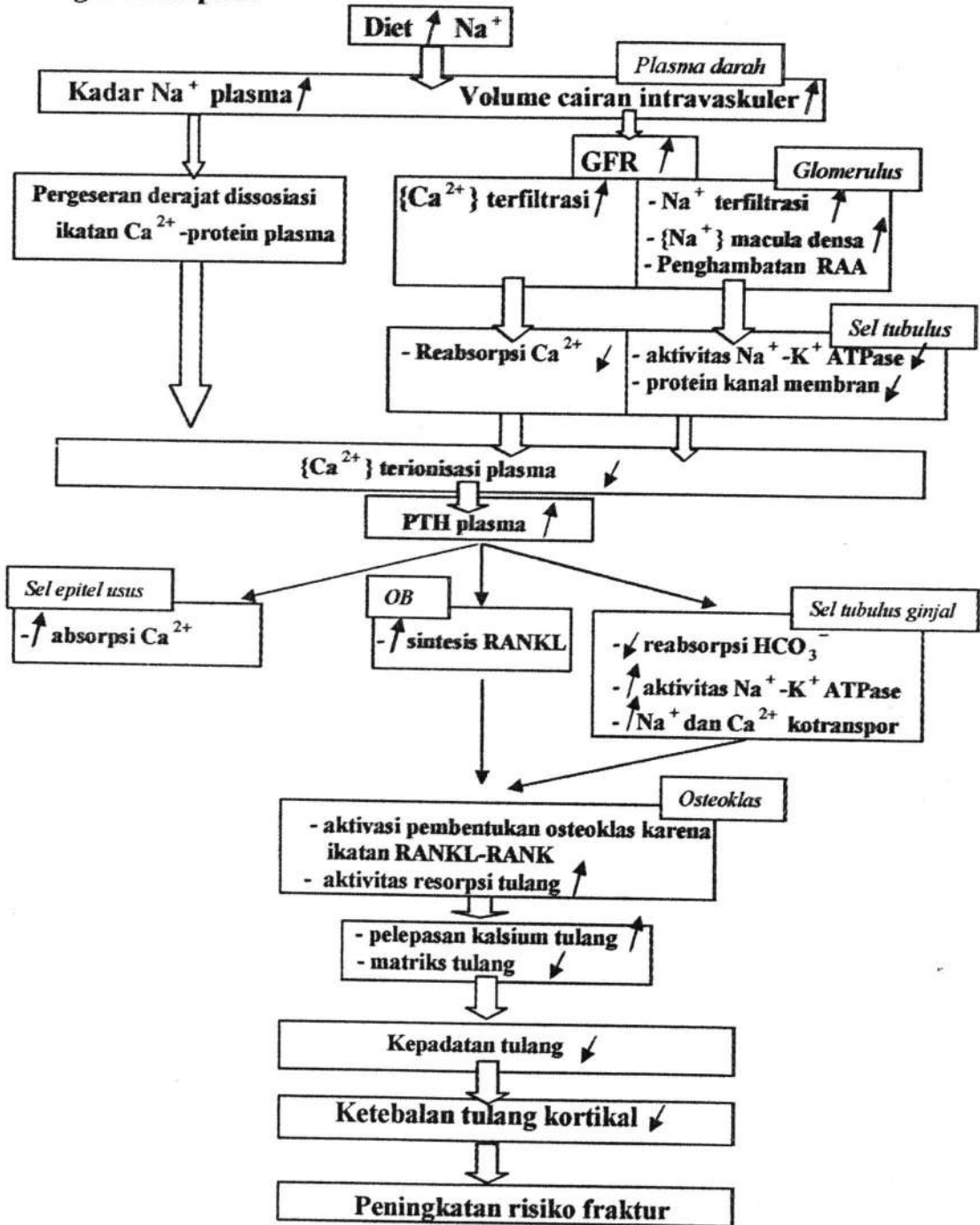
fraktur lebih besar dan dikatakan bahwa struktur tulang tersebut memiliki risiko rendah untuk terjadinya fraktur, dan sebaliknya (Hayes, 1991).

Pada penelitian-penelitian terakhir memang mungkin untuk menghitung risiko relatif dari patah tulang pinggul yang dihubungkan dengan pengurangan massa tulang dan trauma karena jatuh (Melton and Riggs, 1993). Tetapi beberapa penelitian dengan perlakuan pencegahan agar insiden terjadinya jatuh dapat dikendalikan minimal, ternyata hanya sedikit bisa mencegah patah tulang pinggul (Melton and Riggs, 1993).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



3.2 Dasar Teori

1. Diet tinggi natrium menyebabkan peningkatan konsentrasi natrium plasma yang dengan segera akan dikompensasi dengan peningkatan volume cairan intravaskuler untuk mempertahankan agar osmolalitas plasma tetap normal.
2. Peningkatan konsentrasi natrium plasma akan sedikit mempengaruhi pH plasma dengan akibat pergeseran derajat disosiasi ikatan kalsium-protein plasma sehingga kadar kalsium plasma yang terionisasi menjadi rendah.
3. Peningkatan volume intra vaskuler akan meningkatkan laju filtrasi glomerulus sehingga jumlah natrium dan kalsium yang difiltrasi akan meningkat pula. Hal ini menyebabkan meningkatnya konsentrasi natrium di *macula densa* yang secara langsung akan menurunkan RAA serta menyebabkan penurunan sekresi aldosteron.
4. Pada sel tubulus proksimalis, penghambatan RAA serta penurunan sekresi aldosteron akan menurunkan aktivitas pompa Na-K ATPase serta menurunkan jumlah protein kanal membran dimana keduanya berfungsi terutama mereabsorpsi natrium serta kalsium dari lumen tubulus. Sehingga hasil akhirnya adalah penurunan konsentrasi baik natrium maupun kalsium plasma.
5. Pemberian diet natrium yang tinggi dalam waktu yang lama akan menyebabkan proses kehilangan kalsium seperti tersebut diatas secara terus menerus, sehingga akan mengakibatkan penurunan kadar kalsium plasma yang cukup untuk merangsang sel-sel C paratiroid melakukan regulasi melalui peningkatan produksi dan pelepasan hormon paratiroid (PTH) ke dalam plasma.

6. Pada sel epitel usus, PTH meningkatkan pembentukan $1,25 \text{ (OH)}_2$ kalsitriol sehingga akan meningkatkan absorpsi kalsium dari lumen usus.
7. Pada sel osteoblas, PTH ditangkap oleh reseptornya dan merangsang pembentukan RANKL pada membran osteoblas yang selanjutnya akan berikatan dengan RANK pada osteoklas sebagai jalur pengaktifan pembentukan osteoklas matur.
8. Pada sel tubulus ginjal, PTH akan mengurangi reabsorpsi HCO_3^- serta menurunkan aktivitas pompa Na-K ATPase disamping menurunkan kotranspor bagi kalsium sehingga hasil akhirnya akan menurunkan kadar kalsium plasma.
9. $1,25$ dihidroksi kalsitriol yang terbentuk juga membantu terbentuknya osteoklas melalui peranannya secara tidak langsung melalui osteoblas.
10. Penurunan reabsorpsi ion bikarbonat dari lumen tubulus mengakibatkan peningkatan derajat keasaman BRC sehingga fungsi osteolisis osteoklas akan meningkat.
11. Secara keseluruhan, pengaruh peningkatan keasaman BRC, peningkatan pembentukan RANKL serta peningkatan produksi $1,25$ dihidrokalsitriol akan meningkatkan resorpsi tulang oleh osteoklas.
12. Tingginya aktivitas resorpsi tulang oleh osteoklas menyebabkan pembongkaran kalsium tulang dari kristal hidroksiapatit serta matriks tulang dengan akibat menurunnya baik kepadatan maupun ketebalan tulang.

13. Ketebalan dan kepadatan tulang merupakan faktor utama yang menentukan kekuatan tulang, sehingga penurunan keduanya akan menyebabkan menurunnya kekuatan tulang sehingga risiko terjadinya patah tulang akan meningkat.

3.3 Hipotesis

Berdasarkan tinjauan pustaka dan kerangka konseptual yang telah diuraikan sebelumnya, maka diajukan hipotesis sebagai berikut :

1. Pemberian diet tinggi garam (NaCl) menurunkan kepadatan tulang.
2. Pemberian diet tinggi garam (NaCl) menurunkan ketebalan tulang.
3. Peningkatan pemberian diet garam (NaCl) menyebabkan meningkatnya risiko patah tulang.

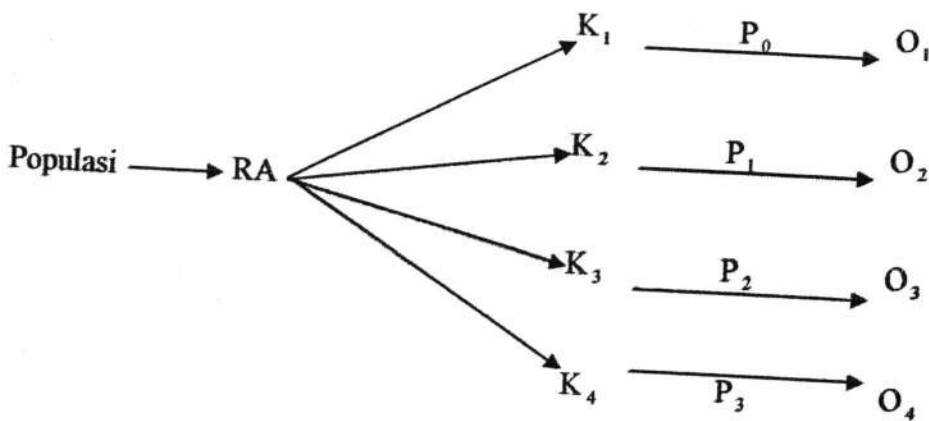
BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini digunakan jenis penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan rancangan *The Posttest Only Control Group Design* (Zainuddin, 2000).

Secara skematis rancangan penelitian tersebut dapat digambarkan sebagai berikut :



Keterangan :

RA : *Random Allocation* (Randomisasi seluruh sampel)

K₁ : Kelompok kontrol tanpa perlakuan diikuti sampai akhir

K₂ : Kelompok perlakuan dengan dosis garam (NaCl) 72 mg/200grBB/hari

K₃ : Kelompok perlakuan dengan dosis garam (NaCl) 144 mg/200grBB/hari

- K_4 : Kelompok perlakuan dengan dosis garam (NaCl) 216 mg/200grBB/hari
 P_0 : Tanpa perlakuan
 $P_{1,2,3}$: Jenis perlakuan dengan dosis NaCl 72 mg, NaCl 144 mg, NaCl 216 mg
 O_1, O_2, O_3, O_4 : Pengambilan data *post test*.

4.2 Populasi Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Populasi sampel pada penelitian ini adalah hewan coba tikus putih jantan yang berasal dari UPT Hewan Percobaan Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

Tikus yang dipilih harus memenuhi beberapa kriteria yaitu : *Rattus norvegicus* strain Wistar (tikus putih), berjenis kelamin jantan, berumur sekitar 3 bulan, dengan berat badan sekitar 200 gram serta sehat ditandai dengan gerakan yang aktif dan mata yang tampak cerah.

Besar sampel yang digunakan 10 ekor tikus untuk setiap kelompok perlakuan, sehingga besar sampel seluruhnya adalah 40 ekor sesuai perhitungan besar sampel seperti pada lampiran 1. Sampel diambil dari populasi dengan cara *simple random sampling*. Seluruh sampel dibagi secara acak menjadi 4 kelompok dengan cara diundi secara random. Kepada kelompok pertama hanya diberikan penambahan aquades 2 ml/hari; kepada kelompok kedua diberikan penambahan diet natrium 72 mg/hari; kepada kelompok ketiga diberikan penambahan diet natrium 144 mg/hari; kepada kelompok keempat diberikan penambahan diet natrium 216 mg/hari.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi Variabel

- a. Variabel bebas (*independent*)
Pemberian diet garam (NaCl) dengan berbagai dosis.
- b. Variabel tergantung (*dependent*)
 1. Kepadatan tulang.
 2. Ketebalan tulang.
 3. Risiko patah tulang yang diukur melalui kekuatan tulang.
- c. Variabel kendali
 1. Jenis hewan coba
 2. Jenis kelamin hewan coba
 3. Umur hewan coba
 4. Berat badan hewan coba
 5. Waktu (lamanya) perlakuan
 6. Pemeliharaan dan perawatan hewan coba

4.3.2 Definisi operasional variabel

1. Pemberian diet garam (NaCl) adalah pemberian larutan garam (NaCl) kepada hewan coba per oral atau per sonde dengan sonde bayi no 10.
 - a. Pada kelompok 2 dengan dosis 72 mg/ 2 ml aquades/ 200 gr BB tikus/hari;
 - b. Pada kelompok 3 dengan dosis 144 mg/ 2 ml aquades/ 200 gr BB tikus /hari;

c. Pada kelompok 4 dengan dosis 216 mg/ 2ml aquades/ 200 gr BB tikus/hari;

Volume larutan NaCl yang diberikan untuk setiap hewan coba per kelompok perlakuan adalah 2 ml, sesuai dengan aturan pemberian volume larutan obat menurut Ritchel (1974).

2. Kepadatan tulang dalam penelitian ini adalah besarnya kecepatan hantaran gelombang suara melalui jaringan tulang dengan satuan pengukuran m/detik. Yang diukur adalah metafisis tulang femur dengan menggunakan alat Ultrasound DBM Sonic 1200.
3. Ketebalan tulang dalam penelitian ini didapatkan dari mengukur selisih antara diameter luar dan diameter dalam pada diafisis tulang kortikal femur tepat pada pertengahan panjang tulang femur dari foto Roentgen antero-posterior melintang penampang tulang femur setelah diadakan pembesaran dengan faktor skala dengan satuan mm yang dikerjakan di Instalasi Radiologi FK Unair/ Rumah Sakit Dr Soetomo Surabaya.
4. Kekuatan tulang dalam penelitian ini adalah besarnya gaya minimal yang diberikan pada pertengahan tulang femur tikus jantan (*three point test*) yang menyebabkan tulang femur tikus jantan mengalami fraktur dengan satuan pengukuran Newton dengan alat *Unconfined Compressive Strength Machine Modified* dari Laboratorium Mekanika Tanah Teknik Sipil Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

5. Waktu perlakuan selama 8 minggu atau sekitar 56 hari berdasar pada waktu yang dibutuhkan untuk proses remodeling (Ganong,1999).
6. Pemeliharaan dan perawatan hewan coba dilakukan di sebuah kandang dengan ukuran 30 x 40 x 15 centimeter setiap kandang diisi 5 ekor hewan coba dengan pemberian makanan PAR-G pellet dan minum aqua dengan komposisi kandungan mineral masing-masing seperti pada lampiran.

4.4 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.4.1 Bahan penelitian

1. Hewan coba

Hewan coba adalah *Rattus norvegicus* strain Wistar (tikus putih) dengan kriteria seperti tersebut dalam materi penelitian.

2. Bahan untuk perlakuan

Larutan NaCl 3,6 %, 7,2 % dan 14,4 % yang dibuat oleh Laboratorium Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.

3. Bahan untuk pemeriksaan

- a. Ether untuk pembiusan.
- b. Kasa atau kapas.
- c. Kertas untuk pelabelan.
- d. K-Y Lubricant Jelly.

4.4.2 Instrumen Penelitian

1. Kandang ukuran 30 x 40 x 15 sentimeter.
2. Sonde bayi no 10.
3. Stoples untuk pembiusan.
4. Gunting dan pisau bedah.
5. Timbangan analitik *Torbak*.
6. Ultrasound DBM Sonic 1200 (*Digital Bone Measurement* – Emsor, S.A, Madrid, Spanyol).
7. *Unconfined Compressive Strength Machine Modified* dari Laboratorium Mekanika Tanah Teknik Sipil Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Aklimatisasi

Aklimatisasi hewan coba selama tujuh hari dalam kondisi laboratorium, dengan pemberian pakan standar dan air minum ad libitum.

4.5.2 Pembagian kelompok hewan coba

Pada hewan coba dilakukan randomisasi dalam empat kelompok, yaitu :

Kelompok 1 : Tikus putih kelompok kontrol tanpa perlakuan khusus, hanya diberi aquades 2 ml/ 200 mg BB/ hari

Kelompok 2 : Tikus putih diberi perlakuan dengan diet NaCl 72 mg/ 2 ml aquades/ 200 mg berat badan/ hari

Kelompok 3 : Tikus putih diberi perlakuan dengan diet NaCl 144 mg/ 2 ml aquades/ 200 mg berat badan/ hari

Kelompok 4 : Tikus putih diberi perlakuan dengan diet NaCl 216 mg/ 2 ml aquades/200 mg berat badan/hari.

4.5.3 Penimbangan berat badan sebelum perlakuan

Penimbangan dilakukan pada pagi hari sebelum perlakuan yang pertama kali dengan menggunakan timbangan Torbal (*Torsion Balance*) dengan satuan gram dengan ketelitian satu angka di belakang koma.

4.5.4 Pelaksanaan perlakuan

a. Kelompok kontrol.

Pemberian aquades per sonde 2 ml aquades/ 200 mg berat badan/ hari selama 8 minggu., pada hewan coba kelompok kontrol.

b. Kelompok perlakuan.

Pemberian larutan NaCl dengan sonde pada tikus lebih tepat bila dibandingkan melalui mulut, karena dengan sonde larutan NaCl akan langsung masuk ke lambung sehingga tidak akan ada larutan yang terbuang. Larutan diberikan per sonde dengan menggunakan *feeding tube*, yang dimasukkan ke lambung tikus hingga sepanjang 7 - 10 cm dari ujung selang *feeding tube*.

Larutan NaCl diberikan berdasarkan perhitungan sesuai lampiran 3 sebesar 72 mg / 2 ml aquades/ 200 mg berat badan/ hari; NaCl 144 mg/ 2 ml

aquades/ 200 mg berat badan / hari ; NaCl 216 mg/ 2 ml aquades/ 200 mg berat badan/ hari, masing-masing diberikan secara per oral dengan sonde selama 8 minggu pada tiap-tiap kelompok 2, 3 dan 4.

c. Perlakuan dilakukan setiap pagi hari pada jam yang sama yaitu pukul 07.00 WIB.

4.5.5 Pembiusan

Pembiusan dilakukan dengan *ether pro narcose* pada stoples tempat pembiusan. Setelah 3 menit tikus dinyatakan mati ditandai dengan meredupnya mata, anggota badan tidak bergerak serta tonus ototnya yang lemah.

4.5.6 Pengukuran kepadatan tulang

Kepadatan tulang diukur melalui metafisis tulang femur setelah hewan coba dibius. Pengukuran dilakukan dengan terlebih dahulu membersihkan bulu sepanjang bagian femur hewan coba serta mengolesi *transducer* alat pengukur dengan jelly. Pengukuran dilakukan sebanyak empat kali dengan menggunakan alat Ultrasound DBM Sonic 1200, hasilnya dicatat dengan satuan m/detik kemudian diambil angka reratanya. Selanjutnya semua otot dan tendon dibersihkan dari tulang femur dan tulang femur diambil sebagai sediaan untuk pengukuran selanjutnya. (Lampiran. 7)

4.5.7 Pengukuran ketebalan tulang kortikal

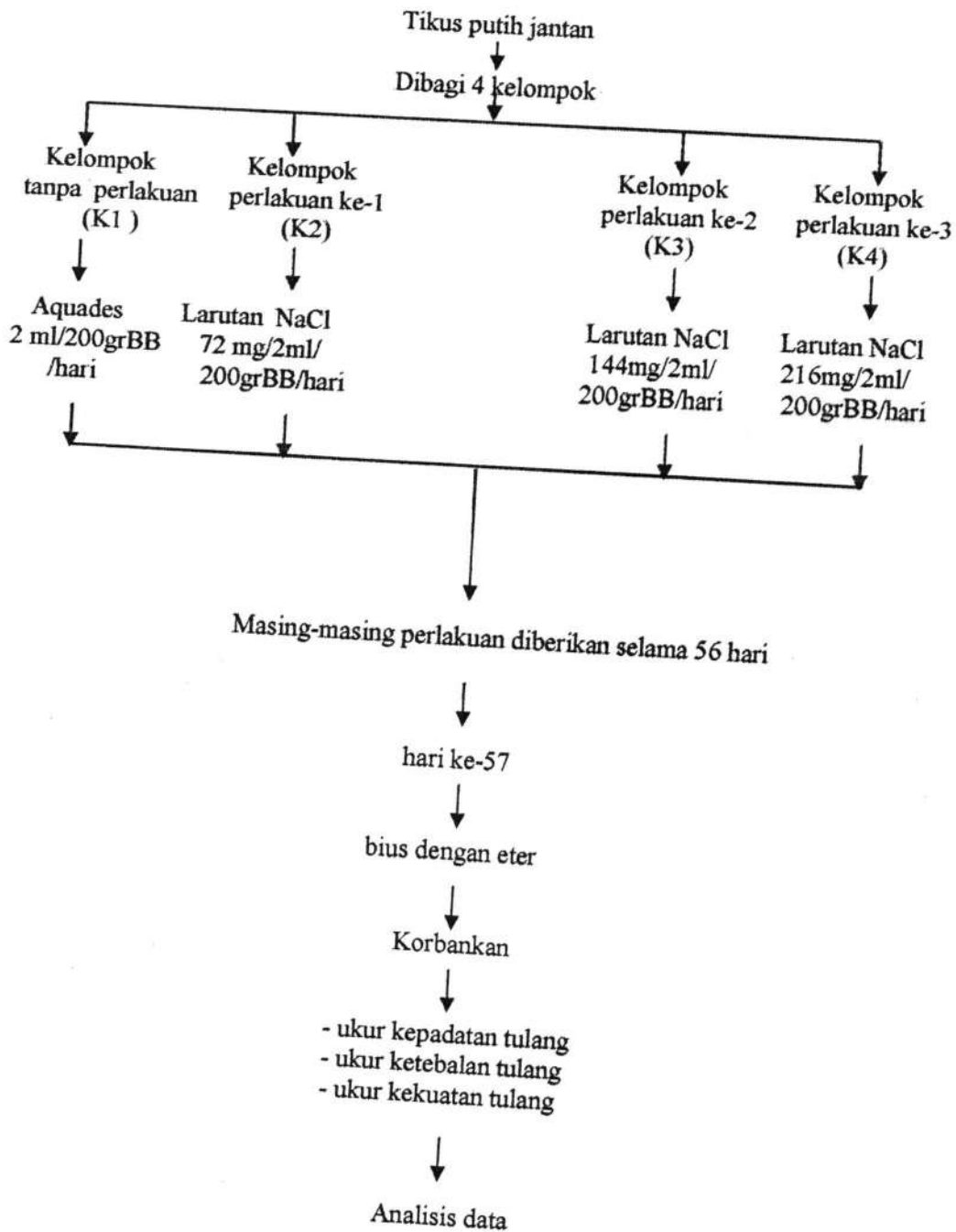
Ketebalan tulang kortikal diukur melalui selisih antara diameter luar diafisis tulang kortikal femur dengan diameter dalam tepat pada pertengahan diafisis dengan satuan milimeter dari sediaan foto Roentgen antero-posterior dengan magnifikasi 4 kali, hasilnya dicatat kemudian diambil reratanya. Pengukuran dilakukan terhadap sediaan foto Roentgen tulang femur yang termagnifikasi serta dilakukan scanning, selanjutnya ketebalan tulang kortikal pada hasil scanning diukur dengan program *corel draw*. Hasilnya dicatat kemudian diambil reratanya.

Penggunaan foto Roentgen pada penelitian ini didasarkan atas beberapa alasan, yaitu : 1) secara teknis pelaksanaannya lebih mudah dibanding dengan pemeriksaan yang lain seperti ct-scan ataupun histologis, 2) pada pengukuran dengan obyek yang kecil, ketajaman gambar yang didapat akan lebih besar jika dilakukan magnifikasi yang bisa dilakukan dengan foto roentgen dibanding *zooming* pada ct-scan karena dengan *zooming* biasanya akan terjadi distorsi bayangan sehingga pengukuran akan lebih bias. (Lampiran 9)

4.5.8 Pengukuran kekuatan tulang

Pengukuran kekuatan tulang dilakukan setelah semua otot dan tendon dibersihkan dari tulang femur. Tulang femur diletakkan pada alat *Unconfined Compressive Strength Machine Modified* lalu diberikan gaya hingga tulang femur patah dan dicatat beban yang diberikan. Hasilnya dinyatakan dalam satuan Newton. (Lampiran 8)

4.5.9 Alur Penelitian



4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

a. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Universitas Airlangga Surabaya, Instalasi Radiologi FK Unair RSUD Dr Soetomo Surabaya dan Laboratorium Mekanika Tanah Teknik Sipil Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

b. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama 5 bulan.

4.7 Analisis data

Data yang dicatat dikelompokkan, dianalisis selanjutnya dilakukan uji statistik sebagai berikut :

1. Uji Deskriptif
2. Uji Normalitas Distribusi

Uji normalitas distribusi digunakan untuk mengetahui distribusi sampel dan data hasil pengukuran apakah sebarannya merata atau tidak, yang merupakan syarat bagi uji selanjutnya (Manova).

3. Uji Manova

Analisis multi varian ini digunakan untuk mengetahui pengaruh perlakuan antar kelompok terhadap variabel tergantung.

4. Analisis Diskriminan

Analisis diskriminan dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan antar group pada respon variabel tergantung serta mengetahui variabel tergantung yang mana yang berpengaruh lebih dulu.

5. Analisis Regresi

Analisis ini digunakan untuk mengetahui besarnya pengaruh pemberian larutan garam (NaCl) sebagai variabel bebas terhadap kepadatan tulang, ketebalan tulang kortikal maupun kekuatan tulang.

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian eksperimental tentang pengaruh pemberian diet tinggi garam (NaCl) terhadap peningkatan risiko patah tulang merupakan data yang berskala rasio yang didapatkan dari pengukuran kepadatan tulang metafisis femur hewan coba yang diukur menggunakan DBM Sonic 1200, dengan ketentuan makin cepat atau tinggi nilainya (m/det) maka makin besar kepadatan tulangnya, pengukuran ketebalan tulang kortikal diafisis tulang femur hewan coba dengan foto roentgen dengan ketentuan semakin besar ketebalannya (milimeter) semakin kecil risiko patah tulangnya serta dari pengukuran besarnya gaya (Newton) yang menyebabkan tulang femur hewan coba menjadi patah dengan ketentuan semakin besar gaya yang dibutuhkan maka makin kecil risiko patah tulangnya. Data yang telah terkumpul didiskripsikan dan diolah dengan program SPSS 11.5 for windows.

5.1 Data Penelitian

Data hasil pengukuran dari keseluruhan hewan coba adalah seperti yang tersebut dibawah ini.

- a) Data hasil pengukuran kepadatan tulang dengan menggunakan DBM Sonic 1200 adalah pengukuran yang telah dilakukan pada kelompok hewan coba sebagai berikut :

1. Kelompok Kontrol (K1)

2. Kelompok hewan coba yang mendapat larutan NaCl 72 mg / 200 gr BB/hari (K2)
3. Kelompok hewan coba yang mendapat larutan NaCl 144 mg / 200 gr BB/hari (K3)
4. Kelompok hewan coba yang mendapat larutan NaCl 216 mg / 200 gr BB/hari (K4)

Setelah mendapat perlakuan berupa pemberian larutan NaCl dalam beberapa dosis yang berbeda diperoleh data kepadatan tulang seperti tampak pada tabel 5.1 (lampiran 7).

Tabel 5.1 Data hasil pengukuran kepadatan tulang (m/det) dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

NO	Kontrol (K1)	NaCl 72 mg (K2)	NaCl 144 mg (K3)	NaCl 216 mg (K4)
1	1694	1663	1632	1598
2	1686	1713	1675	1631
3	1675	1644	1612	1578
4	1778	1693	1662	1628
5	1754	-	1637	1603
6	1714	1622	1597	1553
7	1697	1673	1642	1608
8	1645	1660	1628	1594
9	-	-	1637	1633
10	1720	1668	1633	1599

Sedangkan data hasil pengukuran ketebalan tulang kortikal femur setelah mendapat berbagai dosis larutan NaCl adalah seperti pada table 5.2.

Tabel 5.2 Data hasil pengukuran ketebalan tulang kortikal (milimeter) dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

NO	Kontrol (K1)	NaCl 72 mg (K2)	NaCl 144 mg (K3)	NaCl 216 mg (K4)
1	0,975	0,945	0,865	0,815
2	1,005	0,875	0,88	0,83
3	0,895	0,955	0,855	0,88
4	0,915	0,89	0,8	0,84
5	1,015	-	0,88	0,865
6	0,955	0,925	0,815	0,865
7	0,980	0,84	0,855	0,84
8	0,940	0,925	0,895	0,815
9	-	-	0,895	0,795
10	0,950	0,895	0,87	0,785

Data hasil pengukuran kekuatan tulang (Newton) setelah pemberian berbagai dosis larutan NaCl terlihat pada table 5.3.

Tabel 5.3 Data hasil pengukuran kekuatan tulang femur (Newton) dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

NO	Kontrol (K1)	NaCl 74 mg (K2)	NaCl 144 mg (K3)	NaCl 216 mg (K4)
1	697	606	583	587
2	662	612	591	594
3	670	622	587	535
4	672	599	602	562
5	656	-	600	588
6	676	619	596	564
7	652	602	556	573
8	657	608	578	599
9	-	-	614	548
10	635	603	592	555

5.2 Hasil Uji Statistik Deskriptif

Data hasil penelitian selanjutnya dianalisa secara statistik deskriptif yang bertujuan untuk memperoleh gambaran yang lebih jelas mengenai distribusi data maupun simpangan baku dari data. Hasil statistik deskriptif terhadap kepadatan tulang, ketebalan tulang kortikal dan kekuatan tulang tampak pada tabel 5.4 (lampiran 8).

Tabel 5.4 Rerata dan simpangan baku kepadatan tulang (m/det), ketebalan tulang kortikal (mm) dan kekuatan tulang (Newton) dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

Kelompok	Variabel	Rerata	Simpangan Baku
Kontrol	Kepadatan tulang	1707,000	40,383
	Ketebalan tulang	0,9589	0,0394
	Kekuatan tulang	664,111	17,446
NaCl 72	Kepadatan tulang	1667,000	27,898
	Ketebalan tulang	0,9079	0,0412
	Kekuatan tulang	609,714	8,499
NaCl 144	Kepadatan tulang	1635,500	22,157
	Ketebalan tulang	0,8610	0,0317
	Kekuatan tulang	589,900	15,702
NaCl 216	Kepadatan tulang	1602,500	24,897
	Ketebalan tulang	0,8330	0,0312
	Kekuatan tulang	570,500	21,267

Sedangkan hasil statistik deskriptif untuk respon kepadatan tulang, respon ketebalan tulang kortikal dan respon kekuatan tulang tampak pada tabel 5.5.

Tabel 5.5 Rerata dan simpangan baku respon kepadatan tulang (m/det), respon ketebalan tulang kortikal (mm) dan respon kekuatan tulang (Newton) dari kelompok perlakuan.

Kelompok	Variabel	Rerata	Simpangan Baku
NaCl 72	Respon kepadatan tulang	40,000	27,898
	Respon ketebalan tulang	0,0510	0,0412
	Respon kekuatan tulang	54,397	8,499
NaCl 144	Respon kepadatan tulang	71,500	22,157
	Respon ketebalan tulang	0,0979	0,0317
	Respon kekuatan tulang	74,211	15,702
NaCl 216	Respon kepadatan tulang	104,500	24,897
	Respon ketebalan tulang	0,1259	0,0312
	Respon kekuatan tulang	93,611	21,267

5.3 Hasil Uji Normalitas

Uji normalitas digunakan untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis ini berdistribusi normal atau tidak. Hal ini perlu dilakukan karena pengujian dengan statistik parametrik menuntut syarat bahwa data harus berdistribusi normal.

Uji normalitas terhadap data kepadatan tulang, data ketebalan tulang kortikal serta data kekuatan tulang yang berskala data rasio, dilakukan dengan menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov* (lampiran 9), yang masing-masing tampak pada tabel 5.6.

Dari hasil uji *Kolmogorov Smirnov*, seperti tercantum pada tabel 5.6, menunjukkan semua kelompok data kepadatan tulang, ketebalan tulang kortikal maupun kekuatan tulang dari berbagai dosis yang diuji berdistribusi normal. Hal ini terlihat dari besarnya $p > 0,05$.

Tabel 5.6 Hasil uji distribusi data kelompok terhadap kepadatan tulang (m/det), ketebalan tulang (mm) dan kekuatan tulang (Newton).

NO	Kelompok	p Kepadatan	p Ketebalan	p Kekuatan
1	K1 (Kontrol)	0,984	1,000	0,996
2	K2 (NaCl 72 mg)	0,982	0,942	0,978
3	K3 (NaCl 144 mg)	0,885	0,918	0,991
4	K4 (NaCl 216 mg)	0,945	0,982	0,898

Uji normalitas juga dilakukan terhadap data respon kepadatan tulang, respon ketebalan tulang kortikal serta data respon kekuatan tulang dengan menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov* (lampiran 10), yang masing-masing tampak pada tabel 5.7.

Tabel 5.7 Hasil uji distribusi data kelompok terhadap respon kepadatan tulang (m/det), respon ketebalan tulang (mm) dan respon kekuatan tulang (Newton).

NO	Kelompok	p Respon Kepadatan	p Respon Ketebalan	p Respon Kekuatan
1	K2 (NaCl 72 mg)	0,982	0,843	0,997
2	K3 (NaCl 144 mg)	0,885	0,692	0,996
3	K4 (NaCl 216 mg)	0,945	0,982	0,898

Demikian pula hasil uji *Kolmogorov Smirnov* untuk kelompok data respon kepadatan tulang, respon ketebalan tulang kortikal maupun data respon kekuatan tulang dari berbagai dosis yang diuji berdistribusi normal ($p > 0,05$).

5.4 Hasil Analisis Multi Varian

Analisis multi varian ini ditujukan untuk mengetahui ada atau tidak perbedaan pengaruh perlakuan antar kelompok terhadap variabel tergantung. Hal ini dilakukan dengan menguji variabel tergantung yaitu kepadatan tulang, ketebalan tulang kortikal serta kekuatan tulang dengan menggunakan *multivariate tests*. Hasil dari uji ini (lampiran 11) tampak pada tabel 5.8.

Tabel 5.8 Hasil perhitungan uji multi varian untuk variabel kepadatan tulang (m/det), ketebalan tulang kortikal (mm) serta kekuatan tulang (N).

Efek	F	P
Hotelling's Trace	31,656	0,000

Begitu juga terhadap data respon kepadatan tulang, respon ketebalan tulang kortikal maupun data respon kekuatan tulang dilakukan uji multi varian. Hasil uji ini tampak pada tabel 5.9.

Tabel 5.9 Hasil perhitungan uji multi varian untuk variabel respon kepadatan tulang (m/det), respon ketebalan tulang kortikal (mm) serta respon kekuatan tulang (N).

Efek	F	P
Hotelling's Trace	13,351	0,000

Dari hasil perhitungan dengan menggunakan uji multi varian menunjukkan bahwa secara bersama-sama terdapat perbedaan rerata hasil pengukuran baik kepadatan tulang, ketebalan tulang kortikal maupun kekuatan tulang pada berbagai

dosis larutan NaCl dengan $p=0,000$ ($p<0,05$). Begitu juga secara bersama-sama terdapat perbedaan rerata hasil pengukuran baik respon kepadatan tulang, respon ketebalan tulang kortikal maupun data respon kekuatan tulang pada berbagai dosis NaCl dengan $p=0,000$ ($p<0,05$).

Setelah diketahui bahwa ada perbedaan pengaruh yang bermakna diantara keempat kelompok sampel pada keseluruhan variabel, selanjutnya akan dianalisis antar kelompok sampel mana yang berbeda dengan menggunakan uji beda pengaruh secara individu melalui *Pairwise comparisons* (lampiran 12). Hasil dari uji tersebut tampak pada tabel 5.10 untuk variabel kepadatan tulang (m/det), ketebalan tulang kortikal (mm) serta kekuatan tulang (N) serta tabel 5.11 untuk variabel respon kepadatan tulang, respon ketebalan tulang kortikal maupun data respon kekuatan tulang.

Tabel 5.10 Hasil perhitungan uji beda untuk variabel kepadatan tulang (m/det), ketebalan tulang kortikal (mm) serta kekuatan tulang (N).

Kelompok		P kepadatan	p ketebalan	p kekuatan
Kontrol	NaCl 72 mg	0,020	0,009	0,000
	NaCl 144 mg	0,000	0,000	0,000
	NaCl 216 mg	0,000	0,000	0,000
NaCl 72 mg	NaCl 144 mg	0,043	0,013	0,019
	NaCl 216 mg	0,000	0,000	0,000
NaCl 144 mg	NaCl 216 mg	0,020	0,093	0,012

Tabel 5.11 Hasil perhitungan uji beda untuk variabel respon kepadatan tulang (m/det), respon ketebalan tulang kortikal (mm) serta respon kekuatan tulang (N).

Kelompok		p respon kepadatan	p respon ketebalan	p respon kekuatan
NaCl 72 mg	NaCl 144 mg	0,019	0,010	0,024
	NaCl 216 mg	0,000	0,000	0,000
NaCl 144 mg	NaCl 216 mg	0,008	0,079	0,016

Berdasar pada kepadatan tulang, terdapat perbedaan rerata yang sangat bermakna antara kelompok kontrol dengan seluruh kelompok perlakuan dengan $p=0,020$ untuk NaCl 72 mg, serta masing-masing $p=0,000$ untuk NaCl 144 mg dan 216 mg ($p<0,05$). Terdapat perbedaan rerata yang sangat bermakna antara kelompok perlakuan dengan NaCl 72 mg dengan kelompok perlakuan NaCl 144 mg ($p=0,043$; $p<0,05$), serta terdapat perbedaan rerata yang bermakna dengan kelompok perlakuan NaCl 144 mg ($p=0,000$; $p>0,05$). Antara kelompok perlakuan 144 mg dengan kelompok perlakuan 216 mg juga terdapat perbedaan rerata yang bermakna dengan $p=0,020$ ($p>0,05$).

Berdasar pada ketebalan tulang kortikal, terdapat perbedaan rerata yang sangat bermakna antara kelompok kontrol dengan seluruh kelompok perlakuan dengan $p=0,009$ untuk NaCl 72 mg, serta masing-masing $p=0,000$ untuk NaCl 144 mg dan 216 mg ($p<0,05$). Juga terdapat perbedaan rerata yang sangat bermakna antara kelompok perlakuan NaCl 72 mg dengan kelompok perlakuan NaCl 144 mg ($p=0,013$; $p<0,05$), maupun dengan kelompok perlakuan NaCl 216 mg ($p=0,000$;

$p > 0,05$). Tetapi antara kelompok perlakuan 144 mg dengan kelompok perlakuan 216 mg juga tidak terdapat perbedaan rerata yang bermakna dengan $p = 0,089$ ($p > 0,05$).

Berdasar pada kekuatan tulang, terdapat perbedaan rerata yang sangat bermakna antara kelompok kontrol dengan seluruh kelompok perlakuan dengan $p = 0,000$ pada semua kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Terdapat perbedaan rerata yang sangat bermakna antara kelompok perlakuan NaCl 72 mg dengan kelompok perlakuan NaCl 144 mg ($p = 0,019$; $p < 0,05$), maupun dengan kelompok perlakuan NaCl 216 mg ($p = 0,000$; $p > 0,05$). Antara kelompok perlakuan 144 mg dengan kelompok perlakuan 216 mg juga terdapat perbedaan rerata yang bermakna dengan $p = 0,063$ ($p > 0,05$).

Menurut variabel respon kepadatan tulang, respon ketebalan tulang kortikal maupun data respon kekuatan tulang terdapat perbedaan rerata respon yang sangat bermakna pada interaksi antar kelompok dosis dengan $p < 0,05$, kecuali untuk respon ketebalan tulang antara kelompok perlakuan NaCl 144 mg dengan perlakuan NaCl 216 tidak terdapat perbedaan rerata dengan $p = 0,079$ ($p > 0,05$).

5.5 Hasil Analisis Diskriminan

Analisis diskriminan pada analisa data dilakukan dengan tujuan seperti berikut ini :

- a. Mengetahui apakah ada perbedaan respon yang jelas antar group pada variabel tergantung (respon kepadatan tulang, respon ketebalan tulang kortikal dan respon kekuatan tulang) akibat perlakuan pada variabel bebas.
- b. Jika ada perbedaan, respon variabel tergantung yang mana pada fungsi diskriminan yang akan muncul berdasarkan urutan besarnya respon.

Uji dilakukan dengan menggunakan *Tests of Equality of Group Means* yang memang digunakan untuk data yang berskala interval atau rasio (lampiran 13). Hasil dari uji tersebut tampak pada tabel 5.12.

Tabel 5.12 Hasil uji *Equality of Group Means* antara respon kepadatan tulang, respon ketebalan tulang kortikal maupun data respon kekuatan tulang dengan besarnya dosis NaCl yang diberikan (mg).

Variabel	F	p
Respon kepadatan tulang	13,458	0,000
Respon ketebalan tulang	9,913	0,001
Respon kekuatan tulang	11,421	0,000

Dari keseluruhan hasil uji *Equality of Group Means*, didapatkan nilai perbedaan respon yang sangat bermakna antara pemberian NaCl dengan respon kepadatan tulang, respon ketebalan tulang kortikal maupun dengan respon kekuatan tulang dengan $p=0,000$ ($p<0,05$) untuk respon kepadatan tulang dan respon kekuatan serta $p=0,001$ ($p<0,05$) untuk respon ketebalan tulang.

Untuk mengetahui jenis variabel tergantung yang muncul pertama dalam merespon perlakuan pada variabel bebas dapat dilihat pada hasil uji diskriminan dengan *Stepwise statistics* (lampiran 13), seperti pada tabel 5.13. Dari tabel tersebut tampak bahwa respon kepadatan tulang akan muncul lebih awal, dan diikuti oleh respon ketebalan tulang kortikal ($p<0,05$).

Tabel 5.13 Hasil uji diskriminan dengan *Stepwise statistics* antara respon kepadatan tulang, respon ketebalan tulang kortikal maupun data respon kekuatan tulang pada berbagai dosis NaCl (mg).

Variabel	Wilks' Lambda	p
Respon kepadatan tulang	0,471	0,000
Respon ketebalan tulang	0,253	0,000

Selanjutnya untuk mengetahui apakah perbedaan respon pada data sampel yang ada menyediakan bukti cukup bahwa ada hubungan antara variabel bebas (dosis NaCl) dengan variabel tergantung (kepadatan tulang, ketebalan tulang kortikal dan kekuatan tulang). Jika ada hubungan, seberapa kuat hubungan tersebut. Hal ini dapat diketahui melalui *Canonical discriminant functions* pada uji diskriminan. Seperti tampak pada lampiran 13, bahwa angka *canonical correlation* adalah sebesar 0,863 yang berarti terdapat hubungan yang kuat antara dosis NaCl dengan kepadatan tulang, ketebalan tulang kortikal dan kekuatan tulang.

5.6 Hasil Analisis Regresi

Besarnya respon perubahan variabel kepadatan tulang (m/det), ketebalan tulang kortikal (mm) serta kekuatan tulang (N) akibat pemberian diet NaCl dapat diketahui melalui uji analisis regresi linier masing-masing variabel. Analisis ini digunakan untuk tujuan peramalan, dimana hasil dari analisis ini akan dapat digunakan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh sebuah variabel bebas (NaCl) terhadap variabel tergantung (kepadatan tulang, ketebalan tulang kortikal dan kekuatan tulang).

Hasil analisis regresi linier antara perlakuan pemberian larutan NaCl dengan kepadatan tulang, ketebalan tulang dan kekuatan tulang tampak pada tabel 5.14.

Tabel 5.14. Hasil analisis regresi linier terhadap kepadatan tulang (m/det), ketebalan tulang kortikal (mm) dan kekuatan tulang (N).

Variabel	Konstanta regresi	Koefisien regresi	P
Kepadatan tulang	1704,870	-0,479	0,000
Ketebalan tulang	0,954	-0.001	0,000
Kekuatan tulang	653,791	-0,416	0,000

Dari hasil analisis regresi tersebut juga (lampiran 14), didapatkan $p = 0,000$ ($p < 0,05$) bagi keseluruhan variabel tergantung. Hal ini menjelaskan bahwa larutan NaCl yang diberikan berpengaruh secara bermakna terhadap kepadatan tulang.

Estimating equation (persamaan regresi) yang didapat dari analisis regresi diatas adalah sebagai berikut :

a. Kepadatan tulang.

$$\text{Kepadatan tulang} = 1704,870 - (0,479 \times \text{dosis NaCl})$$

dimana kepadatan tulang dalam m/detik dan dosis NaCl dalam mg.

Konstanta sebesar 1704,870 menyatakan bahwa jika tidak ada perlakuan berupa pemberian larutan NaCl ($x=0$) maka hasil pengukuran kepadatan tulang hewan coba yang diharapkan adalah 1704,9 m/det.

Sedangkan koefisien regresi sebesar -0,479 menyatakan bahwa setiap penambahan dosis larutan NaCl sebesar 1 mg, akan menurunkan kecepatan hantaran gelombang suara pada tulang sebesar 0,479 m/det.

b. Ketebalan tulang kortikal.

$$\text{Ketebalan tulang kortikal} = 0,954 - (0,001 \times \text{dosis NaCl})$$

Dimana ketebalan tulang kortikal dalam mm dan dosis NaCl dalam mg.

Konstanta sebesar 0,954 menyatakan bahwa jika tidak ada perlakuan berupa pemberian larutan NaCl ($x=0$) maka hasil pengukuran ketebalan tulang kortikal hewan coba yang diharapkan adalah 0,954 mm.

Sedangkan koefisien regresi sebesar -0,001 menyatakan bahwa setiap penambahan dosis larutan NaCl sebesar 1 mg, akan menurunkan ketebalan tulang kortikal sebesar 0,001 mm.

c. Kekuatan tulang.

$$\text{Kekuatan tulang} = 653,791 - (0,416 \times \text{dosis NaCl})$$

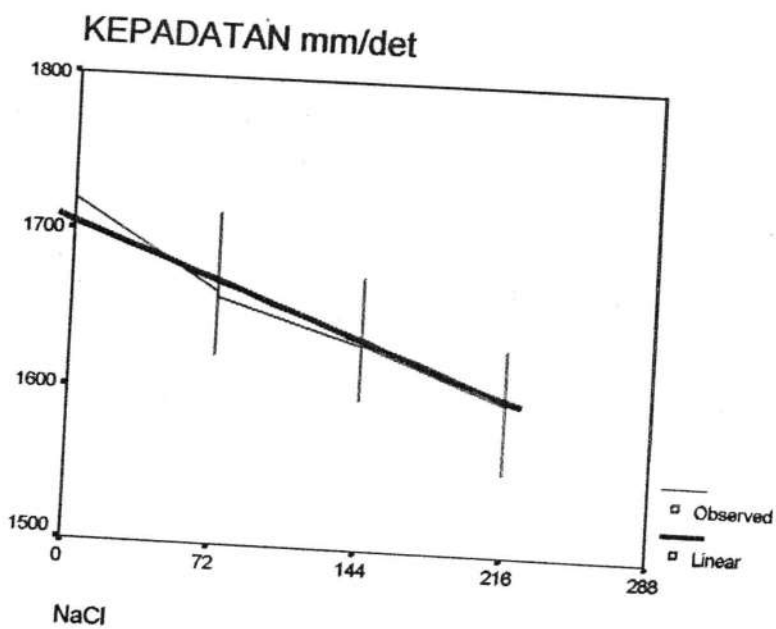
dimana kekuatan tulang dalam Newton dan dosis NaCl mg.

Konstanta sebesar 653,791 menyatakan bahwa jika tidak ada perlakuan berupa pemberian larutan NaCl ($x=0$) maka hasil pengukuran kekuatan tulang hewan coba yang diharapkan adalah 653,8 Newton.

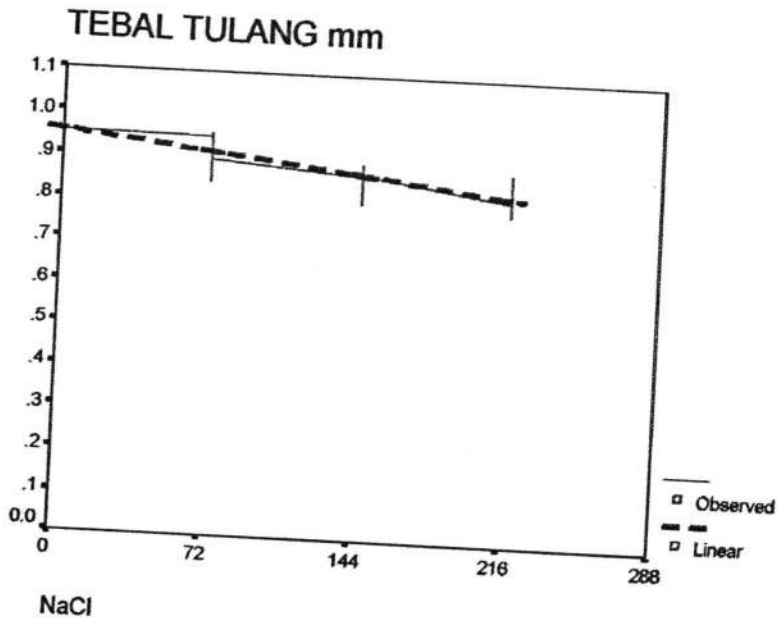
Sedangkan koefisien regresi sebesar -0,416 menyatakan bahwa setiap penambahan dosis larutan NaCl sebesar 1 mg, akan menurunkan kekuatan tulang dalam menahan beban sebesar 0,416 Newton.

Dari ketiga persamaan regresi tersebut, jelas terlihat bahwa setiap peningkatan pemberian larutan NaCl akan mengakibatkan penurunan kepadatan tulang, ketebalan tulang kortikal maupun kekuatan tulang dalam menahan beban.

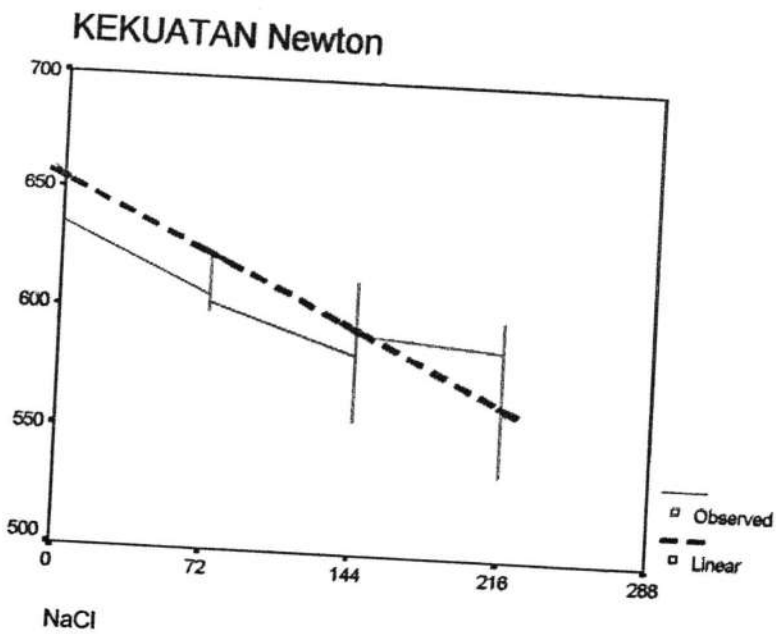
Grafik perhitungan masing masing variabel terhadap pemberian NaCl dalam berbagai dosis tampak pada gambar 5.1, gambar 5.2 dan gambar 5.3.



Gambar 5.1 Hubungan antara dosis NaCl dengan kepadatan tulang



Gambar 5.2 Hubungan antara dosis NaCl dengan ketebalan tulang kortikal



Gambar 5.3 Hubungan antara dosis NaCl dengan kekuatan tulang.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Metode Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh diet tinggi garam (NaCl) dapat meningkatkan risiko patah tulang. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris yang memenuhi kriteria sebagai penelitian eksperimental murni (*true experimental*) karena memenuhi kriteria perlakuan menurut Zainudin (2000) yaitu randomisasi, replikasi, kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Penelitian dengan hewan coba ini akan meningkatkan ketepatan hasil eksperimen disamping meningkatkan generalisasi hasil eksperimen karena pemenuhan syarat sebagai eksperimen murni tersebut. Hal ini disebabkan karena kesalahan eksperimen dapat dikurangi dengan berbagai cara, antara lain :

- a. menggunakan unit eksperimen yang homogen
- b. mencegah semaksimal mungkin masuknya faktor-faktor dari luar
- c. menggunakan rancangan penelitian yang efisien

Pada penelitian ini rancangan penelitian yang digunakan adalah *The Post-test only Control Group Design*, karena semua cara pengukuran data memerlukan kondisi yang tenang dari sample maupun kondisi sample sudah dimatikan sehingga kesalahan hasil pengukuran dapat ditekan seminimal mungkin.

Jenis perlakuan yang diberikan pada hewan coba menggunakan larutan NaCl dalam aquades dengan masing-masing dosis sebesar 72 mg/200g BB/ hari, 144 mg/200g BB/hari dan 216 mg/200g BB/ hari. Dosis ini dipilih berdasarkan

memenuhi kebutuhan rerata NaCl perhari sebesar 36 mg, serta penelitian sebelumnya yang telah menunjukkan pengaruh intake tinggi garam (NaCl) terhadap kepadatan tulang.

Kepadatan tulang diukur dengan Ultrasound DBM Sonic 1200 (*Digital Bone Measurement* – Emsor, S.A, Madrid, Spanyol). Keuntungan penggunaan alat ini antara lain : mudah cara pengoperasiannya, hasilnya langsung bisa diketahui, hasilnya dapat dipercaya, bebas radiasi, pemeriksaan cepat dan praktis.

Ketebalan tulang kortikal diukur dengan foto Roentgen dengan magnifikasi. Dilakukan scanning terhadap hasil Roentgen tersebut, lalu dibandingkan antara magnifikasi terhadap petanda pada Roentgen dengan magnifikasi terhadap ketebalan tulang kortikal. Keuntungan dari pengukuran ini adalah pelaksanaannya lebih mudah dibanding dengan pemeriksaan lain seperti ct-scan maupun preparat histologis, ketajaman gambar yang didapat akan lebih besar jika dilakukan magnifikasi.

Kekuatan tulang diukur dengan *Unconfined Compressive Strength Machine Modified* dengan keuntungan pengukurannya dapat dilakukan secara langsung serta beban dial yang tercatat dapat diperoleh secara langsung pula.

6.2 Pembahasan Hasil Penelitian

Hasil penelitian merupakan fakta-fakta yang harus ditafsirkan sehingga dapat digeneralisasikan secara jelas tentang arti dari hasil penelitian tersebut. Pembahasan ini juga dimaksudkan untuk menjelaskan permasalahan pada awal penelitian sehingga tujuan penelitian dapat tercapai.

6.2.1 Uji Normalitas

Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui bahwa data yang diperoleh berdistribusi normal. Hal ini dilakukan untuk memenuhi persyaratan pengujian parametrik. Uji normalitas dilakukan terhadap variabel tergantung yaitu kepadatan tulang, ketebalan tulang kortikal maupun kekuatan tulang. Uji ini juga dilakukan terhadap respon kepadatan tulang, respon ketebalan tulang kortikal dan respon kekuatan tulang.

Dari hasil uji normalitas melalui *Kolmogorov-Smirnov Tests* terhadap ketiga variabel diperoleh bahwa distribusi data ketiga variabel adalah distribusi normal ($p < 0,05$). Begitu juga terhadap ketiga respon masing-masing variabel diperoleh bahwa ketiga respon variabel berdistribusi normal ($p < 0,05$).

6.2.2 Pengaruh pemberian NaCl terhadap risiko patah tulang.

Banyak peneliti yang menunjukkan bahwa pemberian diet dengan kadar garam (NaCl) tinggi berpengaruh pada kualitas dan kuantitas tulang. Sebagian besar peneliti menyatakan bahwa pengaruh pemberian diet dengan kadar garam tinggi terutama menyebabkan penurunan kepadatan tulang tanpa menyebutkan seberapa besar pengaruh penurunan tersebut. Karena akibat yang dihadapi setelah penurunan kepadatan tulang tersebut adalah kekuatan tulang dalam menahan beban yang mampu diakomodasi oleh tulang tersebut akan menurun juga. Sehingga tulang tersebut akan memiliki risiko yang tinggi terhadap patah tulang.

Menurut Melton and Riggs (1993), selain kualitas tulang dan kuantitas tulang, faktor lain yang menentukan kekuatan tulang dalam menahan beban agar tidak terjadi patah tulang adalah bentuk geometri serta besarnya gaya yang diterima oleh tulang.

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui pengaruh pemberian diet tinggi garam terhadap kedua faktor yang menentukan kekuatan tulang tersebut yaitu kepadatan tulang dan bentuk geometri tulang yang diwakili oleh ketebalan tulang kortikal disamping juga mengetahui kekuatan tulang secara langsung.

Pengaruh pemberian diet tinggi garam (NaCl) terhadap ketiga variabel tersebut terlihat dari beberapa uji berikut ini.

Uji statistik multi varian digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh perlakuan antar kelompok terhadap variabel tergantung yaitu kepadatan tulang, ketebalan tulang kortikal serta kekuatan tulang. Hasil uji statistik ini menyatakan bahwa terdapat perbedaan cukup bermakna pada rerata hasil pengukuran baik kepadatan tulang, ketebalan tulang kortikal maupun kekuatan tulang antar kelompok dengan $p=0,000$ ($p<0,05$). (Pitono ; 2002)

Hasil uji manova ini sangat mendukung pernyataan peneliti-peneliti terdahulu bahwa diet tinggi garam (NaCl) akan berakibat penurunan kepadatan tulang. Seperti yang telah dikemukakan oleh Sellmeyer (2002) bahwa terjadi peningkatan ekskresi kalsium dan tanda-tanda peningkatan resorpsi tulang pada wanita yang secara random diberi diet tinggi natrium. Bahkan Blackwood (2001) mengemukakan bahwa peningkatan kehilangan kalsium urin akibat intake natrium yang berlebihan tidak mampu dikompensasi oleh absorpsi kalsium intestinal dan bahkan memiliki kecenderungan untuk menurunkan kalsium plasma yang terionisasi.

Peningkatan resorpsi tulang ini bermula dari pengaktifan mekanisme kompensasi hormonal untuk memperbaiki kadar kalsium plasma melalui peningkatan sekresi hormon yang merangsang aktivitas resorpsi tulang yaitu PTH (Bushinsky DA, 2001).

Peningkatan ekskresi natrium dan kalsium urin akibat intake tinggi garam ini bermula dari meningkatnya laju filtrasi ginjal yang secara langsung akan menyebabkan perangsangan terhadap *macula densa* untuk mengaktifkan sistem Renin-Angiotensin-Aldosteron. Hasil dari sistem tersebut adalah peningkatan ekskresi natrium agar konsentrasi kalsium plasma tetap (Guyton, 1997).

Peningkatan ekskresi natrium dan kalsium urin ini terjadi karena beberapa mekanisme diantaranya :

- a. Hambatan terhadap terbentuknya protein pembawa natrium dan kalsium pada sisi luminal sel tubulus ginjal sehingga permeabilitasnya terhadap natrium dan kalsium menurun
- b. Peningkatan tekanan hidrostatis kapiler peritubuler yang menyebabkan penurunan reabsorpsi natrium dan kalsium
- c. Penurunan aktivitas pompa Na-K ATPase pada tubulus proksimal ginjal sehingga reabsorpsi natrium dan kalsium akan menurun.

Hasil akhir dari ketiga proses tersebut menyebabkan meningkatnya ekskresi baik natrium maupun kalsium (Ganong, 1999 ; Ganry, 2003).

Tingginya ekskresi kalsium urin menyebabkan keseimbangan kalsium dalam plasma menjadi terganggu yang selanjutnya menyebabkan peningkatan pengaturan hormonal dengan pengeluaran PTH ke dalam plasma (Blackwood, 2001).

Selanjutnya PTH akan mengatur ulang keseimbangan kalsium plasma melalui mekanisme-mekanisme berikut :

- a. Peningkatan produksi 1,25 dihidroksi kalsitriol yang akan meningkatkan absorpsi kalsium pada lumen usus (Ganong, 1999).
- b. Hambatan ekspresi dan sintesa protein matrik pada osteoblas dan menyebabkan retraksi osteoblas pada permukaan tulang melalui modifikasi proteolitik dari sitoskeleton osteoblas (Sasaki T, 1996).
- c. Mengontrol aktivitas osteoklast melalui sel-sel stroma dan osteoblas yang mengatur diferensiasi osteoklas. Diferensiasi ini diatur oleh hubungan antara sel-sel tersebut melalui sintesa osteoprotegerin (OPG) dan ligan bagi activator NF- κ B (RANKL = *Reseptor Aktivator of Nf-Kappa Signaling-Ligand/OPGL*) (Oshiro 2002 ; Shiotani, 2002). Jika RANKL berikatan pada RANK pada osteoklas, maka sel-sel ini teraktivasi untuk berdiferensiasi dan berproliferasi. Proses ini berlangsung dengan bantuan adanya M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) yaitu melalui aktivasinya terhadap fusi pre osteoklas menjadi osteoklas serta peningkatan pembentukan pompa proton ATPase, sedangkan osteoprotegerin bekerja menghambat proses penyerapan tulang melalui hambatan terhadap pembentukan *ruffled border*. (Mulari MT, 2003)
- d. Penurunan reabsorpsi ion bikarbonat, penurunan aktivitas pompa Na-K ATPase serta penurunan protein kotranspor bagi natrium dan kalsium (Razaq S, 2000).

Mekanisme lain akibat meningkatnya kadar natrium plasma karena diet tinggi kalsium seperti yang diuraikan oleh Arnett (1996) bahwa perubahan aktivitas resorpsi pada osteoklas dapat terjadi akibat perubahan pH ekstraseluler meskipun perubahan itu hanya kecil mendekati pH fisiologis.

Seluruh proses diatas berujung pada penurunan kepadatan tulang yang mengakibatkan penurunan kemampuan tulang dalam menahan beban.

Dari hasil analisis regresi didapatkan bahwa besarnya pengaruh pemberian diet tinggi garam (NaCl) terhadap masing-masing variabel tergantung dapat diketahui dari beberapa persamaan regresi yang ada yaitu :

a. Kepadatan tulang = $1704,87 - (0,479 \times \text{massa garam (NaCl)})$

b. Ketebalan tulang kortikal = $0,954 - (0,001 \times \text{massa garam (NaCl)})$

c. Kekuatan tulang = $653,791 - (0,416 \times \text{massa garam (NaCl)})$.

Masing-masing konstanta menunjukkan besarnya satuan pengukuran yang diharapkan akan diperoleh jika kepada hewan coba tidak diberikan perlakuan. Artinya, jika pada hewan coba tidak diberi penambahan diet garam (NaCl) selain diet normal yang didapat maka angka kepadatan tulangnya akan sebesar 1704,87m/detik, angka ketebalan tulang kortikalnya 0,954 milimeter serta kekuatan tulang dalam menahan beban sampai terjadinya patah sebesar 653,791 Newton.

Hal tersebut mendukung beberapa hasil penelitian terdahulu seperti oleh Matkovic maupun Massey dan yang lainnya tergambar jelas bahwa terjadi peningkatan ekskresi kalsium urin sebesar 1 mmol setiap peningkatan 100 mmol natrium urin.

6.2.3 Perbedaan pengaruh akibat adanya perbedaan besar dosis terhadap kepadatan tulang, ketebalan tulang dan kekuatan tulang.

Dari hasil analisis uji beda dengan *pairwise comparisons test* didapatkan bahwa berdasar pada kepadatan tulang, terdapat perbedaan rerata yang sangat bermakna antara kelompok kontrol dengan seluruh kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Begitu juga terdapat perbedaan rerata yang sangat bermakna antara kelompok perlakuan dengan NaCl 72 mg dengan kelompok perlakuan NaCl 144 mg maupun 216 mg ($p = 0,000$; $p < 0,05$). Antara kelompok perlakuan 144 mg dengan kelompok perlakuan 216 mg juga terdapat perbedaan rerata yang bermakna ($p > 0,05$).

Begitu juga yang didapatkan dari hasil uji beda dengan *pairwise comparisons* terhadap respon kepadatan tulang, respon ketebalan tulang kortikal dan respon kekuatan tulang bahwa terdapat perbedaan rerata antara kelompok kontrol dengan seluruh kelompok perlakuan. Perbedaan rerata juga didapatkan antara pemberian NaCl 72 mg dengan pemberian NaCl 144 mg dan 216 mg, maupun antara perlakuan NaCl 144 mg dengan NaCl 216 mg ($p < 0,05$).

Hal ini dapat dijelaskan bahwa perbedaan pengaruh garam (NaCl) terhadap kepadatan tulang, ketebalan tulang kortikal dan kekuatan tulang ditentukan juga oleh dosis yang diberikan.

Dari hasil analisis regresi linier didapatkan bahwa terjadi penurunan baik pada kepadatan tulang, ketebalan tulang maupun kekuatan tulang pada tiap peningkatan pemberian garam (NaCl). Tetapi tidak setiap penurunan yang terjadi menyebabkan perbedaan rerata baik kepadatan, ketebalan tulang maupun kekuatan tulang. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Lees RL (2000) bahwa terjadi

perbedaan pengaturan terhadap aktivitas resorpsi antara osteoklast dengan inti sedikit dengan osteoklas yang berinti banyak akibat perubahan pH pada sekitar osteoklast.

Krieger NS (1992) sebelumnya juga mendapatkan hal yang sama bahwa perubahan pH sekitar osteoklas akan mengakibatkan perubahan aktivitas resorpsi dari osteoklas.

Berdasar pada hasil penelitian yang banyak dilakukan terhadap diet tinggi garam (NaCl), sebagian besar ahli menyarankan untuk membatasi konsumsi garam (NaCl) sebesar 2 gram perhari. Hal ini dimaksudkan agar tidak terjadi efek negatif terhadap tulang akibat konsumsi garam (NaCl) yang tinggi.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. Pemberian diet tinggi garam (NaCl) menurunkan kepadatan tulang.
2. Pemberian diet tinggi garam (NaCl) menurunkan ketebalan tulang.
3. Peningkatan pemberian diet garam (NaCl) menyebabkan meningkatnya risiko patah tulang.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian serupa dengan menggunakan metode yang lain, serta pengukuran dengan histomorfometri dan biokimia sebagai pembanding.
2. Perlu adanya penelitian lanjutan secara biomolekuler terhadap sel-sel tulang dengan perlakuan yang sama, sehingga diharapkan nantinya dapat menjelaskan lebih jauh tentang efek pemberian garam (NaCl) terhadap kesehatan tulang.
3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang pengaruh pemberian garam (NaCl), dengan pembagian tingkatan dosis yang lebih banyak, sehingga diketahui pada dosis berapa kepadatan tulang serta kekuatan tulang mulai menurun.

4. Perlu adanya penelitian lanjutan yang menerapkan hasil penelitian ini pada manusia melalui survey sehingga pengaruhnya dapat segera diketahui dan dicegah.

DAFTAR PUSTAKA

- Abu Damir H, Scott D, Loveridge N, Buchan W, Milne J. 1991. *The effects of feeding diets containing either NaHCO₃ or NH₄Cl on indices of bone formation and resorption and on mineral balance in the lamb.* Exp Physiol. Sep;76(5):725-732.
- Anderson RG, Falck JR, Goldstein JL, Brown MS. 1984. *Visualization of acidic organelles in intact cells by electron microscopy.* Proc Natl Acad Sci U S A. Aug;81(15):4838-4842.
- Apley, A. Graham., and Louis Solomon. 1993. *Apley's System of Orthopaedics and Fractures.* Oxford : Butterworth-Heinemann Ltd. Pp 107-129.
- Arnett TR, Spowage M. 1996. *Modulation of the resorptive activity of rat osteoclasts by small changes in extracellular pH near the physiological range.* Bone. Mar;18(3):277-279.
- Baron R, Neff L, Louvard D, Courtoy PJ. 1985. *Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border.* J Cell Biol. Dec;101(6):2210-2222.
- Barzel US. 1997. *Dietary patterns and blood pressure.* N Eng J Med Pp 337- 637.
- Blackwood AM, GA Sagnella 1 , DG Cook 2 and FP Cappuccio. 2001. *Urinary calcium excretion, sodium intake and blood pressure in a multi-ethnic population: results of the Wandsworth Heart and Stroke Study.* Journal of Human Hypertension 15, Pp 229-237.
- Bostrom MP, 2000. *Form and Function of Bone.* Orthopaedic Basic Science : Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System, 2nd Ed. The American Academy of Orthopaedic Surgeons. Pp 320-369.
- Bronner F, Worrel RV, 1991. *A Basic Science Primer in Orthopaedics.* Williams & Wilkins. Pp 3-34, 65-90, 105-111.
- Burhanudin, S, 2001. *Proceeding Forum Pasar Garam Indonesia.* Departemen Kelautan dan Perikanan. Jakarta. Hal. 1-17.
- Bushinsky DA, 2001. *Acid-base imbalance and the skeleton.* Eur J Nutr. Oct;40(5) pp :238-44.

- Chapuy MC, Pamphile R, Paris E, 2002. *Combined Calcium and Vitamin D3 Supplementation in Elderly Women: Confirmation of Reversal of Secondary Hyperparathyroidism and Hip Fracture Risk: the Decalyos II Study. Osteoporosis International*. 13(3):257-264.
- Dee R, Mange E, Hurst LC. *Properties of Musculoskeletal Tissues and Biomaterials*. In : Principles of Orthopaedic Practice. Mc Craw-Hill Book Company. Vol. (1) pp.79-87, 134-146.
- Devine A, Criddle RA, Dick IM, Kerr DA, Prince RL. 1996. *A longitudinal study of the effect of sodium and calcium intakes on regional bone density in postmenopausal women*. Am J Clin Nutr. May; 63(5) : 787-788.
- Donna Tinnerello MS, RD, CD/N. 2000. Bone Health and Osteoporosis. On line at http://alwaysyourchoice.com/ayc/nutrition/diet_disease/bone_health.php. Tanggal akses 27-9-2003.
- Donatus IA, Nurlaila. 1986. *Obat Tradisional dan Fitoterapi, Uji Toksikologi*. Makalah Kursus Penyegaran Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada, Jogjakarta.
- Evans CEL, Chughati AY, Blumsohn A, Giles M, Eastell R. 1997. *The effect of dietary sodium on calcium metabolism in premenopausal and postmenopausal women*. Eur J Clin Nutr 51: 394 - 399.
- Favus, Murray J. 1993. *Primer on The Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 2nd Ed. New York : Raven Press Ltd. Pp 1-54, 137-152, 223-260, 426-430.
- Francis, R. M. 1990. *Osteoporosis : Pathogenesis and Management*. Hingham : Kluwer Academic Publishers. Pp 1-13, 26-54.
- Ganong, Wf. 1999. *Review of Medical Physiology*. 19th Ed. Connecticut : Appleton & Lange. Pp 9-29, 451-460, 670-687.
- Ganry O et al, 2003. *Expert Group on Vitamins and Minerals*. On line at http://www.foodstandards.gov.uk/multimedia/pdfs/evm_sodiumchloride.pdf. Tanggal akses 18-8-2003
- Greendale G A, Barrett-Connor E, Edelstein S, Ingles S, Haile RL. 1994. *Dietary sodium and bone mineral density: results of a 16 year old follow up study*. J Am Ger Soc 42: 1050 - 1055.
- Guyton, A.C, and Jhon E. Hall. 1997. *Textbook of Medical Physiology*. 9th edition. Philadelphia : W.B. Saunders Company. Hal. 375-396, 418-479.

- Inoue M, Yoshida H, Akisaka T. 1999. *Visualization of acidic compartments in cultured osteoclasts by use of an acidotrophic amine as a marker for low pH.* Cell Tissue Res. Dec;298(3): pp 527-537.
- Kaufmann, D.W, 1960. *Sodium Chloride. The Production and Properties of Salt and Brine.* Pp. 64-78.
- Kim HM. 2001. *Dissolution of poorly crystalline apatite crystals by osteoclasts determined on artificial thin-film apatite.* J Biomed Mater Res. Aug;56(2): pp. 250-256.
- Krieger NS, Sessler NE, Bushinsky DA. 1992. *Acidosis inhibits osteoblastic and stimulates osteoclastic activity in vitro.* Am J Physiol. Mar;262(3 Pt 2):442-448.
- Lameschow, S., Hosmer Dw, Klar J and Lwanga Ks. 1990. *Adequacy of Sample Size in Health Studies.* New York. John Willey & Sons.
- Lees RL, Heersche JN. 2000. *Differences in regulation of pH(i) in large (≥ 10 nuclei) and small (≤ 5 nuclei) osteoclasts.* Am J Physiol Cell Physiol. Sep;279(3):pp.751-761.
- Lin HM, Nakamura H, Noda T, Ozawa H. 1994. *Localization of H(+)-ATPase and carbonic anhydrase II in ameloblasts at maturation.* Calcif Tissue Int. Jul;55(1): pp. 38-45.
- Maddison JP, Isenberg DA, Woo P, Glass DN. 1998. *Oxford Textbook of Rheumatology.* Edisi ke-2. Oxford University Press. hal. 421-437, 1583-1606.
- Martini, F.H et al, 2001. *Fundamentals of Anatomy and Physiology.* Edisi ke-5. hal. 170-185, 966, 991-994.
- Matkovic V, Ilich JZ, Andon MB, Hsieh LC, Tzagournis MA, Lager BJ, Goel PK. 1995. *Urinary calcium, sodium, and bone mass of young females.* Am J Clin Nutr Aug;62(2):417-425.
- Mulari MT, Zhao H, Lakkakorpi PT, Vaananen HK. 2003. *Osteoclast ruffled border has distinct subdomains for secretion and degraded matrix uptake.* Traffic. Feb;4(2):113-25.
- Mow, V.C and Hayes, W.C, 1991. *Basic Orthopaedic Biomechanics. Biomechanics of Cortical and Trabecular Bone : Implications For Assessment of Fracture Risk.* Raven Press. New York. pp. 93-138.

- Nordin BEC, Need AG, Morris HA, Horowitz M. 1991. *The nature and significance of the relationship between urinary sodium and urinary calcium in women.* Arch Intern Med ; 151: pp. 757-759.
- O'Brien KO, et al. 1996. *Variables related to urinary calcium excretion in young girls.* J Pediatr Gastroenterol Nutr Jul;23(1): pp. 8-12.
- Oshiro T, Shibasaki Y, Martin TJ, Sasaki T. 2001. *Immunolocalization of vacuolar-type H⁺-ATPase, cathepsin K, and receptor activator of NFkappaB ligand in odontoclasts during physiological root resorption of human deciduous teeth.* Anat Rec. Nov 1;264(3): pp. 305-11.
- Oshiro T, Shiotani A, Shibasaki Y, Sasaki T. 2002. *Osteoclast induction in periodontal tissue during experimental movement of incisors in osteoprotegerin-deficient mice.* Anat Rec. Apr 1;266(4): pp. 218-25.
- Pitono S. 2002. *Buku Latihan SPSS Statistik Multivariat.* PT Elex Media Komputindo Gramedia, Jakarta. Pp 34-38, 143-260.
- Razaq S, Urban JP, Wilkins RJ. 2000. *Regulation of intracellular pH by bovine intervertebral disc cells.* Cell Physiol Biochem. 10(1-2): pp. 109-115.
- Resnick D. 1995. *Diagnosis of Bone and Joint Disorders.* 3th ed WB Sanders Company. Pp 791-803.
- Riggs, B. Lawrence., and L. Joseph Melton III. 1995. *Osteoporosis : Etiology, Diagnosis, and Management.* Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers. Pp 421-437.
- Roeshadi, D. 1997. *Deteksi Dini Osteoporosis pada wanita Pra dan Paska Menopause,* Disertasi. Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga Surabaya. Hal 1-6.
- Roeshadi D, 2001. *Osteoporosis and Fractures.* Symposium Update the Roles of Bisphosphonates on Osteoporosis. The Westin Hotel, Surabaya.
- Roodman GD. 1999. *Cell biology of the osteoclast.* Exp Hematol. Aug;27(8): pp.1229-1241.
- Sahara T, Itoh K, Debari K, Sasaki T. 2003. *Specific biological functions of vacuolar-type H⁺-ATPase and lysosomal cysteine proteinase, cathepsin K, in osteoclasts.* Anat Rec. Feb 1;270A(2): pp. 152-161.
- Salter, Robert B. 1983. *Textbook of Disorders and Injuries of the Musculoskeletal System.* 2nd Ed. Baltimore : Williams & Wilkins. Hal. 5-23, 152-156

- Sasaki T, Hong MH, Udagawa N, Moriyama Y. 1994. *Expression of vacuolar H(+)-ATPase in osteoclasts and its role in resorption*. Cell Tissue Res. Nov;278(2): pp. 265-271.
- Sasaki T. 1996. *Recent advances in the ultrastructural assessment of osteoclastic resorptive functions*. Microsc Res Tech. Feb 1;33(2): pp. 182-191.
- Setiyohadi, B, 1998. *Temu Ilmiah Reumatologi 1998*. Osteoporosis akibat steroid. Sub Bag Reumatologi, Bagian Penyakit Dalam FKUI, Jakarta.
- Sellmeyer DE, Schloetter M, Sebastian A. 2002. *Potassium Citrate Prevents Increased Urine Calcium Excretion and Bone Resorption Induced by a High Sodium Chloride Diet*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 87(5): pp. 2008-2012.
- Shiotani A, 2002. *Regulation of osteoclast differentiation and function by receptor activator of NF κ B ligand and osteoprotegerin*. Anat Rec. Oct 1;268(2): pp. 137-146.
- Shortt C, Madden A, Flynn A, Morrissey PA. 1988. *Influence of dietary sodium on urinary calcium excretion in Irish individuals*. Department of Nutrition, University College, Cork, Ireland. Eur J Clin Nutr Jul;42(7): pp. 595-603.
- Stephen Walsh. 2002. *Diet and Bone Health* A Vegan Society briefing paper. Available at http://www.vegsource.com/articles/walsh_diet_bone.htm. Tanggal akses 17-8-2003.
- Tjokroprawiro, A, 2003. *Recent Advances in the Prevention and Treatment of Osteoporosis*. Simposium Osteoporosis. PERKENI, Surabaya.
- Udagawa N, Takito J, Suda T. 1992. *Mechanism of acid production and secretion by osteoclasts*. [Article in Japanese]. Nippon Rinsho. Sep;50(9): pp. 2133-2138.
- Vigorita, V. J. 1999. *Orthopaedic Pathology*. 1st Ed. Philadelphia : Williams & Wilkins. Pp 7-35, 105-135.
- Watts NB. 2003. *Data Show Bone Mineral Density Explains Only Small Portion of Nonvertebral Fracture Risk Reduction*. Online at http://www.pgpharma.com/news_20030619_2.shtml. Tanggal akses 12-2-2004.
- Zainudin, M. 2000. *Metodologi Penelitian*. Surabaya : Universitas Airlangga. Hal. 38- 57.

Lampiran 1

PERHITUNGAN JUMLAH SAMPEL

a. Perhitungan besar sampel menurut Lameschow (1990) :

$$(t-1)(r-1) \geq 20$$

$$(4-1)(r-1) \geq 20$$

$$r \geq \frac{20+3}{3}$$

$$r \geq 7,67$$

Jadi besar sampel awal semestinya minimal 8 sampel untuk tiap kelompok.

b. Kemungkinan hewan coba mati adalah sebesar $f = 3\%$, sehingga :

$$\text{Jumlah sampel} = \frac{1 \times 8}{1 - 0,03}$$

$$= \frac{8}{0,97}$$

$$= 8,25.$$

c. Untuk menjaga kemungkinan adanya *drop out*, maka jumlah sampel ditambah menjadi 10 per kelompok.

d. Koreksi perhitungan besar sampel melalui rumus Higgins-Kleinbun.

Berdasarkan tabel Z kurva normal satu arah didapatkan $Z\alpha = 1,65$ untuk $\alpha = 0,05$;
sedangkan $Z\beta = 1,28$ untuk $\beta = 0,1$.

Menurut Higgins-Kleinbun besarnya sampel (n) dapat dihitung melalui rumus :

$$n = \frac{1}{1-f} \left\{ \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 S^2(c)}{(X_c - X_t)^2} \right\}$$

keterangan :

- n = jumlah sampel
 Sc = standar deviasi kelompok kontrol
 Xc = rerata kelompok kontrol
 Xt = rerata kelompok perlakuan

Jadi besar sampel berdasarkan kelompok kontrol terhadap kepadatan tulang sebesar :

$$n = \frac{1}{1-0,3} \left\{ \frac{2 \times (1,65 + 1,28)^2 \times (40,3825)^2}{(1707 - 1635)^2} \right\}$$

$$n = \frac{1}{0,97} \left\{ \frac{2 \times 2,93 \times 2,93 \times 40,3825 \times 40,3825}{72 \times 72} \right\}$$

$$n = 5,568$$

Jadi besar sampel yang digunakan menurut Higgins-Kleinbun adalah 6 untuk setiap kelompok. Jadi pada penelitian ini memenuhi kriteria pengambilan sampel.

Lampiran 2

Perhitungan dosis hewan coba menggunakan tabel konversi Laurence & Bacharach (1964) sebagai berikut :

Tabel 1. Konversi perhitungan dosis untuk berbagai jenis hewan dan manusia (Laurence dan Bacharah, 1964 *cit* Donatus dan Nurlaila, 1986).

	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmot 400 g	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmot 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 2 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,1	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

Lampiran 3

Konversi perhitungan dosis natrium untuk hewan coba adalah sebagai berikut :

Angka konversi dari dosis untuk manusia dengan tikus putih adalah : 0,018

Dosis natrium normal sesuai dengan COHA adalah 87 mmol/hari atau setara dengan 2000 mg/hari.

Jadi besar asupan natrium untuk kelompok tikus kontrol adalah :

$$2000 \text{ mg/hari} \times 0,018 = 36 \text{ mg/200 g/hari}$$

Sedang untuk kelompok perlakuan diberikan diet natrium sebesar 72 mg/200g BB/hari, 144 mg/200g BB/hari serta 216 mg/200g BB/hari untuk masing-masing kelompok.

Lampiran 4

Pemberian volume larutan maksimal obat pada perlakuan hewan coba berdasar tabel Ritchel (1974) sebagai berikut :

Tabel 2. Volume maksimum larutan obat yang dapat diberikan pada hewan (Ritchel, 1974 cit Donatus dan Nurlaila, 1986)

Hewan	Volume maksimum sesuai jalur pemberian				
	i.v	i.m	i.p	s.c	p.o
Mencit (20-30 gram)	0,5	0,05	1,0	0,5-1,0	1,0
Tikus (100 gram)	1,0	0,1	2,0-5,0	2,0-5,0	5,0
Hamster (50 gram)	-	0,1	1,0-2,0	2,5	2,5
Marmot (250 gram)	-	0,25	2,0-5,0	5,0	10,0
Merpati (300 gram)	2,0	0,5	2,0	2,0	10,0
Kelinci (2500 gram)	5,0-10,0	0,5	10,0-20,0	5,0-10,0	20,0
Kucing (3000 gram)	5,0-10,0	1,0	10,0-20,0	5,0-10,0	50,0
Anjing (5000 gram)	10,0-20,0	5,0	20,0-50,0	10,0	100,0

Lampiran 5

Daftar kandungan makanan standar yang diberikan pada hewan coba.

No	Nama Bahan	Kadar
1	Air	maksimum 13,0 %
2	Protein	17,0 – 18,0 %
3	Lemak	minimum 3,0 %
4	Serat	maksimum 6,0 %
5	Kalsium	minimum 3,60 %
6	Fosfor	minimum 0,60 %

Lampiran 6

Cara membuat larutan NaCl

1. Larutan NaCl 72 mg / 2 ml.

$$\text{Larutan NaCl } 72 \text{ mg / 2 ml} = \text{larutan NaCl } 360 \text{ mg / 10 ml}$$

$$= \text{larutan NaCl } 36000 \text{ mg / 1000 ml}$$

Jadi, timbang NaCl sebesar 36 g lalu larutkan dalam aquades sampai volume 1000 ml. Jika dalam pelaksanaannya kebutuhan larutan NaCl kurang, dapat dibuat lagi dengan cara yang sama.

2. Larutan NaCl 144 mg / 2ml.

$$\text{Larutan NaCl } 144 \text{ mg / 2 ml} = \text{larutan NaCl } 720 \text{ mg / 10 ml}$$

$$= \text{larutan NaCl } 72000 \text{ mg / 1000 ml}$$

Jadi, timbang NaCl sebesar 72 g lalu larutkan dalam aquades sampai volume 1000 ml. Jika dalam pelaksanaannya kebutuhan larutan NaCl kurang, dapat dibuat lagi dengan cara yang sama.

3. Larutan NaCl 216 mg / 2 ml.

$$\text{Larutan NaCl } 216 \text{ mg / 2 ml} = \text{larutan NaCl } 1080 \text{ mg / 10 ml}$$

$$= \text{larutan NaCl } 108000 \text{ mg / 1000 ml}$$

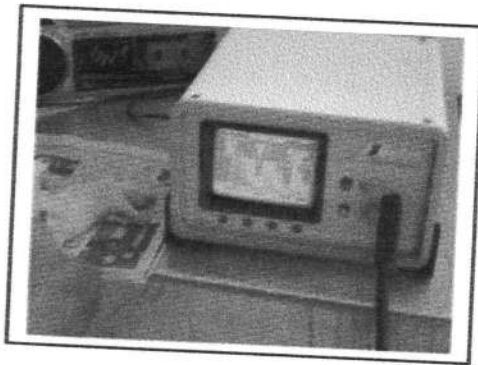
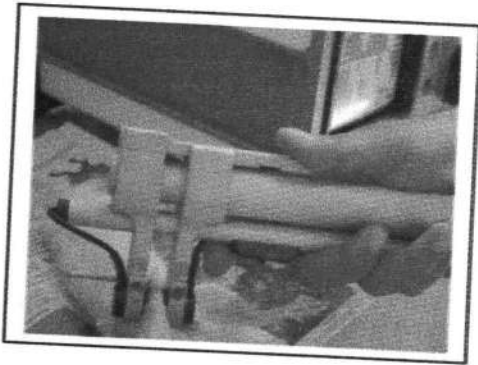
Jadi, timbang NaCl sebesar 108 g lalu larutkan dalam aquades sampai volume 1000 ml. Jika dalam pelaksanaannya kebutuhan larutan NaCl kurang, dapat dibuat lagi dengan cara yang sama.

Lampiran 7

CARA PENGUKURAN DENSITAS TULANG DENGAN ALAT DBM SONIC 1200.

1. Bersihkan bulu tikus yang telah dibius pada daerah paha yang akan diukur sampai kulit.
2. Kalibrasi alat DBM Sonic 1200.
3. Oleskan jelly pada kedua ujung transducer DBM Sonic secara merata.
4. Secara perlahan jepitlah densitas tulang paha yang akan diukur yang telah dibersihkan kulitnya diantara kedua ujung transducer DBM Sonic 1200.
5. Layar monitor alat DBM Sonic akan menunjukkan angka, tetaplah mengukur sampai angka pada layar monitor tidak berubah lagi.
6. Catatlah angka pada layar monitor, saat angka tersebut tidak berubah lagi.

Gambar pengukuran densitas tulang dengan DBM Sonic 1200.

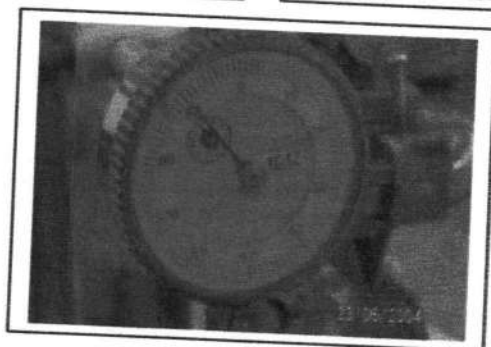
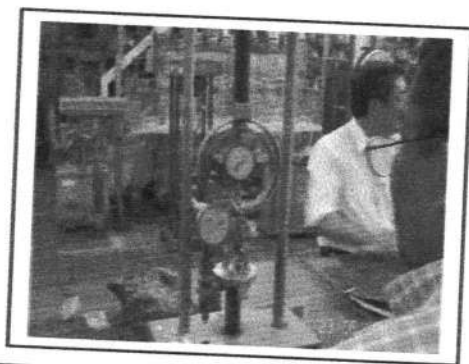


Lampiran 8

CARA PENGUKURAN KEKUATAN TULANG PADA HEWAN COBA

1. Siapkan tulang femur yang telah dibersihkan dari otot dan jaringan lunak lainnya.
2. Letakkan tulang femur pada bagian pemegang tulang pada alat *Unconfined Compressive Strength Machine Modified*.
3. Berikan beban pada pertengahan tulang femur dengan memutar tuas pemberi beban.
4. Catat perubahan besarnya beban yang ada pada penunjuk dial beban tiap putaran tuas pemberi beban.
5. Hentikan pemberian beban saat besarnya beban yang tercatat pada penunjuk dial beban besarnya tetap atau semakin turun.
6. Catatlah angka terbesar yang telah tercatat tadi, angka tersebut menyatakan beban (gaya) maksimal yang mampu ditahan oleh tulang, yang menyatakan kekuatan tulang.

Gambar cara pengukuran kekuatan tulang



Lampiran 9

CARA PENGUKURAN KETEBALAN TULANG KORTIKAL PADA HEWAN COBA

1. Siapkan tulang femur yang telah dibersihkan dari otot dan jaringan lunak lainnya.
2. Lakukan foto Roentgen antero-posterior terhadap tulang femur kanan hewan coba dengan magnifikasi yang disertai petanda yang telah diukur (1 cm atau 10 mm).
3. Lakukan scanning terhadap hasil foto Roentgen tersebut.
4. Dengan program Corel-Draw, tentukan :

- a) Faktor skala (r) :

$$r = \frac{\text{Besar ukuran petanda dalam program Corel-Draw (Pixel)}}{\text{Besar ukuran sebenarnya (10 mm)}}$$

$$r = 345 \text{ pixel}/10 \text{ mm} = 34,5 \text{ pixel/mm}$$

- b) Tentukan pertengahan diafisis tulang femur yaitu setengah dari panjang keseluruhan tulang femur. Hasil tersebut merupakan titik tengah tulang femur diukur dari masing-masing ujung tulang femur.
 - c) Ukurlah besarnya ketebalan dari tulang kortikal femur pada titik pertengahan diafisis tersebut pada setiap sampel. Catatlah hasilnya.
5. Hitunglah ketebalan sebenarnya dari tulang kortikal femur tersebut dengan rumus :

$$\text{Ketebalan sebenarnya} = \frac{\text{Ketebalan dalam Corel-Draw (pixel)}}{r \text{ (pixel/mm)}}$$

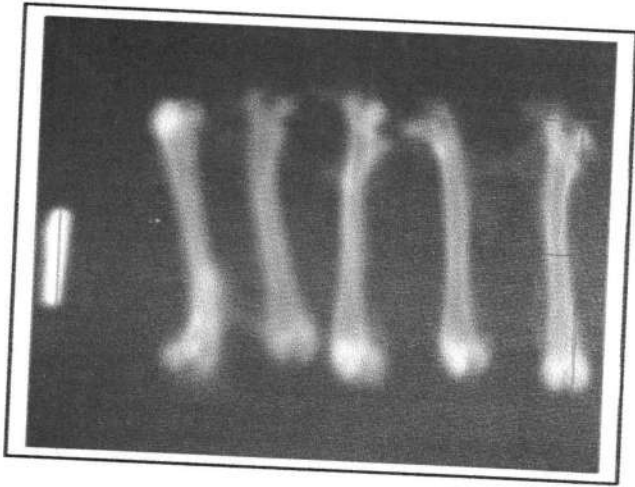
Contoh : - ketebalan tulang kortikal femur dalam Corel-Draw bagi sampel

kontrol no 1 = a pixel

- ketebalan sebenarnya dari tulang kortikal femur sampel kontrol no 1 adalah $a/34,5$ milimeter

6. Catatlah hasil pengukuran ketebalan tulang kortikal femur dari tiap-tiap sampel.

Gambar Cara Pengukuran Ketebalan Tulang



Lampiran 10

Data hasil pengukuran kepadatan tulang (m/det).

NO	Kontrol (K1)	NaCl 72 mg (K2)	NaCl 144 mg (K3)	NaCl 216 mg (K4)
1	1694	1663	1632	1598
2	1686	1713	1675	1631
3	1675	1644	1612	1578
4	1778	1693	1662	1628
5	1754	1668	1637	1603
6	1714	1622	1597	1553
7	1697	1673	1642	1608
8	1645	1660	1628	1594
9	1720		1637	1633
10			1633	1599

Data hasil pengukuran ketebalan tulang kortikal (milimeter).

NO	Kontrol (K1)	NaCl 72 mg (K2)	NaCl 144 mg (K3)	NaCl 216 mg (K4)
1	0,975	0,945	0,865	0,815
2	1,005	0,875	0,88	0,83
3	0,895	0,955	0,855	0,88
4	0,915	0,89	0,8	0,84
5	1,015		0,88	0,865
6	0,955	0,925	0,815	0,865
7	0,980	0,84	0,855	0,84
8	0,940	0,925	0,895	0,815
9			0,895	0,795
10	0,950	0,895	0,87	0,785

Data hasil pengukuran kekuatan tulang (Newton) setelah pemberian berbagai dosis larutan NaCl.

NO	Kontrol (K1)	NaCl 72 mg (K2)	NaCl 144 mg (K3)	NaCl 216 mg (K4)
1	697	606	583	587
2	662	612	591	594
3	670	622	587	535
4	672	599	602	562
5	656		600	588
6	676	619	596	564
7	652	602	556	573
8	657	608	578	599
9			614	548
10	635	603	592	555

Lampiran 11

Descriptives

Means

Report

KELOMPOK		KEPADATAN mm/det	TEBAL TULANG mm	KEKUATAN Newton
KONTROL POS	RERATA	1707.0000	.95889	664.1111
	SIM. BAKU	40.3825	3.9432E-02	17.4459
	N	9	9	9
NACL 72	RERATA	1667.0000	.90786	609.7143
	SIM. BAKU	27.8978	4.1217E-02	8.4993
	N	8	7	7
NACL 144	RERATA	1635.5000	.86100	589.9000
	SIM. BAKU	22.1573	3.1693E-02	15.7017
	N	10	10	10
NACL 216	RERATA	1602.5000	.83300	570.5000
	SIM. BAKU	24.8965	3.1198E-02	21.2668
	N	10	10	10

Report

KELOMPOK		RESPON KEPADATAN	RESPON TEBAL	RESPON KEKUATAN
NACL 72	RERATA	40.0000	5.1030E-02	54.3968
	SIM. BAKU	27.8978	4.1217E-02	8.4993
	N	8	7	7
NACL 144	RERATA	71.5000	9.7890E-02	74.2111
	SIM. BAKU	22.1573	3.1693E-02	15.7017
	N	10	10	10
NACL 216	RERATA	104.5000	.12589	93.6111
	SIM. BAKU	24.8965	3.1198E-02	21.2668
	N	10	10	10

Lampiran 12

NPar Tests

KELOMPOK = KONTROL

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		KEPADATAN mm/det	TEBAL TULANG mm	KEKUATAN Newton
N		9	9	9
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1707.0000	.95889	664.1111
	Std. Deviation	40.3825	3.9432E-02	17.4459
Most Extreme Differences	Absolute	.153	.103	.137
	Positive	.153	.095	.137
	Negative	-.103	-.103	-.133
Kolmogorov-Smirnov Z		.460	.309	.410
Asymp. Sig. (2-tailed)		.984	1.000	.996

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = KONTROL POS

KELOMPOK = NACI 72

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		KEPADATAN mm/det	TEBAL TULANG mm	KEKUATAN Newton
N		8	7	7
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1667.0000	.90786	609.7143
	Std. Deviation	27.8978	4.1217E-02	8.4993
Most Extreme Differences	Absolute	.165	.233	.151
	Positive	.165	.126	.151
	Negative	-.151	-.233	-.148
Kolmogorov-Smirnov Z		.466	.616	.400
Asymp. Sig. (2-tailed)		.982	.843	.997

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = NACL 72

KELOMPOK = NACI 144**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		KEPADATAN mm/det	TEBAL TULANG mm	KEKUATAN Newton
N		10	10	10
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1635.5000	.86100	589.9000
	Std. Deviation	22.1573	3.1893E-02	15.7017
Most Extreme Differences	Absolute	.185	.225	.130
	Positive	.185	.142	.120
	Negative	-.167	-.225	-.130
Kolmogorov-Smirnov Z		.584	.711	.412
Asymp. Sig. (2-tailed)		.885	.692	.996

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = NACL 144

KELOMPOK = NACI 216**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		KEPADATAN mm/det	TEBAL TULANG mm	KEKUATAN Newton
N		10	10	10
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1602.5000	.83300	570.5000
	Std. Deviation	24.8965	3.1198E-02	21.2868
Most Extreme Differences	Absolute	.166	.147	.181
	Positive	.113	.118	.120
	Negative	-.166	-.147	-.181
Kolmogorov-Smirnov Z		.526	.466	.573
Asymp. Sig. (2-tailed)		.945	.982	.898

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = NACL 216

Lampiran 13

NPar Tests

KELOMPOK = NACI 72

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		RESPON KEPADATAN	RESPON TEBAL	RESPON KEKUATAN
N		8	7	7
Normal Parameters a,b	Mean	40.0000	5.1033E-02	54.3968
	Std. Deviation	27.8978	4.1217E-02	8.4993
Most Extreme Differences	Absolute	.165	.233	.151
	Positive	.151	.233	.148
	Negative	-.165	-.126	-.151
Kolmogorov-Smirnov Z		.466	.616	.400
Asymp. Sig. (2-tailed)		.982	.843	.997

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = NACL 72

KELOMPOK = NACI 144

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		RESPON KEPADATAN	RESPON TEBAL	RESPON KEKUATAN
N		10	10	10
Normal Parameters a,b	Mean	71.5000	9.7890E-02	74.2111
	Std. Deviation	22.1573	3.1693E-02	15.7017
Most Extreme Differences	Absolute	.185	.225	.130
	Positive	.167	.225	.130
	Negative	-.185	-.142	-.120
Kolmogorov-Smirnov Z		.584	.711	.412
Asymp. Sig. (2-tailed)		.885	.692	.996

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = NACL 144

KELOMPOK = NACI 216**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		RESPON KEPADATAN	RESPON TEBAL	RESPON KEKUATAN
N		10	10	10
Normal Parameters a,b	Mean	104.5000	.12589	93.6111
	Std. Deviation	24.8965	3.1198E-02	21.2668
Most Extreme Differences	Absolute	.166	.147	.181
	Positive	.166	.147	.181
	Negative	-.113	-.118	-.120
Kolmogorov-Smirnov Z		.526	.466	.573
Asymp. Sig. (2-tailed)		.945	.982	.898

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = NACL 216

Lampiran 14

Analisis multi varian terhadap variabel tergantung

Multivariate Tests^c

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	1.000	59554.906 ^a	3.000	29.000	.000
	Wilks' Lambda	.000	59554.906 ^a	3.000	29.000	.000
	Hotelling's Trace	6160.852	59554.906 ^a	3.000	29.000	.000
	Roy's Largest Root	6160.852	59554.906 ^a	3.000	29.000	.000
KEL	Pillai's Trace	1.017	5.303	9.000	93.000	.000
	Wilks' Lambda	.080	14.331	9.000	70.729	.000
	Hotelling's Trace	10.298	31.656	9.000	83.000	.000
	Roy's Largest Root	10.180	105.192 ^b	3.000	31.000	.000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept+KEL

Analisis multi varian terhadap respon variabel

Multivariate Tests^c

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.979	335.319 ^a	3.000	22.000	.000
	Wilks' Lambda	.021	335.319 ^a	3.000	22.000	.000
	Hotelling's Trace	45.725	335.319 ^a	3.000	22.000	.000
	Roy's Largest Root	45.725	335.319 ^a	3.000	22.000	.000
KEL	Pillai's Trace	.804	5.156	6.000	46.000	.000
	Wilks' Lambda	.206	8.838 ^a	6.000	44.000	.000
	Hotelling's Trace	3.815	13.351	6.000	42.000	.000
	Roy's Largest Root	3.802	29.149 ^b	3.000	23.000	.000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept+KEL

Lampiran 15

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
KEPADATAN mm/det	KONTROL POS	NACL 72	38.518	15.637	.020
		NACL 144	69.875	14.332	.000
		NACL 216	102.875	14.332	.000
	NACL 72	NACL 144	31.357	14.860	.043
		NACL 216	64.357	14.860	.000
NACL 144	NACL 216	33.000	13.512	.020	
TEBAL TULANG mm	KONTROL POS	NACL 72	5.214E-02	.019	.008
		NACL 144	9.900E-02	.017	.000
		NACL 216	.127	.017	.000
	NACL 72	NACL 144	4.686E-02	.018	.013
		NACL 216	7.486E-02	.018	.000
NACL 144	NACL 216	2.800E-02	.016	.093	
KEKUATAN Newton	KONTROL POS	NACL 72	58.036	8.420	.000
		NACL 144	77.850	7.717	.000
		NACL 216	97.250	7.717	.000
	NACL 72	NACL 144	19.814	8.017	.019
		NACL 216	39.214	8.017	.000
NACL 144	NACL 216	19.400	7.275	.012	

Based on estimated marginal means

- a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
RESPON KEPADATAN	NACL 72	NACL 144	-31.357	12.501	.019
		NACL 216	-64.357	12.501	.000
	NACL 144	NACL 216	-33.000	11.345	.008
RESPON TEBAL	NACL 72	NACL 144	-4.686E-02	.017	.010
		NACL 216	-7.486E-02	.017	.000
	NACL 144	NACL 216	-2.800E-02	.015	.079
RESPON KEKUATAN	NACL 72	NACL 144	-19.814	8.248	.024
		NACL 216	-39.214	8.248	.000
	NACL 144	NACL 216	-19.400	7.485	.016
		NACL 216	NACL 144	19.400	7.485

Based on estimated marginal means

- a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Lampiran 16

Analisis Diskriminan

Tests of Equality of Group Means

	Wilks' Lambda	F	df1	df2	Sig.
RESPON KEPADATAN	.471	13.458	2	24	.000
RESPON TEBAL	.548	9.913	2	24	.001
RESPON KEKUATAN	.512	11.421	2	24	.000

Stepwise statistics

Variables Entered/Removed^{a,b,c,d}

Step	Entered	Wilks' Lambda							
		Statistic	df1	df2	df3	Exact F			
						Statistic	df1	df2	Sig.
1	RESPON KEPADATAN	.471	1	2	24.0	13.458	2	24	.000
2	RESPON TEBAL	.253	2	2	24.0	11.382	4	46	.000

At each step, the variable that minimizes the overall Wilks' Lambda is entered.

- Maximum number of steps is 6.
- Minimum partial F to enter is 3.84.
- Maximum partial F to remove is 2.71.
- F level, tolerance, or VIN insufficient for further computation.

Canonical discriminant functions

Eigenvalues

Function	Eigenvalue	% of Variance	Cumulative %	Canonical Correlation
1	2.918 ^a	99.6	99.6	.863
2	.010 ^a	.4	100.0	.101

- First 2 canonical discriminant functions were used in the analysis.

Standard Error .03467

Analysis of Variance:

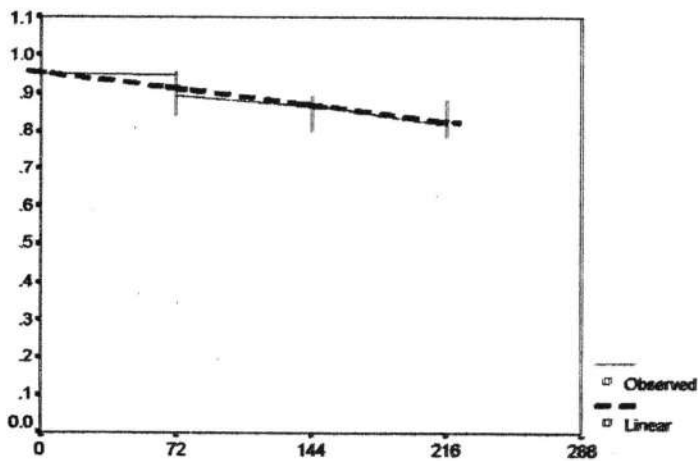
	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	.08390684	.08390684
Residuals	35	.04206613	.00120189

F = 69.81245 Signif F = .0000

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
NaCl	-.000586	7.0174E-05	-.816131	-8.355	.0000
(Constant)	.953203	.009758		97.687	.0000

TEBAL TULANG mm



NaCl

Curve Fit

Dependent variable.. KUAT
 Listwise Deletion of Missing Data
 Multiple R .87825
 R Square .77133
 Adjusted R Square .76480
 Standard Error 18.92616

Method.. LINEAR

Analysis of Variance:

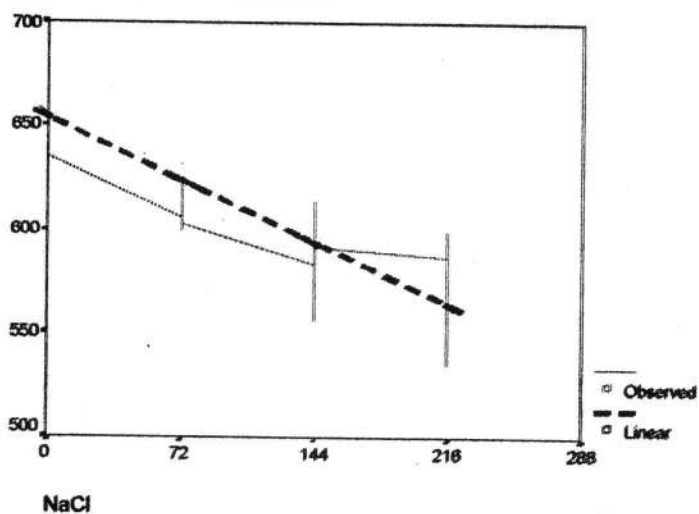
	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	42288.691	42288.691
Residuals	35	12536.985	358.200

F = 118.05902 Signif F = .0000

----- Variables in the Equation -----

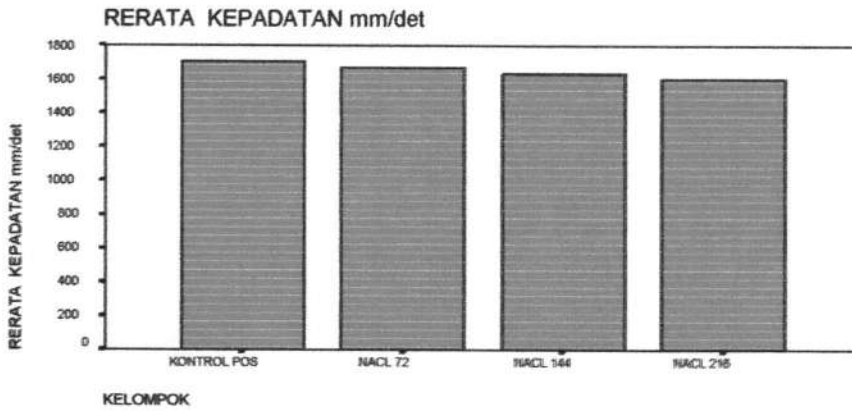
Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
NaCl	-.416252	.038310	-.878254	-10.865	.0000
(Constant)	653.791045	5.326942		122.733	.0000

KEKUATAN Newton

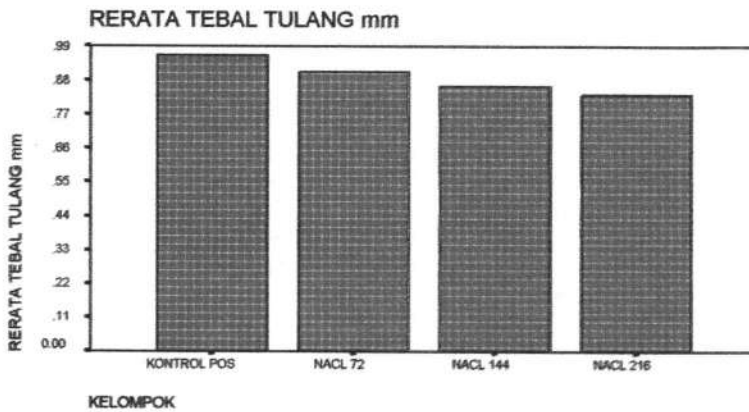


Lampiran 18

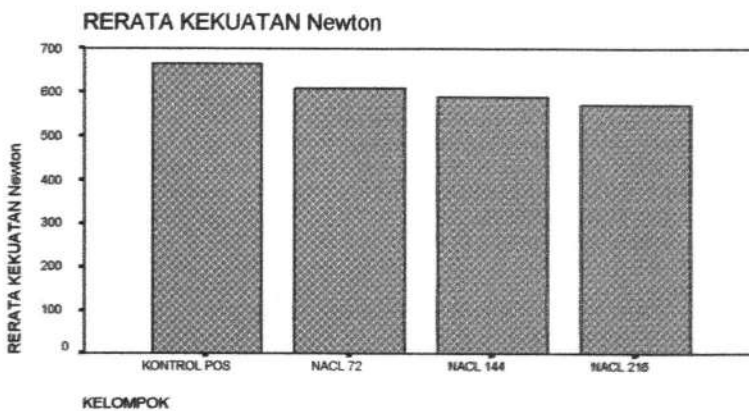
Profile Plots KEPADATAN m/det



TEBAL TULANG mm

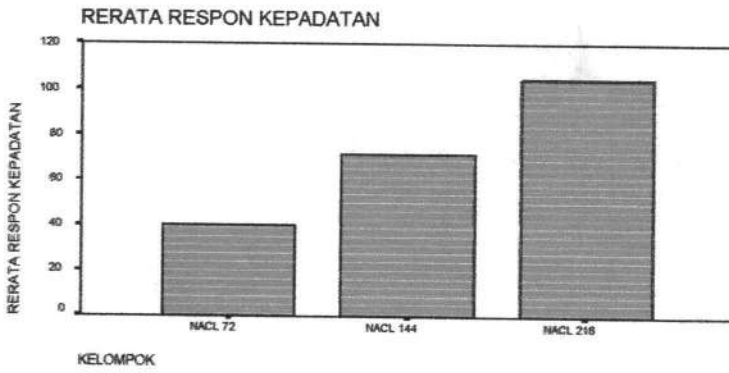


KEKUATAN Newton

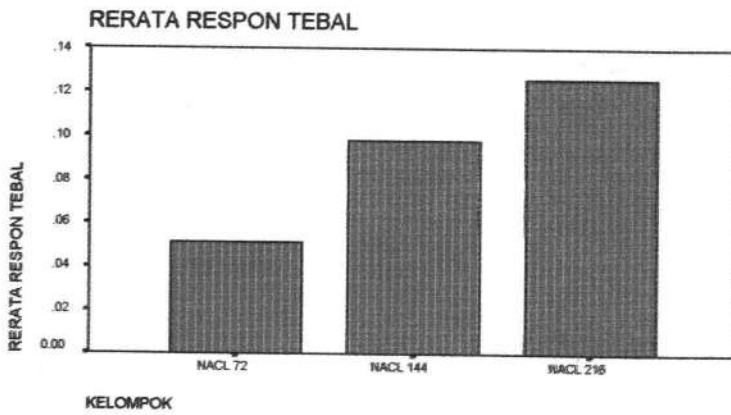


Lampiran 19 Profile Plots

RESPON KEPADATAN



RESPON KETEBALAN



RESPON KEKUATAN

