

**SKRIPSI**

**KADAR ALKALIN FOSFATASE SERUM DARAH TIKUS  
PUTIH (*Rattus norvegicus*) OVARIOHISTEREKTOMI  
DENGAN DIET KALSIMUM BERTINGKAT**



Oleh :

**DANANG BUDI YULIARSO**  
**PROBOLINGGO – JAWA TIMUR**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**  
**UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
**SURABAYA**  
**2005**

**KADAR ALKALIN FOSFATASE SERUM DARAH TIKUS  
PUTIH (*Rattus norvegicus*) OVARIOHISTEREKTOMI  
DENGAN DIET KALSIMUM BERTINGKAT**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh :

**DANANG BUDI YULIARSO**

**NIM. 060012733**

**Menyetujui,  
Komisi Pembimbing**



---

**Soetji Prawesthirini., S.U., drh  
Dosen Pembimbing Pertama**



---

**Hermin Ratnani., M.Kes., drh  
Dosen Pembimbing Kedua**

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar **SARJANA KEDOKTERAN HEWAN**.

Menyetujui  
Komisi Penguji,



Soepartono Partosoewignjo, M.S., drh  
Ketua



Tri Nurhajati, M.S., drh  
Sekretaris



Dr. Pudji Srianto, M.Kes., drh  
Anggota



Hermin Ratnani, M.Kes., drh  
Anggota



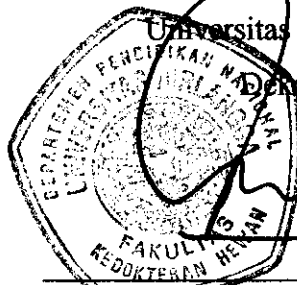
Soetji Prawesthirini, S.U., drh  
Anggota

Surabaya, 27 April 2005

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Deban,



Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh  
NIP. 130687297

# **KADAR ALKALIN FOSFATASE SERUM DARAH TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) OVARIOHISTEREKTOMI DENGAN DIET KALSIMUM BERTINGKAT**

**Danang Budi Yuliarso**

## **ABSTRAK**

Pemeriksaan alkalin fosfatase biasanya dilakukan sebagai uji lanjutan yang menunjukkan terjadinya kerusakan pada tulang dan kelainan pada hati. Alkalin fosfatase timbul ketika kalsium diendapkan dalam tulang. Sebagian alkalin fosfatase dapat menjadi indikator yang baik tentang tingkat pembentukan tulang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim alkalin fosfatase dalam mineralisasi pada tulang tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariohisterektomi yang diberi suplemen kalsium bertingkat.

Sejumlah 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina berumur dua bulan diovariohisterektomi dan dua minggu setelahnya diberi suplemen kalsium 75 mg, 225 mg, 450 mg dan tanpa diberi suplemen kalsium sebagai kontrol. Selama perlakuan, tikus ditempatkan di kandang individu. Desain percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap yang terbagi menjadi tiga perlakuan dan satu kontrol dengan ulangan sebanyak lima kali. Data dianalisis dengan sidik ragam yang dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil apabila terdapat perbedaan yang nyata.

Suplemen kalsium menggunakan kalsium karbonat dan diberikan per oral dengan menggunakan *feeding tube* dengan pengenceran 0,1-0,2 ml. Pengambilan sampel serum darah dilakukan pada akhir penelitian sebanyak 0,3 ml.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan pemberian suplemen kalsium 225 mg dapat meningkatkan kadar enzim alkalin fosfatase serum darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariohisterektomi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Atas Berkat rahmat Allah Yang Maha Kuasa, Alhamdulillah penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul **Kadar Alkalin Fosfatase Serum Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariohisterektomi dengan Diet Kalsium Bertingkat**. Sebagai salah satu persyaratan akademis untuk mendapatkan gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.

Dengan selesainya skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
2. Ibu Soetji Prawesthirini., S.U., drh. selaku dosen pembimbing pertama dan Ibu Hermin Ratnani., M.Kes., drh. selaku dosen pembimbing kedua, atas saran dan bimbingannya selama ini.
3. Ibu Ira Sari Yudaniayanti., M.P., drh. atas ide, masukan, dan sarannya sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan.
4. Kepala dan staf Unit Hewan Coba Lab. Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas bimbingan dan izin untuk menggunakan fasilitas laboratorium selama penelitian.
5. Pimpinan dan staf Laboratorium Kesehatan Daerah Surabaya atas izin dan bantuan dalam pengujian sampel.

6. Almarhumah Ibunda tercinta, Bapak, dan Mas Kelik, terima kasih atas bantuan dan perhatian terindah yang diberikan selama ini.
7. Elska, terima kasih atas dukungan, bantuan, dan semangat serta kasih sayang dan perhatiannya selama ini.
8. Rekan-rekan seperjuangan Indra, Setiawan, Yatmi, Mamat, Kamto, Wahyu, Sigit, Jaedi, Esti, Ika, Rahmi, Eva, Novi, Arfi, Agung, Wawan, dan semua yang tidak mungkin saya sebutkan satu persatu.
9. Bapak dan Ibu kos, Chakim, Chete, Agus, Yudi, Iqbal, Ari, Zain, Dian, Pak Bos, Agung, Taufik, Erwin, Anis, dan teman-teman semuanya yang secara tidak langsung telah memberikan semangat dan dorongan untuk penyelesaian penulisan ini.
10. Semua pihak yang tidak mungkin saya sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan Skripsi ini, oleh karena itu penulis mengharap kritik dan saran untuk kesempurnaan skripsi ini, semoga skripsi ini dapat berguna untuk kemajuan ilmu pengetahuan.

Akhir kata penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya.

Surabaya, April 2005

Penulis

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
ABSTRAK .....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH .....	v
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR LAMPIRAN .....	xi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Landasan Teori .....	4
1.4 Tujuan Penelitian .....	6
1.5 Manfaat Penelitian .....	6
1.6 Hipotesis Penelitian .....	6

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1	Kalsium .....	7
2.1.1	Sumber, Fungsi, dan Penggunaan .....	7
2.1.2	Absorpsi dan Metabolisme .....	8
2.1.3	Resorpsi Kalsium Tulang .....	11
2.1.4	Kalsium Karbonat .....	13
2.2	Osteoporosis .....	14
2.3	Estrogen .....	16
2.4	Alkalin Fofatase .....	18
2.5	Tikus .....	19

## BAB III MATERI DAN METODE

3.1	Tempat dan Waktu Penelitian .....	21
3.2	Bahan dan Materi Penelitian .....	21
3.3	Metode Penelitian .....	22
3.3.1	Adaptasi Hewan Percobaan .....	22
3.3.2	Operasi Ovariohisterektomi .....	22
3.3.3	Perlakuan Suplementasi Kalsium .....	25
3.3.4	Tahap Pemeriksaan .....	25
3.4	Rancangan Penelitian .....	26
3.5	Peubah yang diamati .....	27
3.6	Analisis Data .....	27



BAB IV HASIL PENELITIAN .....	28
BAB V PEMBAHASAN .....	30
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1 Kesimpulan .....	35
6.2 Saran .....	35
RINGKASAN .....	36
DAFTAR PUSTAKA .....	38
LAMPIRAN .....	43

## DAFTAR TABEL

1. Rata-rata dan standard deviasi alkalin fosfatase serum darah (U/L) tikus pada akhir penelitian .....	28
2. Analisis pakan jenis Bur 1 PT Guyofeed Surabaya .....	44

## DAFTAR LAMPIRAN

1. Analisis varian tabel F pola RAL (5 ulangan) pada kadar alkalin fosfatase serum darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariohisterektomi dengan pemberian kalsium bertingkat ..... 43
2. Susunan kandungan pakan standar yang diberikan pada tikus percobaan..... 44

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Penelitian

Alkalin fosfatase adalah enzim yang terdapat pada semua jaringan. Jaringan yang mengandung Alkalin fosfatase konsentrasi tinggi meliputi hati, empedu, dan tulang. Kerusakan atau penyakit pada jaringan tersebut dapat melepaskan enzim dalam darah, jadi kadar serum alkalin fosfatase dapat meningkat dalam berbagai kondisi, termasuk kerusakan pada tulang dan penyakit hati. Pemeriksaan alkalin fosfatase biasanya dilakukan sebagai uji lanjutan yang menunjukkan terjadinya kerusakan pada tulang dan kelainan pada hati.

Alkalin fosfatase timbul ketika kalsium diendapkan dalam tulang (Kathleen-Mahan dan Escott-Stump, 2000). Osteoblas yang sedang aktif menghasilkan jaringan osteoid, mensekresikan sejumlah besar alkalin fosfatase, yang memegang peranan penting dalam mengendapkan kalsium dan fosfat ke dalam matriks tulang (Carter, 1992). Sebagian alkalin fosfatase di dalam darah dapat menjadi indikator yang baik tentang tingkat pembentukan tulang.

Suplemen kalsium dan susu berkalsium tinggi yang dijumpai di pasaran banyak dikonsumsi oleh masyarakat untuk membantu mempercepat proses pertumbuhan tulang pada usia muda dan mencegah terjadinya osteoporosis atau pengeroposan tulang pada usia dewasa. Suplemen kalsium juga sering diberikan sebagai terapi pada hewan, terutama pada hewan yang mengalami hipokalsemia (Mudjabar, 2003).

Banyak jenis suplemen kalsium yang tersedia di pasaran, seperti Kalsium Karbonat (40% Ca), Kalsium Glukonat (9,3% Ca), Kalsium Laktat (13% Ca), dan Kalsium Asetat (25% Ca), Kalsium Karbonat paling banyak digunakan karena mempunyai kadar kalsium tinggi, mudah diserap tubuh dan harganya yang murah, sehingga dalam penggunaannya hanya membutuhkan dosis yang kecil dan lebih ekonomis (Monroe, 1994).

Osteoporosis, atau pengeroposan tulang dengan manifestasi berkurangnya kepadatan massa tulang merupakan masalah pada proses penuaan (*aging process*), terutama pada wanita (Moelock, 1995). Osteoporosis pada umumnya terjadi pada wanita saat menopause karena wanita memiliki massa tulang yang lebih rendah dan lebih cepat terjadi pengeroposan tulang yang berkaitan dengan menurunnya kadar estrogen (Garrow *et al.*, 2000). Pada wanita menopause terjadi defisiensi estrogen yang merupakan hormon penghambat kerja sel osteoklas. Estrogen yang berkurang mengakibatkan pertumbuhan sel osteoklas tidak terkendali, sehingga keseimbangan formulasi dan resorpsi tulang terganggu (Hidayati, 2001).

Proses pengeroposan tulang dapat didukung oleh kondisi nutrisi pakan yang kurang, atau tidak sesuai dengan kebutuhan. Perbandingan Ca dan P dalam pakan yang normal adalah 1,5:1. Metabolisme kalsium dalam tubuh dipengaruhi oleh jumlah yang dikonsumsi, ratio Ca:P yang dikonsumsi, juga oleh kemampuan usus untuk menyerap kalsium yang terdapat dalam makanan. Metabolisme kalsium juga dipengaruhi oleh status vitamin D, androgen, dan estrogen (Linder, 1992). Manifestasi klinik dari proses pengeroposan tulang ini meliputi kadar kalsium yang

rendah, penurunan kadar fosfat, peningkatan kadar alkalin fosfatase dan penurunan absorpsi kalsium (Garrow *et al.*, 2000).

Mengingat efek yang diakibatkan oleh osteoporosis maka perlu dilakukan pencegahan sehingga tingkat kejadian osteoporosis bisa ditekan. Pemberian diet yang mengandung kalsium tinggi menjadi salah satu alternatif dalam pencegahan maupun terapi osteoporosis, sehingga hal tersebut banyak dilakukan pada individu yang mempunyai risiko terkena gangguan tulang, misalnya pada wanita menopause. Mereka berharap dengan pemberian kalsium melalui makanan dapat menekan terjadinya kerapuhan tulang. Sejauh ini belum diketahui tingkat efektivitas pemberian kalsium tinggi pada wanita menopause terhadap kejadian osteoporosis. Menurut Garrow *et al.* (2000), efek keuntungan dari tambahan kalsium pada tulang tidak begitu penting dan kalsium tidak dapat mencegah terjadinya pengeroposan tulang (osteoporosis) pada 10 tahun pertama menopause. Konsumsi suplemen kalsium, baik dalam bentuk susu berkalsium tinggi maupun tablet, tidak mungkin memulihkan kondisi tulang penderita osteoporosis (pengeroposan tulang) seperti kondisi ketika masih sehat (Anonimus<sup>e</sup>, 2004).

Wanita pada saat menopause mengalami penurunan kadar estrogen, sedangkan estrogen berkaitan erat dengan penyerapan kalsium. Perlu dilakukan penelitian mengenai efektivitas pemberian suplemen kalsium pada wanita menopause. Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus yang telah diovariohisterektomi sebagai pengkondisian yang serupa dengan wanita saat menopause. Pengangkatan ovarium dapat mempengaruhi produksi estrogen sehingga kadar estrogen tubuh

menurun. Penggunaan hewan coba ini diharapkan dapat mengetahui manfaat pemberian diet kalsium tinggi dengan mendapatkan kadar alkalin fosfatase serum darah yang menunjukkan tingkat mineralisasi pada tulang.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai pedoman untuk penyusunan komposisi nutrisi dalam pakan yang benar, dengan demikian gangguan-gangguan yang ditimbulkan oleh ketidakseimbangan kalsium dan fosfor dapat dihindarkan.

## **1.2 Perumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas dapat dirumuskan masalah yaitu Apakah terdapat perbedaan kadar alkalin fosfatase serum darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariohisterektomi yang diberi suplemen kalsium bertingkat?

## **1.3 Landasan Teori**

Sterilisasi hewan betina (ovariohisterektomi) dalam dunia kedokteran hewan sering dilakukan, khususnya pada anjing maupun kucing dengan tujuan selain untuk membatasi jumlah anak, juga untuk tujuan penanganan klinik misalnya pada kasus piometra, endometritis dan sebagainya (Slatter, 1994). Efek yang timbul akibat dilakukan ovariohisterektomi adalah penurunan kadar estrogen, sehingga dapat mengakibatkan peningkatan resorpsi kalsium tulang dan pada akhirnya akan terjadi kerapuhan tulang (osteoporosis). Hal tersebut dapat terjadi karena estrogen



mempunyai peranan sebagai inhibitor yang kuat pada resorpsi tulang (Raisz dan Johannessons, 1984)

Pada osteoporosis perbandingan mineral kalsium dan fosfor pada tulang tidak seimbang. Kalsium tulang menjadi rendah karena proses resorpsi yang berlebihan. Gangguan keseimbangan mineral juga dapat dikarenakan rendahnya kandungan mineral dalam pakan, kesalahan imbang  $Ca:P$  ataupun hal-hal lain yang menyebabkan rendahnya absorpsi mineral oleh tubuh. Perubahan status asam basa darah yang menuju ke arah asam juga mempengaruhi terjadinya peningkatan resorpsi kalsium tulang dan pembuangan mineral kalsium melalui urin (Scott *et al*, 1993).

Peranan enzim alkalin fosfatase dalam mineralisasi adalah mempersiapkan suasana alkalis atau basa pada jaringan osteoit yang terbentuk, supaya kalsium dapat dengan mudah terdeposit pada jaringan tersebut. Enzim alkalin fosfatase di dalam tulang menyebabkan meningkatnya konsentrasi fosfat, sehingga terbentuklah ikatan kalsium-fosfat dalam bentuk kristal hidroksiapatit dan berdasarkan hukum massa (*law of mass action*) kristal tersebut pada akhirnya akan mengendap di dalam tulang (Djojosoebago, 1990).

Newton dan Nunamaker (1985) menyatakan, sekresi alkalin fosfatase akan menurun jika mineralisasi jaringan osteoit sudah selesai. Enzim fosfatase lebih banyak berperan pada saat pembentukan matriks tulang dan akan menurun aktivitasnya ketika sudah terjadi mineralisasi matriks tulang tersebut.

#### **1.4 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui perbedaan kadar alkalin fosfatase serum darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariohisterektomi yang diberi suplemen kalsium bertingkat.

#### **1.5 Manfaat Hasil Penelitian**

Informasi dari hasil penelitian ini diharapkan dapat melengkapi penelitian yang sudah ada dan nantinya dapat digunakan sebagai sumber informasi ilmu pengetahuan baik di dunia kedokteran hewan atau mungkin dapat dikembangkan untuk penerapan pada manusia sebagai pedoman untuk penyusunan nutrisi yang benar sehingga pengeroposan tulang akibat salah pakan dapat dicegah.

#### **1.6 Hipotesis Penelitian**

Terjadi perbedaan kadar alkalin fosfatase serum darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariohisterektomi yang diberi suplemen kalsium bertingkat.

## **BAB II**

# **TINJAUAN PUSTAKA**

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Kalsium**

##### **2.1.1 Sumber, Fungsi dan Penggunaan**

Kalsium bisa diperoleh dari sayuran hijau seperti daun Lamtoro, daun Kelor, Bayam Merah, Bayam Hijau, daun Talas, dan daun Melinjo. Selain itu kalsium juga terdapat pada buah-buahan, Brokoli, Tempe, Tahu, Susu, Udang, dan Teri (Surono, 1999). Kadar kalsium sangat tinggi terdapat dalam air susu dan produk-produknya, termasuk keju, dan cukup tinggi dalam kacang dan biji-bijian (Linder, 1992).

Djojosoebagio (1990), menyatakan bahwa unsur anorganik yang paling penting di dalam tubuh dan dalam jumlah terbanyak adalah kalsium. Kalsium memegang peranan kunci di dalam berbagai macam proses dalam tubuh seperti kontraksi otot, eksitabilitas syaraf, dan pembebasan hormon (Garrow *et al.*, 2000). Kalsium dalam bentuk ion diperlukan untuk mengatur sejumlah proses fisiologis dan biokimia penting terutama keikutsertaannya dalam pembentukan tulang dan gigi, eksitabilitas neuromuskuler, kontraksi otot, pembekuan darah, proses sekresi, integritas membran dan transpor membran plasma, reaksi enzim, pelepasan hormon dan neurotransmitter, perkembangan fetus dalam fase kehamilan, mempertahankan mekanisme tubuli ginjal dalam proses mempertahankan kadar zat-zat agar tetap normal, dan aksi intrasel

sejumlah hormon (Smith *et al.*, 1983; Coles, 1986; Lewis *et al.*, 1990; Cunningham, 1992).

Di Indonesia, biasanya pada anjing, kuda, kambing terjadi kekurangan jumlah kalsium dalam perbandingan pakannya yang mengakibatkan kebutuhan kalsium setiap hari tidak tercukupi sehingga bisa menimbulkan gangguan pada hewan itu, yakni rakhitis dan osteomalasia (Ressang, 1984), tetapi bila jumlah kalsium dalam pakan berlebihan akan mengakibatkan gangguan berupa penurunan fungsi dari tiroid, terjadi defisiensi P, Zn, Fe, dan Cu (Lewis *et al.*, 1983). Pemberian pakan yang mengandung kalsium rendah dapat menimbulkan hipokalsemia (Coles, 1986; Linder, 1992).

### **2.1.2 Absorpsi dan Metabolisme**

Djojosoebagio (1990), mengemukakan bahwa absorpsi kalsium akan meningkat apabila kadar kalsium usus meningkat. Penyerapan kalsium oleh usus halus sangat terbatas kurang lebih 30 % sampai 80 % dari yang dikonsumsi dan pada umumnya disesuaikan dengan kebutuhan tubuh. Kalsium yang tidak diserap tersebut sebagian besar akan di ekskresikan lewat feses dan hanya sebagian kecil lewat urin (Linder, 1992). Penyerapan kalsium terjadi terutama di usus halus bagian proksimal dan menurun pada bagian usus yang lebih distal (Lewis *et al.*, 1990).

Absorpsi kalsium dalam usus halus dikerjakan dengan transpor aktif maupun transpor pasif (Smith *et al.*, 1983; Coles, 1986; Lewis *et al.*, 1990; Cunningham,

1992). Pada tikus, manusia, dan sebagian hewan lainnya, kalsium diabsorpsi dengan cara transpor aktif (Church dan Pond, 1998). Untuk transpor aktif, kalsium bergerak dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi. Proses ini membutuhkan energi, vitamin D, dan derivatnya. Transpor pasif yaitu apabila kalsium diabsorpsi secara difusi (Tilman *et al.*, 1998).

Sistem homeostasis dikendalikan langsung oleh hormon paratiroid (PTH), kalsitriol (1,25-DHCC), dan kalsitonin (CT) (Garrow *et al.*, 2000). Mekanisme transpor aktif diatur oleh 1,25-dehidroksikolekalsiferol (1,25-DHCC), suatu bentuk vitamin D paling aktif yang diproduksi dalam ginjal (Smith *et al.*, 1983; Tilman *et al.*, 1983; Djojosoebagio, 1990). Transpor aktif diatur dengan tujuan untuk memenuhi kebutuhan kalsium tubuh yang meningkat, misalnya pada periode pertumbuhan, kehamilan, laktasi atau pada saat diet rendah kalsium (Olson *et al.*, 1988). Dehidroksikolekalsiferol (1,25-DHCC) menyebabkan terbentuknya protein pengikat kalsium di dalam sel-sel epitel usus. Protein tersebut berfungsi mengangkut kalsium ke dalam sitoplasma sel, selanjutnya kalsium bergerak melewati membran basolateral sel dengan cara difusi. Protein pengikat kalsium tetap di dalam sel selama beberapa minggu sesudah dehidroksikolekalsiferol dikeluarkan dari tubuh sehingga memperpanjang waktu absorpsi kalsium (Guyton dan Hall, 1996).

Paratiroid hormon merangsang pembentukan 1,25-DHCC, suatu bentuk aktif suatu vitamin D, melalui proses hidroklisasi 25 HCC pada posisi I sehingga terbentuk 1,25-DHCC dan metabolik vitamin D yang lain (Smith *et al.*, 1983; Capen, 1993;

Duncan, 1997) Peranan 1,25-DHCC adalah meningkatkan penyerapan kalsium dari usus kecil (Smith *et al.*, 1983; Jee, 1983; Capen, 1993; Duncan dan Prasse, 1997). 1,25 dehidrokolekalsiferol akan meningkatkan mineralisasi tulang yang baru terbentuk dengan meningkatkan suplai kalsium yang cukup. 1,25 dehidrokolekalsiferol juga secara langsung akan merangsang proses resorpsi tulang dengan bekerja secara sinergis dengan hormon paratiroid untuk meningkatkan jumlah maupun diferensiasi osteoklas, sedangkan kalsitonin akan menghambat aktivitas osteoklas yang berakibat penurunan resorpsi kalsium tulang (Smith *et al.*, 1983). Berdasarkan penelitian lebih lanjut juga diketahui bahwa hormon estrogen berperan dalam penekanan proses resorpsi tulang (Anonimus<sup>c</sup>, 2004).

Kalsium di dalam usus akan ditransfer ke dalam pembuluh darah dalam bentuk ion. Kalsium di dalam darah terbagi menjadi tiga bentuk, yaitu kalsium yang terikat dengan protein (*protein bound calcium* atau *non diffusible Ca*) di mana dalam keadaan ini kalsium berikatan dengan albumin dan sebagian kecil berikatan dengan globulin, dalam bentuk ion  $Ca^{++}$ , kalsium kompleks yang berikatan dengan fosfor, bikarbonat, dan sitrat (Djojoesoebagio, 1990; Lewis *et al.*, 1990). Kadar kalsium dalam plasma normal berkisar antara 9,2 sampai 10,4 mg/dl (Bullock dan Rosendhal, 1984).

Sejumlah besar kalsium difiltrasi di dalam ginjal, 98% - 99% dari jumlah kalsium yang difiltrasi akan diabsorpsi kembali (Smith *et al.*, 1983; Cunningham, 1992). Kalsium di ekskresikan dari tubuh melalui beragam jalur. Jalur-jalur

pengeluaran kalsium itu adalah melalui feses, urin, plasenta selama kehamilan untuk membantu pertumbuhan fetus, air susu, dan kulit (Djojoesoebagio, 1990). Jumlah kalsium yang di ekskresikan tergantung pada konsentrasi ion kalsium dalam plasma. Ekskresi kalsium lewat feses maupun urin menurun apabila terjadi hipokalsemia (Smith *et al.*, 1983; Cunningham, 1992). Ekskresi kalsium melalui urin terjadi dengan suatu mekanisme resorpsi kalsium oleh ginjal (Djojoesoebagio, 1992). Secara normal ginjal mengekskresikan 150 mg kalsium setiap hari yaitu sekitar 1% dari jumlah yang difiltrasi lewat glomerulus (Smith *et al.*, 1983; Cunningham, 1992).

### **2.1.3 Resorpsi Kalsium Tulang**

Tulang merupakan organ yang penting karena berfungsi sebagai penyangga tubuh. Tulang menjadi keras dan kuat karena mengandung kalsium, mineral, dan protein yang membentuk suatu kristal kalsium fosfat yang mengeras (Stevenson dan Marsh, 1992). Tulang juga berfungsi sebagai cadangan kalsium, fosfat, dan ion lain yang dapat dibebaskan atau ditimbun secara terkendali untuk mempertahankan konsentrasi ion-ion tersebut tetap dalam cairan tubuh (Junqueira dan Carneiro, 1992). Menurut Wijaya (1994), tulang terdiri atas tiga komponen utama yaitu mineral (kalsium dan fosfor), matriks organik (disebut osteoid yang terdiri atas kolagen dan campuran dari proteoglikan dan senyawa dengan berat molekul tinggi seperti protein dan karbohidrat), dan sel-sel tulang (komponen yang terlibat dalam pembentukan dan resorpsi tulang yaitu osteoblas, osteoklas, dan osteoid).



Osteoblas adalah sel-sel pembentuk tulang, mereka mensekresikan prokolagen dan komponen matriks organik lainnya. Osteoblas berasal dari sumsum tulang dan bertanggung jawab terhadap deposisi matriks eksternal dan mineralisasi (Trevor *et al.*, 1992). Selain itu osteoblas juga menyimpan mineral yang akan digunakan dalam proses mineralisasi (Banks, 1993). Osteosit merupakan osteoblas dewasa, berfungsi mengontrol mineralisasi lokal dan pertukaran mineral antara tulang dan plasma. Enzim lisosom osteosit dapat membantu mempertahankan kandungan mineral dalam matriks (Dellmann dan Brown, 1989). Osteoklas adalah sel-sel besar berinti banyak yang memungkinkan mineral dan matriks tulang dapat diabsorpsi. Tidak seperti osteoblas dan osteosit, osteoklas mengikis tulang. Sel-sel ini menghasilkan enzim-enzim proteolitik yang memecahkan matriks dan beberapa asam yang melarutkan mineral tulang, sehingga kalsium dan fosfat terlepas ke dalam aliran darah (Carter, 1992).

Rangka tubuh mengandung 99% kalsium total tubuh dan bertindak sebagai suatu cadangan kalsium. Setiap menit 25% dari semua atom kalsium yang berasal dari darah akan digantikan oleh atom kalsium tulang. Terjadi pertukaran yang terus menerus antara kalsium darah dan kalsium tulang. Kalsium di dalam tulang akan dimobilisasikan bila konsentrasi kalsium darah berkurang. Mobilisasi kalsium ini dilakukan dengan memakai efek hormon PTH terhadap tulang (Junqueira dan Carneiro, 1992).

Hormon paratiroid diekskresikan oleh kelenjar paratiroid apabila kadar kalsium darah rendah. Dalam rangka mengembalikan kadar kalsium darah ke batas normal, hormon paratiroid bekerja secara langsung pada tulang dan ginjal serta bekerja tidak langsung pada usus (Banks, 1993). Stimulasi paratiroid pada jaringan tulang akan menyebabkan terjadinya peningkatan permeabilitas osteoklas, osteoblas, dan osteosit terhadap kalsium yang berada di dalam cairan tulang. Aksi paratiroid pada ginjal meliputi peningkatan reabsorpsi ion kalsium dari tubulus kontortus distalis dan penghambatan reabsorpsi ion fosfat dari tubulus kontortus proksimalis maupun distalis (Banks, 1993).

Kalsium bisa diperoleh dari metabolisme kalsium dan metabolisme tulang berkaitan erat satu sama lain. Metabolisme kalsium diatur melalui kerja hormon paratiroid (PTH), 1,25 dehidroksikolekalsiferol dan kalsitonin. Metabolisme kalsium oleh usus halus dan ginjal berfungsi untuk menjaga kalsium serum agar tetap normal, sedangkan metabolisme kalsium oleh tulang selain untuk menjaga agar kalsium serum tetap normal, juga untuk menjaga masa tulang agar menjadi kerangka tubuh yang memadai (Raisz dan Johannessons, 1984).

#### **2.1.4 Kalsium Karbonat**

Suplemen kalsium yang terutama adalah Kapur (34% Ca) dan kulit Kerang (45%) (Tilman *et al.*, 1983). Suplemen kalsium per oral dapat diberikan dalam bentuk Karbonat (40% Ca), Glukonat (9,3% Ca), Sitrat (21% Ca), Fosfat (8% Ca),

dan Laktat (13% Ca) (Monroe, 1994; Anonimus<sup>d</sup>, 2004). Kalsium Karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) adalah salah satu bentuk suplemen kalsium yang banyak digunakan karena mempunyai kadar kalsium yang tinggi (40%), mudah diserap, murah harganya, dan mempunyai kemampuan mengikat fosfor, sehingga penggunaannya sering ditujukan untuk mencegah terjadinya hiperfosfatemia (Monroe, 1994; Anonimus<sup>d</sup>, 2004). Penelitian yang dilakukan oleh Heaney *et al.* yang dikutip oleh Surono (1999) menunjukkan bahwa Kalsium Karbonat diabsorpsi dengan baik ketika dicerna bersama makanan. Tikus dewasa membutuhkan kalsium 75 mg per hari (Talbot *et al.*, 1998)

Kalsium Karbonat cukup baik diabsorpsi bila lambung terisi makanan, sebaliknya Kalsium Sitrat dapat diabsorpsi dengan baik pada individu dalam kondisi puasa atau lambung dalam keadaan kosong (Nicar *et al.*, 1985). Pendapat yang sama dikemukakan oleh Garcia-Lopez dan Miller (1991), bahwa bioavailabilitas dari Kalsium Karbonat, Kalsium Sitrat, dan Trikalsium Fosfat tidak menunjukkan perbedaan yang berarti. Keuntungan lain memakai Kalsium Karbonat cukup baik diabsorpsi bila kondisi lambung terisi makanan (Nicar *et al.*, 1985) dan juga tidak menyebabkan kembung seperti pada Kalsium Sitrat.

## 2.2 Osteoporosis

Osteoporosis merupakan suatu perubahan yang terjadi pada tulang sebagai akibat pengurangan massa tulang mineral tulang maupun matriks tulang, atau tanpa

ada pengurangan elemen organik tulang sehingga kepadatan tulang berkurang atau tulang menjadi keropos (Bullock dan Rosendahl, 1984). Pada wanita menopause, terjadi defisiensi estrogen yang merupakan hormon penghambat kerja sel osteoklas. Estrogen yang berkurang mengakibatkan pertumbuhan sel osteoklas tidak terkendali sehingga keseimbangan formulasi tulang terganggu (Anonimus, 2002; Anonimus<sup>a</sup>, 2004).

Bagian dalam dari tulang berperan sebagai timbunan mineral-mineral yang dinamis, terutama kalsium dan fosfor. Mineral-mineral tersebut ditimbun dan dikeluarkan lagi bila dibutuhkan dalam proses homeokinetis (Fradson, 1992). Garrow *et al.* (2000) menyatakan bahwa tulang merupakan organ yang dinamis, yang selalu berubah, dan mengalami pembaruan. Proses pembaruan meliputi proses resorpsi (penyerapan), formasi (pembentukan) yang terjadi di tempat resorpsi, sehingga bagian tersebut diganti dengan tulang yang baru. Proses ini selalu berimbang yang disebut dengan proses *remodelling*. Pada osteoporosis, proses resorpsi terjadi berlebihan dan ini terjadi karena komposisi zat penyusun tulang sudah tidak bagus lagi, misalnya kekurangan kalsium. Akibatnya, tulang jadi lemah, relatif lebih tipis, dan rapuh (Raisz dan Johannessons, 1984; Anonimus<sup>c</sup>, 2004).

Faktor penyebab osteoporosis adalah adanya gangguan pada metabolisme tulang. Metabolisme tulang dapat terganggu oleh berbagai kondisi, yaitu berkurangnya hormon estrogen, berkurangnya asupan kalsium dan vitamin D,

berkurangnya stimulasi mekanis pada tulang, efek samping beberapa jenis obat, alkohol, merokok, dan sebagainya (Anonimus, 2003).

Menurut Linder (1992) osteoporosis dapat disebabkan karena ketidakseimbangan antara pemasukan kalsium dan fosfor, yang menimbulkan ketidakseimbangan perbandingan kalsium dan fosfor dalam tubuh. Makanan yang mempunyai perbandingan kalsium-fosfor kurang, dapat menyebabkan meningkatnya sekresi hormon paratiroid (PTH), yang selanjutnya menyebabkan resorpsi kalsium tulang. Hormon paratiroid diekskresikan oleh kelenjar paratiroid apabila kadar kalsium darah rendah (Banks, 1993; Duncan dan Prasse, 1997). Dalam rangka mengembalikan kalsium darah ke batas normal, paratiroid bekerja secara langsung pada tulang dan ginjal dan bekerja tidak langsung pada usus. Aksi paratiroid pada tulang meningkatkan laju pelarutan tulang ke dalam aliran ekstraseluler sehingga meningkatkan kadar kalsium dalam cairan ekstraseluler. (Dellman dan Brown, 1989; Banks, 1993; Capen, 1993). Akibat aksi ini pada tulang tersebut menyebabkan osteoklas menjadi lebih aktif menyerap bagian tulang yang mengalami mineralisasi, untuk melepaskan kalsium tulang, fosfat, dan unsur matriks organik lainnya (Bullock dan Rosendahl, 1984).

### **2.3 Estrogen**

Pada wanita menopause di mana kadar estrogen menurun menjadikan risiko terkena osteoporosis menjadi meningkat. Hal tersebut dapat terjadi karena estrogen

mempunyai peranan sebagai inhibitor yang kuat pada proses resorpsi tulang. Estrogen disekresikan oleh sel theca interna folikel, korteks adrenal dan plasenta pada hewan betina, sedangkan hewan jantan estrogen disintesis dan dibebaskan oleh testes dan korteks adrenal. Jalan biosintesis estrogen meliputi pembentukan dari androgen. Sel-sel granulosa juga menghasilkan estrogen, dan tidak seperti estrogen dari sel techa interna. Jaringan stroma ovarium juga mempunyai potensi untuk membentuk androgen dan estrogen (Ganong, 1995).

Estrogen pada hewan betina mempunyai pengaruh terhadap tingkah laku seksual, metabolisme tubuh, pertumbuhan tulang, dan estrogen menyebabkan kulit lebih halus, juga menyebabkan pergerakan rambut getar tuba falopii. Estrogen menyebabkan pertumbuhan sifat-sifat sekunder pada hewan betina. Hormon ini secara kimia dan potensinya dibagi menjadi: Estroal, Estriol, Estradiol  $17\alpha$  dan Estradiol  $17\beta$  (Partodiharjo, 1992; Hardjopranjoto, 1995)

Estrogen berperan penting sebagai inhibitor dalam resorpsi tulang. Adanya estrogen dapat meningkatkan produksi kalsitonin dan menurunkan sekresi hormon paratiroid. Di samping itu adanya estrogen juga dapat meningkatkan kadar  $1,25$  dihidroksikolekalsiferol dan mengubah faktor lain yang mengatur metabolisme tulang, seperti prostaglandin dan faktor yang mengaktivasi osteoklas. Penelitian lebih lanjut diketahui bahwa hormon estrogen berperan dalam penekanan proses resorpsi tulang (Anonimus<sup>o</sup>, 2004).

Penurunan kadar estrogen sering terjadi pada wanita pascamenopause dan hewan-hewan yang diovariohisterektomi, yang mengakibatkan terjadinya kerapuhan tulang (osteoporosis). Sterilisasi hewan betina (ovariohisterektomi) dalam dunia kedokteran hewan sering dilakukan, khususnya pada anjing maupun kucing dengan tujuan selain untuk membatasi jumlah anak, juga untuk tujuan penanganan medis misalnya pada kasus piometra, endometritis, dan sebagainya (Slatter, 1994). Efek yang timbul akibat dilakukan ovariohisterektomi adalah penurunan kadar estrogen, sehingga dapat mengakibatkan peningkatan resorpsi kalsium tulang dan pada akhirnya akan terjadi kerapuhan tulang (osteoporosis). Hal tersebut dapat terjadi karena estrogen mempunyai peranan sebagai inhibitor yang kuat pada resorpsi tulang (Raisz dan Johannessons, 1984)

#### **2.4 Alkalin Fosfatase**

Alkalin fosfatase adalah salah satu dari enzim fosfatase yang dapat menghidrolisis monofosforik ester dengan membebaskan ion organik fosfat. Alkalin fosfatase bekerja optimal pada kisaran pH 8,5 – 9,5 dan diaktifkan oleh ion Mg. Alkalin fosfatase terdapat pada semua jaringan tubuh (mukosa usus, ginjal, dan empedu). Alkalin fosfatase timbul ketika kalsium diserap dalam tulang (Kathleen-Mahan dan Escott-Stump, 2000).

Osteoblas yang sedang aktif menghasilkan jaringan osteoid, mensekresikan sejumlah besar alkalin fosfatase, yang memegang peranan penting dalam

mengendapkan kalsium dan fosfat ke dalam matriks tulang (Carter, 1992; Anonimus<sup>b</sup>, 2004). Sebagian alkaline fosfatase di dalam darah dapat menjadi indikator yang baik tentang tingkat pembentukan tulang.

Menurut Djojosoebagio (1990) yang dikutip oleh Yudaniyanti (2003) peranan enzim alkaline fosfatase dalam proses mineralisasi adalah bahwa enzim ini mempersiapkan suasana alkalis (basa) pada jaringan osteoid yang terbentuk, supaya kalsium dapat dengan mudah terdeposit pada jaringan tersebut. Selain itu di dalam tulang, enzim ini menyebabkan meningkatnya konsentrasi fosfat, sehingga terbentuklah ikatan kalsium fosfat dalam bentuk kristal hidroksiapatit dan berdasarkan hukum masa (*law of mass action*) kristal tersebut pada akhirnya akan mengendap di dalam tulang.

Garrow *et al.* (2000), menyatakan bahwa proses mineralisasi tulang berkaitan dan ditunjang dengan keberadaan alkaline fosfatase. Enzim ini dapat menurunkan pirofosfatase (enzim yang menghambat mineralisasi) dan meningkatkan konsentrasi ion organik fosfat yang mendukung mineralisasi.

## 2.4 Tikus

Tikus memiliki ukuran tubuh yang lebih besar dari mencit, karena itu tikus lebih disukai untuk berbagai penelitian. Berbeda dengan hewan laboratorium lainnya, tikus tidak pernah muntah, disamping itu tikus tidak memiliki kelenjar empedu. Pada umur dua bulan berat badan tikus dapat mencapai 200-300 gram. Tikus tergolong hewan



yang mudah dipegang dibanding mencit dan tikus dapat hidup selama tiga tahun. Tikus membutuhkan makanan  $\pm 10\%$  perhari dari berat badannya dan kebutuhan air minum tikus dewasa berkisar 16–22 ml perhari. Pubertas pada tikus dimulai pada umur 50–60 hari dan lama kebuntingan pada tikus berkisar 21–23 hari (Kusumawati, 2002). Tikus memiliki uterus tipe *duplex*, tipe uterus yang tidak mempunyai korpus uteri, serviknya dua buah dan kedua kornuanya terpisah sama sekali (Ismudiono, 1999).

Pemberian materi secara intra peritoneum sering dilakukan pada tikus dengan volume maksimal 5–10 ml, tempat penyuntikan pada umumnya di bawah abdomen sebelah kiri untuk menghindari organ-organ vital. Suntikan intramuskuler, sering dilakukan di daerah kaki belakang dan muskulus yang dapat dipilih adalah muskulus quadriceps dan tricep dengan volume maksimal 0,3 ml. Pengambilan darah pada hewan coba ini dapat melalui sinus orbitalis, ekor, dan intracardial. Untuk memperoleh darah dalam jumlah besar dan dalam waktu singkat dapat menggunakan cara intracardial (Kusumawati, 2002).

# **BAB III**

## **MATERI DAN METODE**

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan mulai 5 Juli sampai 27 September 2004 bertempat di Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Pengujian kadar alkalin fosfatase serum darah dilakukan di Laboratorium Kesehatan Daerah Surabaya.

#### **3.2 Bahan dan Materi Penelitian**

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini tikus putih jenis *Rattus norvegicus* berjenis kelamin betina dengan berat 150 – 200 gram dan berumur 12 minggu sebanyak 20 ekor. Pakan yang digunakan pakan jadi jenis Bur 1 Super produk dari PT Guyofeed dengan komposisi terdiri atas jagung, bungkil kedelai, molasses, CaCO<sub>3</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, campuran vitamin dan mineral dengan komposisi kalsium dan fosfor 1,5:1 (lampiran 2). Suplemen kalsium menggunakan kalsium karbonat yang berbentuk bubuk.

Bahan operasi terdiri atas anesject (ketamin HCl 100 mg), seton 2% (Xylazine 20 mg), vicilin (ampicillin 500 mg), benang (*cat gut 3/0* dan *silk 3/0*), bioplacenton (neomycine sulphate 0,5%; ekstrak plasenta 10%, PT Kalbe Farma), betadine (povidone iodine 10%), hypafix, formalin 10%, aquabidestilata, sekam, alkohol 70%,.

Reagen yang digunakan dalam pengujian kadar alkalin fosfatase serum darah menggunakan reagen I (Diethanolamine pH 9,8 1,0 mol /L; magnesium chlorid 0,5 mmol/L) dan reagen II (p-nitrophenylphospate 10 mmol/L).

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus individu, seperangkat peralatan makan dan minum, *feeding tube* untuk suplemen kalsium, satu unit alat operasi ovariohisterektomi yaitu *scalpel*, *sput*, *gunting*, *arteri klem*, pinset anatomis dan sirurgis, *needle holder*, jarum, kain duk dan tampon steril serta satu unit alat analisa alkalin fosfatase serum darah yaitu *sput*, tabung serum, mikropipet, tabung reaksi dan spectronic 20 Bousch Lomb.

### **3.3 Metode Penelitian**

#### **3.3.1 Adaptasi Hewan Percobaan**

Hewan percobaan yang akan diberikan perlakuan ditempatkan dalam kandang individu yang berukuran 20x30 sentimeter, diadaptasikan terhadap pakan dan lingkungan selama satu minggu. Selama masa adaptasi hewan coba diberi pakan  $\pm$  20 gram dan air minum secara *ad libitum*.

#### **3.3.2 Operasi Ovariohisterektomi**

Pada umur 13 minggu dilakukan operasi ovariohisterektomi pada semua hewan coba. Sebelum operasi, dilakukan penimbangan berat badan untuk menentukan dosis

obat anaestesiya. Selanjutnya tikus dianastesi dengan menggunakan kombinasi Ketamin (25 mg/Kg BB) dan Xylazin (8 mg/Kg BB).

Setelah hewan teranaestesi, hewan percobaan diletakkan dengan posisi rebah dorsal (*dorsal recumbency*). Sebelum operasi dimulai daerah operasi dipersiapkan terlebih dahulu yaitu dengan mencukur bulu di sekitar daerah operasi mulai dari pubis sampai arcus costae dan diperluas kiri kanan sampai kelenjar mammae, kemudian diolesi dengan yodium. Kain duk atau *draping* steril dipasang dalam kamar operasi.

Irisan pada dinding abdomen dilakukan lewat caudal linea mediana abdomen yaitu tepat di belakang umbilicus ke arah caudal. Panjang irisan dibuat secukupnya. Kulit dan jaringan subkutan diinsisi dengan pisau bedah. Dinding abdomen dibuka melalui linea alba dengan menggunakan gunting dan jari sebagai pemandunya agar tidak menggantung organ visceral, kemudian organ reproduksi dicari dengan mengidentifikasi cornua uteris yang terletak di bawah vesica urinaria bagian dorsal, ditelusuri ke arah kranial cornua kiri sampai ditemukan ovarium kiri. Ligamentum dan pembuluh darah ovarium dijepit dengan hemostat (*arteri klem*) (sebelah bawah ovarium), kemudian ovarium diangkat dan pada bagian atas ovarium diklem. Ligasi di atas klem terakhir menggunakan benang *absorbable (cat gut chromic)*, selanjutnya dilakukan pemotongan diantara ligasi dan klem terakhir dan dipastikan tidak terjadi perdarahan serta semua jaringan ovarium terbuang. Klem dilepas dan potongan jaringan dibiarkan masuk rongga abdomen. Ovarium kiri kemudian ditarik ke

kaudal, selanjutnya ovarium kanan ditarik keluar dari insisi, kemudian dilakukan prosedur yang sama seperti pada ovarium kiri.

Ovarium dan kornua yang telah teridentifikasi dan dipotong, diangkat sampai pangkal cornua terlihat, kemudian meletakkan arteri klem di depan servik dan melakukan ligasi di kaudal klem pada pembuluh darah di sisi kiri dan kanan uteri. Sebelum uterus dipotong, sebuah klem dipasang di depan klem pertama dan dilakukan eksisi di antara kedua klem tersebut. Klem dilepas dan bila tidak terjadi perdarahan, sisa potongan uteri dimasukkan ke dalam rongga abdomen.

Pasca pengangkatan uterus dan ovarium, rongga abdomen diirigasi dengan antibiotik untuk mencegah infeksi. Penjahitan dilakukan untuk menutup luka insisi. Lapisan peritonium dipertautkan dengan jahitan terputus sederhana menggunakan *cat gut*, lapisan sub kutan dijahit dengan pola jahitan menerus sederhana menggunakan *cat gut* sedangkan kulit dijahit dengan pola matras silang menggunakan benang *silk*. Daerah jahitan diolesi dengan iodium tincture dan ditutup dengan hypafix setelah operasi selesai dan melakukan perawatan luka selama satu minggu dan setelah satu minggu jahitan dibuka.

### 3.3.3 Perlakuan Suplementasi Kalsium

Pada umur 16 minggu hewan coba dibagi secara acak dalam tiga perlakuan dan satu kontrol, masing-masing terdiri atas lima ekor tikus betina ovariohisterektomi sebagai ulangan. Masing-masing hewan coba yang telah diacak ditempatkan dalam kandang individu.

Perlakuan meliputi :

- ✓ P<sub>0</sub> : pakan standar tanpa diberi suplemen kalsium.
- ✓ P<sub>1</sub> : pakan standar. dan suplemen kalsium 75 mg.
- ✓ P<sub>2</sub> : pakan standar dan suplemen kalsium 225 mg
- ✓ P<sub>3</sub> : pakan standar dan suplemen kalsium 450 mg.

Perlakuan suplementasi kalsium diberikan secara per oral menggunakan *feeding tube* pada pagi hari selama enam minggu berturut-turut. Selama masa perlakuan, hewan coba diberi pakan standar  $\pm$  20 gram setiap hari dan air minum secara *ad libitum*. Kandang dan tempat minum dibersihkan tiap dua kali seminggu.

### 3.3.4 Tahap Pemeriksaan

Pada akhir perlakuan (umur 22 minggu) seluruh hewan coba dieutanasi dengan cara dislokasi tulang leher kemudian dilakukan pengambilan sampel darah dari jantung dengan menggunakan spuit  $\pm$  3 ml untuk diperiksa kadar alkalin fosfatase serumnya.

Aktivitas alkalin fosfatase ditetapkan dengan metode standar yang dioptimalisasikan sesuai rekomendasi. Prinsip kerjanya adalah p-nitrophenil phosphate bersama dengan air akan diubah oleh enzim alkalin fosfatase menjadi fosfat dan p-nitrophenol.

Sebelumnya membuat terlebih dahulu larutan monoreagen yang terdiri atas empat bagian reagen I dan satu bagian reagen II (20 ml reagen I + 5 ml reagen II). Selanjutnya dengan menggunakan mikropipet untuk memasukkan 1000  $\mu$ l larutan monoreagen + 20  $\mu$ l serum ke dalam tabung reaksi untuk sampel. Tabung reaksi untuk substrat dimasukkan 20  $\mu$ l serum + 1000  $\mu$ l reagen I, campur dengan saksama dan inkubasi selama 1 menit pada suhu 25° C, selanjutnya memasukkan 250  $\mu$ l reagen II pada tabung reaksi untuk substrat. Masing-masing tabung reaksi untuk sampel dan substrat dicampur dengan saksama, kemudian aktivitas alkalin fosfatase diukur dengan menggunakan spectronic 20 Bousch Lomb, pada panjang gelombang 405 nm.

### **3.4 Rancangan Penelitian**

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan tiga perlakuan dan satu kontrol, masing-masing sebanyak lima kali ulangan.



### **3.5 Peubah yang diamati**

Hasil penelitian diamati dengan melihat kadar alkalin fosfatase serum darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariohisterektomi.

### **3.6 Analisis Data**

Data kuantitatif dari pemeriksaan kandungan alkalin fosfatase serum darah dianalisis secara statistik dengan Anova pola searah Rancangan Acak Lengkap (RAL), sedangkan untuk menguji perbedaan antar perlakuan menggunakan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

## **BAB IV**

### **HASIL PENELITIAN**

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN

Pada pegujian kadar alkalin fosfatase serum darah pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariohisterektomi yang diberi suplemen kalsium bertingkat, didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 1. Rata-rata dan standard deviasi kandungan alkalin fosfatase serum darah (U/L) tikus pada akhir penelitian.

Perlakuan	Alkalin fosfatase serum darah (U/L)
P <sub>0</sub>	172.6 <sup>b</sup> ± 28,56
P <sub>1</sub>	162.8 <sup>b</sup> ± 26,01
P <sub>2</sub>	227.6 <sup>a</sup> ± 16,47
P <sub>3</sub>	139.6 <sup>b</sup> ± 30,90

a, b. Nilai rata-rata superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )

Hasil pemeriksaan aktivitas alkalin fosfatase dalam darah tikus P<sub>2</sub> (suplemen kalsium 225 mg), menunjukkan adanya kenaikan dibanding dengan tikus P<sub>1</sub> (suplemen kalsium 75 mg), P<sub>0</sub> (tanpa suplemen), dan P<sub>3</sub> (suplemen kalsium 450 mg). Peningkatan kadar alkalin fosfatase melebihi dari kadar normalnya yang berkisar antara 57 – 128 (U/L) (Lumley,1990). Pada kontrol dan perlakuan lainnya tidak menunjukkan adanya kenaikan dari kadar normalnya.

Berdasarkan hasil analisis statistik menggunakan anova pola searah Rancangan Acak Lengkap (RAL) menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0.05$ ) antara perlakuan. Setelah dilakukan pengujian dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT), menunjukkan bahwa kandungan alkalin fosfatase dalam darah tikus  $P_2$  berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan  $P_1$ ,  $P_3$ , dan  $P_0$  (lampiran 1).

# **BAB V**

## **PEMBAHASAN**

## BAB V

### PEMBAHASAN

Aktivitas enzim alkalin fosfatase dalam serum darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariohisterektomi mengalami peningkatan dari kadar normalnya. Peningkatan ini disebabkan adanya aktivitas osteoblas aktif membentuk jaringan osteoit dan mensekresi sejumlah besar enzim alkalin fosfatase (Carter, 1990).

Pada tikus P<sub>2</sub> dengan pemberian suplemen kalsium 225 mg menunjukkan terjadinya peningkatan kadar enzim alkalin fosfatase yang mencapai 227 (U/L). Peningkatan ini menunjukkan aktivitas osteoblas tinggi dalam proses mineralisasi pembentukan tulang. Djojosoebagio (1990) mengemukakan bahwa absorpsi kalsium akan meningkat apabila kadar kalsium usus meningkat. Pada P<sub>2</sub> suplemen kalsium yang masuk ke dalam tubuh sebanyak 225 mg sehingga kalsium yang didepositkan ke dalam tulang melebihi normal dan aktivitas osteoblas dalam proses ini lebih banyak.

Peningkatan kadar enzim alkalin fosfatase yang terjadi pada kontrol dan perlakuan lainnya berbeda dibanding dengan P<sub>2</sub>. Perbedaan peningkatan ini menunjukkan bahwa perbandingan kandungan kalsium dalam pakan mempengaruhi aktivitas enzim alkalin fosfatase yang berkaitan erat dengan mineralisasi yang terjadi pada tulang.

Penurunan estrogen karena ovariohisterektomi mengakibatkan peranannya dalam membantu proses penyerapan kalsium (aktivasi vitamin D dan merangsang

kalsitonin) dalam usus menjadi terganggu dan dapat menimbulkan terjadinya resorpsi kalsium tulang guna memenuhi kebutuhan kalsium dalam tubuh yang tidak terpenuhi. Hormon paratiroid akan merangsang jaringan tulang dan menyebabkan meningkatnya permeabilitas osteoklas, osteoblas dan osteosit terhadap kalsium yang berada didalam tulang dan menimbulkan terjadinya proses resorpsi kalsium pada tulang (Banks, 1993; Anonimus, 2002). Penurunan estrogen yang berperan sebagai inhibitor kalsitonin mengakibatkan aktifnya kalsitonin yang menimbulkan resorpsi kalsium tulang (Anonimus<sup>b</sup>, 2004).

Defisiensi estrogen yang terjadi setelah ovariohisterektomi dapat menimbulkan pengeroposan pada tulang (Garrow *et al.*, 2000). Raizs dan Johannessons (1984) mengemukakan bahwa individu yang mengalami penurunan hormon estrogen baik secara alami maupun akibat pembedahan memperlihatkan laju resorpsi kalsium tulang yang lebih tinggi karena estrogen mempunyai peranan yang sangat kuat pada proses resorpsi kalsium pada tulang.

Pada tikus P<sub>1</sub> (suplemen kalsium 75 mg), P<sub>0</sub> (kontrol), dan P<sub>3</sub> (suplemen kalsium 450 mg) menunjukkan terjadinya peningkatan kadar enzim alkalin fosfatase dari kadar normalnya, yakni mencapai 162,8 (U/L), 172,6 (U/L), dan 139,6 (U/L). Peningkatan yang terjadi ini secara statistik tidak berbeda dari kadar normalnya dan ini menunjukkan peningkatan yang terjadi merupakan variasi individu dari hewan coba yang digunakan. Perbedaan peningkatan ini menunjukkan osteoblas pada P<sub>2</sub> lebih aktif daripada lainnya sehingga alkalin fosfatase yang dilepaskan dalam serum

darah lebih banyak dan dengan ini juga dapat menunjukkan laju resorpsi tulang yang tinggi.

Faktor nutrisi yang tidak memadai atau tidak sesuai dengan kebutuhan tubuh juga dapat mengakibatkan terjadinya resorpsi kalsium pada tulang. Ketidakseimbangan kadar kalsium fosfor dalam pakan memegang peranan penting dalam hal ini (Linder, 1992). Pada perlakuan P<sub>2</sub>, suplemen yang diberikan kalsium karbonat 225 mg dengan komposisi Ca:P dalam pakan adalah 1,5:1. Jubb *et al* (1985) dan Ullrey dan Stowe (1984), mengemukakan bahwa pakan yang banyak mengandung kalsium akan menurunkan absorpsinya secara mencolok, oleh karena itu konsentrasi kalsium plasma lebih mudah dipengaruhi kadar fosfor dalam pakan dibandingkan kadar kalsium dalam pakan (Jubb *et al.*, 1985; Palmer, 1993).

Pada P<sub>0</sub> sebagai kontrol (tanpa pemberian kalsium suplemen kalsium) dengan perbandingan Ca:P normal yaitu 1,5:1, juga mengalami peningkatan kadar alkalin fosfatase dalam serum darah di mana menunjukkan terjadinya resorpsi tulang karena ketidakmampuan tubuh dalam memenuhi kebutuhan kalsium yang sangat dibutuhkan didalam berbagai macam proses fisiologik dan biokimia dalam tubuh (Garrow *et al.*, 2000).

Pada P<sub>1</sub> dengan pemberian suplemen kalsium 75 mg dan P<sub>3</sub> dengan pemberian suplemen kalsium 450 mg, terjadi peningkatan kadar alkalin fosfatase serum darah yang tidak berbeda nyata dengan P<sub>0</sub> sebagai kontrol. Peningkatan kadar alkalin



fosfatase pada kedua perlakuan ini juga menunjukkan terjadinya proses mineralisasi pada tulang sebagaimana pada  $P_0$  sebagai kontrol walau tidak setinggi  $P_2$ .

Tikus yang diovariohisterektomi mengalami penurunan dalam penyerapan kalsium yang dikonsumsi sehingga mengakibatkan kalsium darah menurun. Penurunan hormon estrogen yang terjadi setelah ovariohisterektomi berkaitan erat dengan penyerapan kalsium sekaligus sebagai inhibitor resorpsi kalsium pada tulang sehingga mengakibatkan pengeroposan pada tulang (Anonimus<sup>a</sup>, 2004). Kalsium tulang akan dimobilisasikan ke dalam darah dengan menggunakan efek hormon paratiroid untuk memenuhi kebutuhan kalsium dalam tubuh (Junqueira dan Carneiro, 1992). Perubahan hormonal ini menurunkan kemampuan tubuh untuk menyerap kalsium secara drastis, sehingga penyerapan kalsium menjadi tidak efisien (Anonimus<sup>b</sup>, 2004).

Hormon paratiroid bekerja secara langsung pada tulang dan stimulasi paratiroid pada jaringan tulang yang akan menyebabkan terjadinya peningkatan permeabilitas osteoklas, osteoblas dan osteosit terhadap kalsium yang berada didalam cairan tulang, sehingga keseimbangan kadar kalsium dalam darah dapat terjaga. Sebagaimana yang dinyatakan Garrow *et al.* (2000), bahwa tulang merupakan organ yang dinamis, yang selalu berubah dan mengalami pembaruan. Proses pembaruan meliputi proses resorpsi (penyerapan), formasi (pembentukan) yang terjadi di tempat resorpsi, sehingga bagian tersebut diganti dengan tulang yang baru. Osteoblas yang sedang aktif menghasilkan jaringan osteoid, mensekresikan sejumlah besar alkalin

fosfatase, yang memegang peranan penting dalam mengendapkan kalsium dan fosfat ke dalam matriks tulang (Carter, 1992), sehingga sebagian alkalin fosfatase di dalam darah dapat menjadi indikator yang baik tentang tingkat pembentukan tulang.

Metabolisme tulang dapat terganggu oleh beberapa kondisi. Pakan yang mengandung kalsium cukup tetapi kandungan fosfornya relatif tinggi dapat menyebabkan hiperfosfatemia dan secara tidak langsung juga dapat menyebabkan hipokalsemia (Coles, 1986). Winarno (1989) menyatakan osteoporosis dapat terjadi bila keseimbangan kalsium negatif karena konsumsi kalsium rendah, absorpsi rendah, atau terlalu banyak kalsium yang terbuang bersama urin sehingga masa tulang menurun. Konsumsi suplemen kalsium, baik dalam bentuk susu berkalsium tinggi maupun tablet, tidak mungkin memulihkan kondisi tulang penderita osteoporosis seperti kondisi ketika masih sehat (Anonimus<sup>e</sup>, 2004).

# **BAB VI**

## **KESIMPULAN DAN SARAN**

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah terjadi peningkatan kadar enzim alkalin fosfatase di dalam serum darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariohisterektomi pada pemberian suplemen kalsium 225 mg.

#### 5.2 Saran

Saran yang dapat diambil dari penelitian ini adalah perlu dilakukan penelitian tentang daya cerna kalsium agar diketahui efektivitas pemberian kalsium tinggi pada tikus ovariohisterektomi.

Konsumsi kalsium pada wanita yang telah memasuki masa menopause harus lebih tinggi, sekitar 1200–1500 mg perhari ditambah vitamin D dan suplemen estrogen yang lebih dikenal dengan *Estrogen Replacement Therapy* (ERT) (Hidayati, 2001).

## RINGKASAN

DANANG BUDI YULIARSO. Kadar alkalin fosfatase serum darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariohisterektomi dengan suplemen kalsium bertingkat. Skripsi ini di bawah bimbingan Soetji Prawesthirini., S.U., drh. sebagai pembimbing pertama dan Hermin Ratnani., M.Kes., drh. sebagai pembimbing kedua.

Suplemen kalsium dan susu berkalsium tinggi yang dijumpai di pasaran banyak dikonsumsi oleh masyarakat untuk membantu mempercepat proses pertumbuhan pada usia muda dan mencegah terjadinya osteoporosis atau pengeroposan tulang pada usia dewasa. Suplemen kalsium juga sering diberikan sebagai terapi pada hewan, terutama pada hewan yang mengalami hipokalsemia.

Alkalin fosfatase merupakan enzim yang dikeluarkan osteoblas dalam proses mineralisasi tulang. Kenaikan kadar alkalin fosfatase dapat digunakan sebagai indikator tingkat pembentukan tulang pada masa pertumbuhan dan terjadinya kelainan tulang pada saat pertumbuhan tulang berhenti misalnya osteoporosis pada wanita menopause sebagai akibat dari menurunnya hormon estrogen yang berperan dalam penyerapan kalsium.

Penelitian ini bertujuan mengetahui besar pengaruh pemberian suplemen kalsium terhadap kadar alkalin fosfatase serum darah tikus (*Rattus norvegicus*) ovariohisterektomi. Hewan coba dibagi menjadi tiga perlakuan dan satu kontrol secara acak dengan lima ulangan, P<sub>1</sub> diberi pakan standar dan suplemen kalsium 75

mg, P<sub>2</sub> diberi pakan standar dan suplemen kalsium 225 mg, P<sub>3</sub> diberi pakan standar dan suplemen kalsium 450 mg, dan P<sub>0</sub> diberi pakan standar tanpa suplemen kalsium. Perlakuan diberikan selama delapan minggu dan pada akhir penelitian diambil sampel darah untuk pengujian kadar alkalin fosfatase serumnya. Penelitian menggunakan desain Rancangan Acak Lengkap. Data dianalisis dengan Analisis Ragam yang dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil.

Hasil penelitian menunjukkan perbedaan kadar alkalin fosfatase dalam serum pada P<sub>2</sub> berbeda sangat nyata dibanding perlakuan lainnya ( $p < 0,05$ ). Peningkatan kadar alkalin fosfatase ini menunjukkan adanya aktifitas osteoblas dalam mineralisasi pembentukan tulang.

Pemberian suplemen kalsium pada individu yang mengalami penurunan hormon estrogen cukup efektif untuk digunakan sebagai pencegah terjadinya pengeroposan pada tulang. Berdasarkan penelitian ini disarankan untuk memperhatikan kandungan kalsium yang dikonsumsi.

## DAFTAR PUSTAKA

### DAFTAR PUSTAKA

- Alvioli, L.V. 1980. Dalam Modern Nutrisi *in* Health and Disease. Goodhart, R.S. and M.E. Shils (ed). Lea and Febiger. Philadelphia. pp.294.
- Anonimus. 2002. Osteoporosis. Copyright Kompas.  
<http://www.kompas.com/kompas-cetak/0412/10/muda/1428865.htm>
- Anonimus. 2003. Osteoporosis Pencuri Diam-Diam dari Massa Tulang. 24 September 2003. Jakarta, KBI gemari. <http://www.kbi.gemari.or.id/beritadetail.php?id=185>
- Anonimus<sup>a</sup>. 2004. Cegah Osteoporosis Sedini Mungkin. 04-Oktober-2004.  
<http://www.dnet.id/kesehatan/tipsehat/detail.php?id=3675>
- Anonimus<sup>b</sup>. 2004. Geriatric Consultant Resources LLC. 1997-2004. All Rights Reserved.  
<http://www.gcrweb.com/OsteoDSS/clinical/diag/pages/diag-bio.html>
- Anonimus<sup>c</sup>. 2004. Osteoporosis. <http://nusaindah.tripod.com/osteoporosis.htm>
- Anonimus<sup>d</sup>. 2004. Pertumbuhan Tulang Yang Tak Layak Pada Kura-Kura, UVB, Kalsium dan Zat Lainnya. Sep 11 2004. Andy C. Highfield.  
<http://mypetzone.com/index.php?showtopic=788>
- Anonimus<sup>e</sup>. 2004. Suplemen Kalsium Tak Memulihkan Osteoporosis. Posted on Saturday, July 31.  
<http://www.bisnis.sukses.net/viva/modules.php?name=News&file=article&sid>
- Banks, W.J. 1993. Applied Veterinary Histology. 3<sup>rd</sup> ed. Mosby Year Book. Toronto. pp. 107-126.
- Bullock, L.J., and Rosendahl, P.P. 1984. Pathophysiology Adaptations and Alteration in Function, Little, Brown and Company, Boston/Toronto. pp 547
- Capen, C.C. 1993. Parathyroid Glands and Calcium Regulating Hormones. In Pathology of Domestic Animals. K.V./T., Kennedy, P.C. and Palmer, N. (ed) Academic Press.Inc. Harcourt Brace Javanovich Publisher, San Diego. Pp.287-329.
- Carter, M.A. 1992. Fraktur dan Dislokasi. Dalam Patofisiologi Konsep Klinis Proses-proses Penyakit. S.A. Price dan L.M. Wilson. EGC. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. pp. 11175-1188.



- Church, D.C. and Pond, W.G. 1998. Basic Animal Nutrition and Feeding. 3<sup>rd</sup> ed., Toronto. pp. 162-168
- Coles, E.H. 1986. Veterinary Clinical Pathology. 4<sup>th</sup> ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia. pp.231-237.
- Cunningham, J.G. 1992. Textbook of Veterinary Physiology. W.B. Saunders Company. pp.416-423.
- Dellmann, H.D. dan Brown, E.M. 1989. Buku Teks Histologi Veteriner. Edisi ketiga. Penerbit Universitas Indonesia Press. Jakarta. pp.80-107.
- Djojosebagio, S., 1996. Fisiologi Kelenjar Endokrin. Volume 1, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat IPB. hal : 152-206.
- Doige, C., 1988. Skeletal System, In Special Veterinary Pathology. Thompson (ed). B.C. Decker Inc. Toronto. pp. 467-483.
- Duncan, J.R. and Prasse, K.W. 1997. Veterinary Laboratory Medicine. 1<sup>st</sup> ed. The Iowa State University Press. Ames.
- Franson, R.D. 1996. Anatomi dan Fisiologi Ternak. Edisi ketiga. B. Srigandono dan K. Praseno (Penterjemah). Penerbit Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Pp.216-277.
- Ganong, W.F. 1991. Fisiologi Kedokteran. ECG Penerbit. Buku Kedokteran. Jakarta. Hal 17 – 19.
- Garcia-Lopez, S., and Miller, G.D. 1991. Bioavailability of Calcium from Four Sources. Nutr. Res. 10: 1187-1196.
- Garrow, J.S., James, W.P.T., and Ralph, A. 2000. Human Nutrition and Dietetics. 10<sup>th</sup>. Churchill Livingstone. Edinburgh, London, New York, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto
- Guyton, A.C. and Hall, J.E., 1996, Textbook of Medical Physiology, 9<sup>th</sup> ed., Alih Bahasa oleh : Setiawan. I. 1997 Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Cetakan Pertama. EGC. Penerbit Bukui Kedokteran. Jakarta. hal : 397-405.

- Hardjopranjoto, S. 1995. Ilmu Kemajiran Pada Ternak. Airlangga University Press. Surabaya. Hal 43 – 47.
- Hidayati, W.B. 2001. Wanita Lebih Rentan Mengalami Osteoporosis. <http://www.tempo.co.id/medika/arsip/062001/keg-2.htm>
- Ismudono. 1999. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Jee, W.S.S. 1983. The Skeletal Tissue, *in* Histology Cell and Tissue Biology. 5<sup>th</sup> ed. Weiss, L.(ed). Elsvier Biomedical. New York. pp.201-255.
- Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., and Pakmer, H. 1985. Pathology of Domestic Animal. 3<sup>th</sup> ed. Academic Press. Inc. Orlando. San diego. Pp. 2-54.
- Junqueira, L.C. dan Carneiro, J. 1992. Histologi Dasar. Terjemahan Adji Darma. Penerbit Buku Kedokteran. EGC. Jakarta. pp. 136-155.
- Kathleen-Mahan, L., and Escott-Stump, S. 2000. Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy. 10<sup>th</sup> ed. W.B. Saunders Company. USA.
- Kusumawati, D., 2002. Hewan Coba. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Lewis, M.D., Moriss, M.L., and Hand, M.S. 1990, Small Animal Clinical Nutrition. Mark Moriss Associates, Topeka, Kansas, pp.248-259.
- Linder, M.C. 1992, Nutritional Biochemistry and Metabolisme with Clinical Application. Elsvier. New York. pp. 248-259.
- Lumley, J.S.P., Green, C.J., Lear, P., Angell-James, J.E. 1990. Essential Experimental Surgery. Butter Worths and Co. London. pp.30-32.
- Moeloe, F.A. 1995. Osteoporosis pada Wanita Menopause. Majalah Kedokteran Indonesia. Volume: 45, Nomor : 7, Juli 1995
- Monroe, W.E. 1994, Diseases of the Parathyroid Gland in Practical Small Animal Internal Medicine, Leib, M.S. and Monroe, W.E., W.B. Saunders Company, Philadelphia, Londonj, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, pp.1082.

- Mudjabar, S. 2003. Pengaruh  $\text{CaCO}_3$  Dosis Tinggi Terhadap Ekskresi Kalsium dan Fosfor Dalam Tikus Pasca Reposisi Fraktur Femur. Skripsi prog. Ekstensi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Gajah Mada.
- Newton, C.D. and Nunamaker, M.D. 1985. Textbook of Small Animal Orthopaedics. J.B. Lippincott Company. Philadelphia. pp.35-61.
- Nicar., Michael., and Pak, C.Y. 1985. Calcium Bioavailability from Calcium Carbonate and Calcium Citrate. J.Clin. Endocrinol. Metab. 61 : 391-393.
- Olson, R.E., Harry, P.B., Chischester, M.S. 1988. Pengetahuan Gizi Mutakhir Mineral. Penerbit PT. Gramedia. Jakarta. hal 1-27
- Palmer, N. 1993. Bones and Jones, in Pathology of Domestic Animal, Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. and Palmer, N. (ed). Academic Press. Inc. Harcourt Brace Javanovich Publishers. San Diego. Pp : 1-181.
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Cetakan Fakultas Kedokteran veteriner. Jurusan Reproduksi IPB. Mutiara Suber Widya, Hal 131 – 132.
- Raisz, L.G. and Johannessons, A. 1984. Pathogenesis, Prevention and Therapy of Osteoporosis. Journal of Medicine. 15: 267-278
- Ressang, A.A. 1983. Patologi Khusus Veteriner. Denpasar
- Scott, D., Loveridge, N., Abu Damir, H., Buchan, W., and Milne, J. 1993. Effects of Acute Acid Loading on Parathyroid hormone Secretion and on Urinary Calcium and camp Excretion in the Growing Lamb. Exp. Physiol 78 : 157-163.
- Slatter, D.H. 1994. Textbook of Small Animal Surgery. W.b. Saunders Company. pp. 1667.
- Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, I.R., Lefkowitz, R.J., Handler, P., and White, A., 1983. Principles of Biochemistry : Mamalian Biochemistry. Ed. 7. Mac Graw Hill book Co. New York. Pp. 441-487.
- Stevenson, J.S. and Marsh, M.S., 1992. An Atlas Osteoporosis, Parthenon Publishing Group New Jersey, USA.
- Surono, A. 1999, Penuhi Kalsium dari Berbagai Sumber, Intisari, Jakarta.

- Tilman, A.D., Hartadi, H., Reksohadiprojo, S., Prawirokusumo, S. dan Lebdoesoekojo, S. 1983, Ilmu Makanan Ternak Dasar, Gajah Mada Press, Yogyakarta, hal : 51-57.
- Talbott, S.M., Rothkopf, M.M., Shapses, S.A. 1998, Dietary Restriction of Energy and Calcium Alters Bone Turnover and Density in Younger and Older Female Rats. *J. Nutr.* 128.
- Toelihere, M. 1981. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Angkasa. Bandung. Hal 49 – 50.
- Trevor, P.B., Smith, M.M., Stevenson, S., and Carring, C.B. 1992. Evaluation of the Proximal Portion of the Femur as an Autogenous Cancellous Bone Donor in Dog. *Am. J. Vet. Res.* Vol. 53. No.9 :1599-1602.
- Ullrey, D.E., and Stowe, H.D. 1984. Comparative Animal Nutrition. 4<sup>th</sup> ed. Michigan State University. East Lansing. Michigan. pp. 42-49.
- Wijaya, A. 1994. Osteoporosis Patogenesis dan Analisis Laboratorik. Prodia Diagnostics Educational Services.
- Winarno, F.G. 1989. Kimia Pangan dan Gizi. PT. Gramedia. Jakarta. hal : 154-156.
- Yudaniayanti, I.S. 2003. Pengaruh Kalsium Karbonat Dosis Tinggi Terhadap Kesembuhan Pasca Reposisi patah Tulang Femur Pada Tikus jantan (*Sprague dawley*). Thesis S2, Program Sains Veteriner. Fakultas kedokteran Hewan. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.

# LAMPIRAN

Lampiran 1. Analisis Varian Tabel F Pola RAL (5 ulangan) pada Kadar Alkalin Fosfatase Serum Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariohisterektomi dengan Pemberian Kalsium Bertingkat.

## DESKRIPSI

ULANGAN	PERLAKUAN				TOTAL
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	
1	134	132	217	103	
2	192	197	211	170	
3	151	142	252	132	
4	200	173	222	120	
5	186	170	236	173	
<b>TOTAL</b>	<b>863</b>	<b>814</b>	<b>1138</b>	<b>698</b>	<b>3515</b>
<b>rata-rata</b>	<b>172,6</b>	<b>162,8</b>	<b>227,6</b>	<b>139,6</b>	

## SIDIK RAGAM

SK	Db	JK	KT	Fhit	Ftabel	
					0.05	0.01
Perlakuan	3	20864.15	6954.7167	10.23	3.24	5.29
Sisa	16	10876.4	679.775			
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>31740.55</b>				

F hitung lebih besar dari F tabel 1%, jadi terjadi perbedaan yang nyata (highly significant)

## UJI BNT

Perlakuan	Rata-rata	BEDA			BNT	
		x - c	x - a	x - d	5%	1%
P <sub>2</sub>	227.6 <sup>a</sup>	88 <sup>*</sup>	64.8 <sup>*</sup>	55 <sup>*</sup>	34.96	48.17
P <sub>0</sub>	172.6 <sup>b</sup>	33	9.8			
P <sub>1</sub>	162.8 <sup>b</sup>	23.2				
P <sub>3</sub>	139.6 <sup>b</sup>					

## Notasi

227.6<sup>a</sup> ....179.43 ....192.64

172.6<sup>b</sup>

162.8<sup>b</sup>

139.6<sup>b</sup> ....124.43 ....137.64

Lampiran 2. Susunan kandungan pakan standard yang diberikan pada tikus percobaan

Tabel 2. Analisis Pakan Jenis Bur 1 PT Guyofeed Surabaya

Protein	Min.	12 %
Lemak	Min.	5%
Serat Kasar	Max.	6%
Abu	Max.	7%
Kalsium	Max.	1%
Fosfor	Max.	0,3 %