

DISERTASI

MEKANISME GANGGUAN REMODELING TULANG
AKIBAT LATIHAN FISIK INTENSITAS TINGGI
MELALUI PERUBAHAN KADAR GLUKOKORTIKOID, OSTEOPROTEGERIN,
OSTEOKALSIN, C-TELOPEPTIDE DAN JUMLAH OSTEOLAS APOPTOTIK

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



Gadis Meinar Sari

PROGRAM STUDI S3 ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN 2012

MEKANISME GANGGUAN REMODELING TULANG
AKIBAT LATIHAN FISIK INTENSITAS TINGGI
MELALUI PERUBAHAN KADAR GLUKOKORTIKOID, OSTEOPROTEGERIN,
OSTEOKALSIN, C-TELOPEPTIDE DAN JUMLAH OSTEOLAS APOPTOTIK

DISERTASI

Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi S3 Ilmu Kedokteran
pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya
dan dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Tanggal 19 September 2012

Oleh :

Gadis Meinar Sari
090710370D

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2012

ii

Lembar pengesahan

DISERTASI INI TELAH DISETUJUI

TANGGAL 28 Agustus 2012

Oleh :

Promotor



Prof. Soetjipto, dr., MS, Ph.D
NIP. 19500217 1978031002

Ko Promotor I



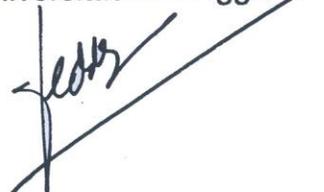
Prof. Dr. Harjanto JM, dr., AIFM
NIP. 19441225 1973011001

Ko Promotor II



Prof. Dr. Djoko Roeshadi, dr., SpOT
NIP. 19411115 1967011002

Mengetahui,
Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga



Prof. Dr. Teddy Ontoseno dr. SpA(K), SpJP, FIHA
NIP. 195012161977031002

Telah diuji pada Ujian Doktor Tahap II (Terbuka)

Tanggal 19 September 2012

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof. Dr. Paulus Liben, dr., M.S.
Anggota : 1. Prof. Soetjipto, dr., M.S., Ph.D.
2. Prof. Dr. Harjanto J.M., dr., AIFM.
3. Prof. Dr. H. M. Rasyad Indra, dr., M.S.
4. Dr. I. Ketut Suidiana, Drs., M.S.
5. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes.

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga tentang
Panitia Penguji Disertasi

Nomor : 131/H3.1.1/KD/2012

Tanggal : 24 Juli 2012

UCAPAN TERIMAKASIH

Tiada kata lain selain berucap puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayahNya, sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan naskah disertasi ini.

Perkenankanlah saya menyampaikan terimakasih yang setinggi-tingginya kepada semua pihak yang telah banyak membantu kelancaran proses penelitian dan penulisan naskah disertasi ini, kepada :

Prof. Soetjipto, dr., M.S., Ph.D., atas kesediaan beliau menjadi Promotor dan Pembimbing Akademik yang selalu meluangkan waktu di tengah kesibukan beliau untuk memberi arahan, bimbingan, nasehat dan semangat kepada penulis selama menempuh studi pendidikan Doktor hingga selesainya penulisan disertasi ini.

Prof. Dr. Harjanto J.M., dr., AIFM, atas kesediaan menjadi Ko Promotor I yang dengan kesabaran memberikan bimbingan, dorongan semangat serta sumbangan pemikiran dan mencermati setiap langkah penyusunan naskah disertasi ini.

Prof. Dr. Djoko Roeshadi, dr., Sp.OT(K), atas kesediaan beliau menjadi Ko Promotor II yang dengan penuh kesabaran dan kebabakan telah memberikan bimbingan dan pemikiran yang berharga selama menempuh studi pendidikan Doktor hingga selesainya penulisan disertasi ini.

Saya ucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

Pemerintah Republik Indonesia c.q. Menteri Pendidikan dan Kebudayaan yang telah memberi bantuan finansial dalam bentuk Beasiswa Program Pascasarjana (BPPS) sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan pendidikan program Doktor.

Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Fasichul Lisan, Apt, yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas untuk mengikuti, menyelesaikan pendidikan Doktor pada Program Studi S3 Ilmu Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. Dr. Agung Pranoto, dr., M.Kes., Sp.PD, K-EMD, FINASIM dan Prof. Dr. Muhamad Amin, dr., Sp.P(K), selaku mantan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan kepada saya menempuh studi lanjut program Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Hj. Sri Hajati, S.H., M.S., dan mantan Direktur Program Pascasarjana Prof. Dr. Muhamad Amin, dr., SpP(K), Prof. Dr. Suhariningsih, Ir., selaku Wakil Direktur Bidang Akademik, dan Prof. Dr. H. R. Eddy Rahardjo, dr., Sp.An.KIC., selaku mantan Asisten Direktur Bidang Akademik beserta seluruh pimpinan dan staf Program Pascasarjana Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya selama mengikuti program pendidikan Doktor di Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Teddy Ontoseno dr. Sp.A(K), Sp.JP, FIHA, selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran dan Prof. Dr. Harjanto

J.M., dr., AIFM selaku mantan Ketua Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga atas perhatian, arahan, dorongan, serta kemudahan dalam menyelesaikan pendidikan saya.

Dr. Elyana Asnar, dr., M.S., selaku Ketua Departemen Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan Harlina Soetjipto, dr., M.S., selaku mantan Ketua Departemen Ilmu Faal, yang telah mengizinkan dan memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh pendidikan Doktor pada Program Studi S3 Ilmu Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Para staf Departemen Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. R. Soedarso Djojonegoro, dr.; Prof. Martin Setiabudi, dr., Ph.D.; Prof. Harjanto J.M., dr., AIFM.; Prof. Dr. Paulus Liben, dr., M.S.; Choesnan Effendi, dr., AIF.; Harlina Soetjipto, dr., M.S.; Tjitra Wardani, dr., M.S.; Lilik Herawati, dr., M.Kes.; Purwo Sri Rejeki, dr., M.Kes.; Bambang Purwanto, dr., M.Kes.; Raden Argarini, dr., M.Kes.; Irfiansyah Irwadi, dr., M.Si.; Sundari Indah Wiyasihati, dr., M.Si.; Kristanti Wanito Wigati, dr.; Hayuris Kinandita, dr., yang telah memberikan semangat dan dukungan kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Doktor pada Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Sunarko Setyawan, dr., M.S. (alm) dan istri, yang telah mendorong saya untuk melanjutkan studi jenjang S3, membuka wawasan ilmu dan memberi inspirasi pada penelitian saya hingga saya dapat menyelesaikan pendidikan Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Semua anggota Tim Penguji ujian kualifikasi, proposal dan seminar naskah disertasi, Prof. Soetjipto, dr., M.S., Ph.D.; Prof. Dr. Harjanto J.M., dr., AIFM.; Prof. Dr. Djoko Roeshadi, dr., Sp.OT(K); Prof. Dr. H. M. Rasyad Indra, dr., M.S.; Prof. Dr. Paulus Liben, dr., M.S.; Dr. I. Ketut Sudiana, Drs., M.S.; Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes., yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat, sumbangan pemikiran, kritik dan saran dalam perbaikan usulan disertasi sampai selesainya penyusunan naskah disertasi ini.

Para Dosen yang saya hormati, Prof Purnomo Suryohudoyo, dr., Sp.BK; Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., M.S.; Prof. Dr. Zainuddin, Apt; Prof. Dr. Juliati Hood A, dr., M.S., Sp.PA(K), FIAC.; Prof. Dr. Indro Handoyo, dr., Sp.PK(K) (alm); Prof. Dr. Sunarko Setyawan, dr., M.S. (alm); Prof. Dr. Lasiyo; Prof. Dr. Laurentius Dyson P, drs., M.A.; Dr. Widodo J.P., dr., M.S., M.P.H., PH.; Dr. Siti Pariani, dr., M.S., M.Sc., PhD.; Dr. Sunarjo, dr., M.S., M.Sc.; Dr. F. Sustini, dr., M.S.; Dr. Hari Basuki N., dr., M.Kes.; Prof. Glynska; Dr. Phil. Toetik Koesbardiati, Dra., DFM., yang telah membimbing dalam ilmu dasar dan terapan yang sangat bermanfaat dalam penyusunan disertasi ini.

Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes., atas segala bantuan, bimbingan dan arahan dalam bidang statistik serta analisis data sampai penyelesaian penulisan disertasi.

Seluruh Guru dan Dosen saya sejak pendidikan dasar sampai pendidikan magister hingga saat ini yang telah memberikan ilmu pengetahuan dan wawasan dengan tulus ikhlas.

Seluruh rekan seperjuangan mahasiswa Program Studi S3 Ilmu Kedokteran angkatan 2007/2008 yang selalu membantu dan memberikan motivasi untuk segera menyelesaikan pendidikan Doktor.

Semua karyawan di Departemen Ilmu Faal, Eko Purbojo, Nuri Yanuarita, Suyanto, Pak Katmidi, Djoko Suprijanto, Otto Dodi Harminadi, M. Taufik Kurniadi, SKom., Miftachuljannah, M. Arifin, yang selalu siap membantu sampai selesainya disertasi ini.

Pak Heri Soemantoro dan Pak Otto Dodi Harminadi, yang membantu pelaksanaan penelitian khususnya dalam pemeliharaan hewan percobaan hingga terselesaikannya penelitian saya.

Semua pegawai dan staf administrasi di Program Pascasarjana dan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, atas bantuannya selama pendidikan hingga selesainya pendidikan Doktor ini.

Pada kesempatan ini tak lupa saya sampaikan terimakasih dan kasih sayang yang tulus kepada:

Ibunda Hj. Roesmiah dan ayahanda H. Sirin Arief (alm), yang telah mengasuh dan membesarkan saya dengan segala kasih sayangnya, selalu memberikan dan mengusahakan yang terbaik untuk pendidikan saya. Berkat doa restu beliau berdua saya dapat menyelesaikan pendidikan Doktor ini, semoga Allah SWT menerima segala ketulusan hatinya dan meninggikan derajat beliau di dunia dan akhirat. Rasa hormat dan terimakasih juga saya sampaikan kepada mertua saya Bapak R. Moedjiono Hardjokoesoemo (alm) dan Ibu Rr. Marindijah

(alm) yang telah mendoakan dan menyemangati saya sehingga saya bisa menyelesaikan pendidikan Doktor.

Suami tercinta, Haryo Senoadji, S.E., dan anak-anak tersayang Samudera Wicaksono dan Yoga Akbar Arifandi yang dengan segala pengertian dan pengorbanannya, serta dengan kesabaran dan ketulusan hati selalu menemani, mendukung, dan memberikan semangat yang tak henti-hentinya baik di saat susah dan senang dalam menyelesaikan pendidikan program Doktor ini.

Para kakak kandung dan saudara ipar saya, terimakasih atas doa, dukungan, perhatian dan kasih sayang yang diberikan kepada saya beserta keluarga yang tiada henti hingga menyelesaikan pendidikan ini.

Akhirnya kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu yang telah membantu dalam segala hal, saya ucapkan terimakasih dan semoga Allah SWT membalas segala amal baik yang diberikan kepada saya.

Harapan saya hasil penelitian ini bermanfaat bagi sesama dan pengembangan ilmu kedokteran dasar di Indonesia. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmatNya kepada kita semua. Aamiin Ya Robbal Alamiin.

RINGKASAN

Mekanisme Gangguan Remodeling Tulang Akibat Latihan Fisik Intensitas Tinggi melalui Perubahan Kadar Glukokortikoid, Osteoprotegerin, Osteokalsin, C-telopeptide dan Jumlah Osteoblas Apoptotik

Latihan fisik adalah kegiatan fisik menurut cara dan aturan tertentu yang dilakukan secara sistematis dalam waktu relatif lama serta beban yang meningkat yang bertujuan untuk meningkatkan efisiensi faal tubuh. Latihan fisik dapat memberikan manfaat positif bagi tubuh antara lain terhadap fungsi respirasi, kardiovaskuler dan muskuloskeletal. Apabila dilakukan sesuai dosis maka latihan fisik akan memberikan manfaat tetapi sebaliknya bila dilakukan melebihi kemampuan tubuh justru akan berakibat buruk terhadap fungsi organ.

Tubuh mempunyai kemampuan untuk merespons dan beradaptasi terhadap penambahan dosis latihan fisik, meliputi frekuensi, intensitas, waktu dan bentuk latihan. Pemberian dosis latihan yang melebihi nilai ambang kemampuan adaptasi tubuh akan menjadi stresor bagi tubuh. Latihan fisik intensitas tinggi akan meningkatkan sekresi kortisol yang merupakan glukokortikoid utama dalam tubuh. Kadar glukokortikoid yang tinggi dapat mengganggu keseimbangan fungsi tubuh sehingga berakibat patologis, salah satunya terhadap tulang.

Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa latihan fisik intensitas sedang dapat memberikan pengaruh positif pada kesehatan tulang tetapi penelitian pada pelari wanita jarak jauh dan mereka yang sering melakukan olah raga angkat berat justru memiliki kepadatan tulang lebih rendah. Mekanisme molekuler penurunan kepadatan tulang ini belum sepenuhnya dimengerti maka perlu dilakukan penelitian mengenai gangguan remodeling tulang yang mendasari penurunan kepadatan tulang akibat latihan fisik intensitas tinggi melalui gambaran perubahan kadar glukokortikoid, osteoprotegerin, osteokalsin, c-telopeptide dan jumlah osteoblas apoptotik.

Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus strain Wistar*) betina umur kurang lebih 3 bulan sebanyak 20 ekor yang dibagi dalam dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dan perlakuan. Pada kelompok perlakuan diberikan latihan fisik intensitas tinggi berupa latihan renang dengan pembebanan 18% berat badan dalam waktu 90% dari waktu maksimumnya, dilakukan 2 kali per set dengan frekuensi 3 kali per minggu, selama 8 minggu. Pada akhir perlakuan hewan coba dibius kemudian diambil darah untuk pemeriksaan kadar glukokortikoid, osteoprotegerin, osteokalsin dan c-telopeptide. Hewan coba dikorbankan, diambil bagian tungkai atas untuk pemeriksaan imunohistokimia untuk menghitung jumlah osteoblas apoptotik. Data yang diperoleh dianalisis dengan uji t – 2 sampel bebas (*independent t-test*) untuk mengetahui perbedaan antara kelompok kontrol dan perlakuan dan analisis jalur untuk menunjukkan hubungan kausal antar variabel.

Hasil penelitian menunjukkan, terdapat perbedaan kadar glukokortikoid, osteoprotegerin, osteokalsin dan c-telopeptide antara kelompok kontrol dan perlakuan ($\alpha=0,05$). Tidak terdapat perbedaan jumlah osteoblas apoptotik antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Hasil analisis jalur menunjukkan ada pengaruh latihan fisik intensitas tinggi terhadap kadar glukokortikoid ($r=0,793$); kadar glukokortikoid berpengaruh pada kadar osteoprotegerin ($r=-0,688$) dan osteokalsin ($\beta=-0,486$) tetapi tidak berpengaruh pada jumlah osteoblas apoptotik ($r=0,212$); kadar osteoprotegerin berpengaruh pada kadar c-telopeptide ($\beta=-0,658$); kadar osteoblas apoptotik tidak berpengaruh pada kadar osteokalsin ($\beta=-0,191$); kadar c-telopeptide ($\beta=0,825$) dan osteokalsin ($\beta=-0,225$) berpengaruh terhadap rasio c-telopeptide/osteokalsin.

Simpulan dari penelitian ini adalah mekanisme gangguan remodeling tulang akibat latihan fisik intensitas tinggi disebabkan peningkatan kadar glukokortikoid yang menyebabkan penurunan kadar osteoprotegerin sehingga meningkatkan kadar c-telopeptide. Di sisi lain peningkatan kadar glukokortikoid akan menyebabkan penurunan kadar osteokalsin yang tidak melalui jalur apoptotik osteoblas. Peningkatan kadar c-telopeptide dan penurunan kadar osteokalsin meningkatkan rasio c-telopeptide/osteokalsin sehingga terjadi ketidakseimbangan atau gangguan remodeling tulang. Jalur yang lebih berperan pada gangguan remodeling tulang akibat latihan fisik intensitas tinggi ini adalah jalur penurunan kadar osteoprotegerin yang meningkatkan kadar c-telopeptide.

SUMMARY

The Mechanism of Bone Remodelling Disorder due to High Intensity Exercise through The Changes in Levels Of Glucocorticoid, Osteoprotegerin, Osteocalcin, C-telopeptide and The Number Of Apoptotic Osteoblast

Exercise is a mean of physical activity which carried out systematically according to a specific manner in a relatively long periode of time and with the increased burden that aims to improve the efficiency of the body's physiology. Exercise provides benefits for the body such as to the respiratory, cardiovascular and musculoskeletal functions. Exercise will provide benefits if it is carried out according to the dose of exercise, but on the contrary, it will adversely effects the organ function if it is carried out exceed the body's ability.

The body has the ability to respond and adapt to the addition of a dose of exercise, including the frequency, intensity, time and form of exercise. A given dose of exercise that exceeds the threshold of the body's adaptability will become stressors to the body. High intensity exercise will increase cortisol secretion, which is the major glucocorticoid in the body. High levels of glucocorticoids can disrupt the balance of body functions that result in pathological state, and one of the example is to the bones.

Studies suggest that moderate-intensity physical exercise can have a positive influence on bone's health, but studies on long distance women runners

and those who frequently do weight lifting exercise would have a lower bone density. The molecular mechanisms of this decreased bone density is not fully understood yet, so that it is necessary to do research on bone remodeling disorder that underlies the decrease of bone density due to high intensity physical exercise through the changing levels of glucocorticoid, osteoprotegerin, osteocalcin, c-telopeptide and the number of apoptotic osteoblast.

The experimental animals used were 20 female rats (*Rattus norvegicus* strain Wistar) aged less than 3 months, which is divided into two groups, the control and the treatment group. The treatment group was given high intensity swimming exercise, with a load of 18% body of weight within 90% of the maximum time, performed two times per set with a frequency of 3 times per week, for 8 weeks. At the end of the experiment, the experimental animals were anesthetized and the blood was drawn to examine the levels of glucocorticoid, osteoprotegerin, osteocalcin and c-telopeptide. Experimental animals were sacrificed, and the upper limbs were taken for immunohistochemical examination to calculate the number of apoptotic osteoblasts. Data were analyzed using t - 2 free sample test (independent t-test) to determine differences between control and treatment groups and path analysis to demonstrate causal relationships between variables.

The result of the study showed that there were different levels of glucocorticoid, osteoprotegerin, osteocalcin and c-telopeptide between the control and treatment groups ($\alpha = 0.05$). No difference of the number of apoptotic osteoblast between control and treatment groups. The results of path analysis

showed that there was an effect of high intensity exercise on the level of glucocorticoids ($\gamma = 0.793$); glucocorticoid level affected the level of osteoprotegerin ($\gamma = -0.688$) and osteocalcin ($\beta = 0.486$) but had no effect on the number of apoptotic osteoblast ($\gamma = 0.212$); osteoprotegerin level affected the level of c-telopeptide ($\beta = -0.658$); level of apoptotic osteoblast had no effect on osteocalcin level ($\beta = -0.191$), c-telopeptide level ($\beta = 0.825$) and osteocalcin ($\beta = -0.225$) affected on the ratio of c-telopeptide/osteocalcin.

Based from the research, it can be concluded that the mechanism of bone remodelling disorder by high intensity exercise was caused by the increased level of glucocorticoids which lowered the level of osteoprotegerin, so that the level of c-telopeptide increases. On the other side, the increased level of glucocorticoids will cause the osteocalcin level decrease, which not through the apoptotic osteoblast pathway. The increased level of c-telopeptide and the decreased level of osteocalcin cause the increasing c-telopeptide/osteocalcin ratio, so that it will cause the imbalance or bone remodelling disorder. The predominant pathway of bone remodelling disorder caused by high intensity exercise is the decreased of osteoprotegerin which causes the level of c-telopeptide increased.

ABSTRAK

**Mekanisme Gangguan Remodeling Tulang
akibat Latihan Fisik Intensitas Tinggi
melalui Perubahan Kadar Glukokortikoid, Osteoprotegerin,
Osteokalsin, C-telopeptide dan Jumlah Osteoblas Apoptotik**

Gadis Meinar Sari

Tujuan penelitian ini adalah menjelaskan mekanisme gangguan remodeling tulang akibat latihan fisik intensitas tinggi melalui perubahan kadar glukokortikoid, osteoprotegerin, osteokalsin, c-telopeptide dan jumlah osteoblas apoptotik

Penelitian menggunakan tikus (*Rattus norvegicus* strain Wistar) betina umur kurang lebih 3 bulan sebanyak 20 ekor yang dibagi dalam dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dan perlakuan. Pada kelompok perlakuan diberikan latihan fisik intensitas tinggi berupa latihan renang dengan pembebanan 18% berat badan dalam waktu 90% dari waktu maksimumnya, dilakukan 2 kali per set dengan frekuensi 3 kali per minggu, selama 8 minggu. Pada akhir perlakuan diperiksa kadar glukokortikoid, osteoprotegerin, osteokalsin, c-telopeptide dan dihitung jumlah osteoblas apoptotik. Data yang diperoleh dianalisis dengan uji $t - 2$ sampel bebas (*independent t-test*) dan analisis jalur.

Hasil penelitian menunjukkan ada perbedaan kadar glukokortikoid, osteoprotegerin, osteokalsin dan c-telopeptide antara kelompok kontrol dan perlakuan ($\alpha=0,05$). Tidak terdapat perbedaan jumlah osteoblas apoptotik antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Hasil analisis jalur menunjukkan ada pengaruh latihan fisik intensitas tinggi terhadap kadar glukokortikoid ($r=0,793$); kadar glukokortikoid berpengaruh pada kadar osteoprotegerin ($r=-0,688$) dan osteokalsin ($\beta=-0,486$) tetapi tidak berpengaruh pada jumlah osteoblas apoptotik ($r=0,212$); kadar osteoprotegerin berpengaruh pada kadar c-telopeptide ($\beta=-0,658$); jumlah osteoblas apoptotik tidak berpengaruh pada kadar osteokalsin ($\beta=-0,191$); kadar c-telopeptide ($\beta=0,825$) dan osteokalsin ($\beta=-0,225$) berpengaruh terhadap rasio c-telopeptide/osteokalsin.

Kesimpulan yang diperoleh pada penelitian ini adalah latihan fisik intensitas tinggi meningkatkan kadar glukokortikoid dan c-telopeptide; menurunkan kadar osteoprotegerin dan osteokalsin; dan meningkatkan rasio c-telopeptide/osteokalsin.

Kata kunci: Latihan fisik intensitas tinggi, glukokortikoid, osteoprotegerin, osteokalsin, c-telopeptide, osteoblas apoptotik, remodeling tulang.

ABSTRACT**The Mechanism of Bone Remodelling Disorder due to High Intensity Exercise through The Changes in Levels of Glucocorticoid, Osteoprotegerin, Osteocalcin, C-telopeptide, and The Number Of Apoptotic Osteoblasts****Gadis Meinar Sari**

The purpose of this study was to explain the mechanism of bone remodelling disorder due to high-intensity exercise through change in glucocorticoid levels of glucocorticoid, osteoprotegerin, osteocalcin, c-telopeptide and the number of apoptotic osteoblasts.

The study used 20 female rats (*Rattus norvegicus* strain Wistar) aged less than 3 months which is divided into two groups, control and treatment group. The treatment group was given high intensity swimming exercise with a load of 18% body weight within 90% of the maximum time, performed two times per set with a frequency of 3 times per week, for 8 weeks. At the end of the experiment, the levels of glucocorticoid, osteoprotegerin, osteocalcin and c-telopeptide were examined and the number of apoptotic osteoblast was calculated. Data were analyzed using t - 2 free sample test (independent t-test) and path analysis.

The results showed that there was a difference in glucocorticoid level, osteoprotegerin, osteocalcin and c-telopeptide between the control and treatment groups ($\alpha=0.05$). No difference of the number of apoptotic osteoblast between control and treatment groups. The results of path analysis showed that there was a correlation between high intensity exercise and the level of glucocorticoid ($r=0.793$); glucocorticoid level correlated to the level of osteoprotegerin ($r=-0.688$) and osteocalcin ($\beta=-0.486$) but had no correlation on the number of apoptotic osteoblast ($r=0.212$); osteoprotegerin level correlated to the level of c-telopeptide ($\beta=-0.658$); level of apoptotic osteoblast had no correlation on osteocalcin level ($\beta=-0.191$), c-telopeptide level ($\beta=0.825$) and osteocalcin ($\beta=-0.225$) correlation to the ratio of c-telopeptide/osteocalcin.

Conclusions obtained in this study were high-intensity exercise increased levels of glucocorticoid and c-telopeptide; lowered levels of osteoprotegerin and osteocalcin, and increased the ratio c-telopeptide/osteocalcin.

Key words: high-intensity exercise, glucocorticoid, osteoprotegerin, osteocalcin, c-telopeptide, apoptotic osteoblasts, bone remodelling.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Mempertahankan kelangsungan hidup sangat erat hubungannya dengan kuantitas dan kualitas beraktivitas fisik. Aktivitas fisik tersebut diwujudkan dalam bentuk latihan fisik yaitu kegiatan fisik menurut cara dan aturan tertentu yang dilakukan secara sistematis dalam waktu relatif lama serta beban yang meningkat yang bertujuan untuk meningkatkan efisiensi faal tubuh. Latihan fisik yang benar dan sesuai aturan dapat memberikan manfaat positif bagi tubuh antara lain terhadap fungsi respirasi, kardiovaskuler dan muskuloskeletal. (Bompa, 1994; Warren, 2000; Robergs, 2003).

Tubuh mempunyai kemampuan untuk merespons dan beradaptasi terhadap penambahan dosis latihan fisik, meliputi frekuensi, intensitas, waktu dan bentuk latihan. Pemberian dosis latihan yang melebihi nilai ambang kemampuan adaptasi tubuh akan menjadi stresor yang berakibat negatif bagi tubuh. Hal ini sering terjadi terutama pada atlet yang berkompetisi dengan dosis latihan yang tidak sesuai dengan kemampuan tubuh. Apabila efek negatif ini tidak dikendalikan maka justru akan berakibat buruk pada performa atlet (Robergs, 2003; Wilmore, 2008).

Semua stresor termasuk latihan fisik akan berpengaruh terhadap aktivitas aksis Hipotalamus Pituitari Adrenal (aksis HPA) sehingga terjadi perubahan kadar glukokortikoid dalam tubuh (Pederson, 2000; Warren, 2000;

Ganong, 2004; Plotkin, 2007). Penelitian terkini juga semakin menunjang hipotesis bahwa latihan fisik intensitas tinggi akan meningkatkan sekresi kortisol yang merupakan glukokortikoid utama dalam tubuh. Penelitian pada atlet yang berlari di *treadmill* selama tiga jam dengan kecepatan seperti pada saat lomba lari memperlihatkan peningkatan 60% hormon kortisol. Kadar glukokortikoid yang tinggi dapat mengganggu keseimbangan fungsi tubuh sehingga berakibat patologis, salah satunya terhadap tulang (Warren and Constantini, 2000; Robergs, 2003; Wilmore, 2008).

Sepanjang hidup tulang akan mengalami proses remodeling yaitu mekanisme yang saling berkaitan (*coupling mechanism*) antara formasi oleh osteoblas dan resorpsi oleh osteoklas. Pada proses formasi, osteoblas memproduksi beberapa protein antara lain osteokalsin yaitu protein nonkolagen yang dapat digunakan sebagai petanda biokimiawi proses formasi tulang (Manolagas, 2000; Caulfield and Reitz, 2004; Baron, 2006; Downey and Siegel, 2006). Pada saat resorpsi tulang, osteoklas melepas hasil degradasi matriks protein kolagen tipe 1 antara lain *cross-linked telopeptide (C-telopeptide)* yang dapat digunakan sebagai petanda biokimiawi proses resorpsi tulang (Watts, 1999; Caulfield dan Reitz, 2004; Seibel, 2005).

Osteoporosis adalah salah satu gangguan remodeling tulang yang sering terjadi, merupakan kelainan tulang yang disebabkan oleh ketidakseimbangan proses formasi dan resorpsi sehingga berakibat penurunan kepadatan tulang dan berubahnya susunan mikro arsitektur tulang sehingga mengakibatkan tulang menjadi rapuh dan meningkatkan risiko patah tulang. Osteoporosis dahulu dianggap sebagai penyakit yang hanya

menyerang orang tua, tetapi saat ini bisa ditemukan juga pada wanita muda dengan berbagai tingkat usia dimana terjadi penurunan densitas mineral tulang (*Bone Mineral Density*; BMD) (Kemmler, 2002; Kohort, 2004, West, 2009). Menurut penelitian Burrows (2003), pada 52 pelari wanita jarak jauh ditemukan penurunan BMD pada tulang femur dan Warren (2000) menyebutkan pada mereka yang sering melakukan olah raga angkat berat justru memiliki BMD yang lebih rendah daripada wanita yang cenderung inaktif (Warren, 2000; Burrows, 2003).

Osteoporosis menimbulkan permasalahan kesehatan dunia dimana di negara maju seperti Amerika Serikat, osteoporosis menempati peringkat atas sebagai masalah penyakit utama pada 10 juta penduduk di atas 50 tahun (Poole, 2006). Risiko patah tulang yang disebabkan oleh osteoporosis terjadi pada 1 dari 2 wanita dan 1 dari 5 pria di atas 50 tahun yang menghabiskan dana £1.8 milyar di Inggris dan €30 milyar di seluruh Eropa per tahun untuk biaya pelayanan kesehatan. Secara global, patah tulang osteoporotik menyebabkan kira-kira 5,8 juta kecacatan pada tahun 2000 yang berkaitan juga dengan peningkatan mortalitas (Kingsley, 2007). Pada 30 tahun terakhir di Asia terjadi peningkatan insiden fraktur femur osteoporosis hingga 2-3 kali lipat. Diperkirakan tahun 2050 fraktur femur osteoporosis di dunia mencapai 6,26 juta orang dan di Asia 3,25 juta (52%) (Baziad, 2003).

Salah satu tipe osteoporosis yang sering dijumpai adalah karena penggunaan glukokortikoid (*glucocorticoid - induced osteoporosis*). Analisis *General Practice Research Database (UK)* pada *Veterans Affair Medical Centers*, dari 40% penderita penyakit pernapasan yang mendapatkan terapi

glukokortikoid dengan peningkatan dosis harian didapatkan peningkatan risiko relatif patah tulang paha dan patah tulang vertebra (Adler, 2003).

Penurunan kepadatan tulang terjadi karena ketidakseimbangan proses remodeling tulang dimana proses resorpsi oleh osteoklas tidak diikuti proses formasi oleh osteoblas. Kelangsungan proses osteoklastogenesis karena adanya ikatan antara protein *receptor activator of nuclear factor- κ B* (NF- κ B) atau RANK yang diekspresikan di progenitor osteoklas, sel hematopoietik makrofag dan monosit dengan *RANK-ligand* (RANKL) yang diekspresikan di sel preosteoblastik dan limfosit T. Pengikatan RANK dan RANKL akan merangsang diferensiasi osteoklas dan aktivasi progenitor osteoklas menjadi osteoklas aktif sehingga terjadi peningkatan proses resorpsi tulang (Abu, 2000; Manolagas, 2000; Riggs, 2002). Glukokortikoid menyebabkan penurunan aktivitas osteoprotegerin (OPG) suatu *soluble decoy receptor* yang dilepas dari sel stroma atau osteoblas yang mempunyai efek mengikat RANKL sehingga bisa menghambat interaksi RANKL-RANK (Udagawa, 2000; Takuma, 2003, Kim, 2006; Jia, 2006; Swanson, 2006; Lu, 2007).

Di sisi lain glukokortikoid juga bekerja secara langsung di osteoblas dan osteosit melalui reseptor glukokortikoid (GR α) pada *bone forming surface*, tempat proses remodeling terjadi (Abu, 2000; O'Brien, 2004). Glukokortikoid memodulasi aktivitas intraseluler kinase *Proline-rich tyrosine kinase 2* (Pyk2) yang mempengaruhi reorganisasi sitoskeleton dan apoptosis. Glukokortikoid mempengaruhi masuknya Ca²⁺ ekstraseluler sehingga terjadi peningkatan Ca²⁺ intraseluler yang akan mempercepat proses fosforilasi Pyk2. Aktivasi Pyk2 pada gilirannya akan mengaktivasi c-Jun N-terminal

kinase (JNK) yang menyebabkan apoptosis osteoblas (Hofbauer, 1999; Nakamura, 2003; Park, 2004; Kingsley 2007).

Telah banyak publikasi yang menguraikan penurunan kepadatan tulang atau osteoporosis tetapi mekanisme molekuler gangguan remodeling yang mendasari penurunan kepadatan tulang karena pengaruh glukokortikoid akibat latihan fisik intensitas tinggi masih belum pernah diungkap. Berdasar uraian di atas maka akan dilakukan penelitian yang menggambarkan mekanisme gangguan remodeling tulang akibat latihan fisik intensitas tinggi melalui gambaran perubahan kadar glukokortikoid, osteoprotegerin, c-telopeptide, osteokalsin, dan jumlah osteoblas apoptotik. Diharapkan hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai salah satu dasar upaya pencegahan terhadap gangguan remodeling tulang yang berakibat osteoporosis.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah kadar glukokortikoid darah lebih tinggi pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik?
2. Apakah kadar osteoprotegerin darah lebih rendah pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik?
3. Apakah kadar c-telopeptide darah lebih tinggi pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik?
4. Apakah kadar osteokalsin darah lebih rendah pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik?
5. Apakah jumlah osteoblas apoptotik lebih tinggi pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik?
6. Apakah ada hubungan kausal antara kadar glukokortikoid, osteoprotegerin, c-telopeptide, osteokalsin dan jumlah osteoblas apoptotik akibat latihan fisik intensitas tinggi?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Menjelaskan mekanisme gangguan remodeling tulang yang mendasari penurunan kepadatan tulang akibat latihan fisik intensitas tinggi melalui gambaran perubahan kadar glukokortikoid, osteoprotegerin, c-telopeptide, osteokalsin, dan jumlah osteoblas apoptotik.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Membuktikan kadar glukokortikoid darah lebih tinggi pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik.
2. Membuktikan kadar osteoprotegerin darah lebih rendah pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik.
3. Membuktikan kadar c-telopeptide darah lebih tinggi pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik.
4. Membuktikan kadar osteokalsin darah lebih rendah pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik.
5. Membuktikan jumlah osteoblas apoptotik lebih tinggi pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik.
6. Membuktikan hubungan kausal antara kadar glukokortikoid, osteoprotegerin, c-telopeptide, osteokalsin dan jumlah osteoblas apoptotik akibat latihan fisik intensitas tinggi

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

Menjelaskan mekanisme gangguan remodeling tulang akibat latihan fisik intensitas tinggi melalui perubahan kadar glukokortikoid, osteoprotegerin, osteokalsin, c-telopeptide dan jumlah osteoblas apoptotik.

1.4.2 Manfaat praktis

1. Memberikan informasi ilmiah kepada olahragawan, instruktur dan pecinta olah raga tentang penggunaan dosis olah raga yang sesuai dengan kemampuan tubuh sebagai dasar pencegahan terhadap gangguan remodeling tulang yang berakibat osteoporosis.
2. Mendapatkan suatu parameter yang paling bermakna adanya gangguan remodeling tulang yang berisiko penurunan kepadatan tulang pada seseorang.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jaringan Tulang

Secara imunohistologi jaringan tulang terdiri dari 2% sel dan 98% matriks ekstraselular. Matriks ekstraseluler terdiri dari 1/3 bagian berat tulang terdiri atas protein (kolagen) dan 2/3 berat tulang adalah kalsium fosfat (hidroksiapatit). Sel tulang terdiri atas Osteoblas, Osteosit, dan Osteoklas (Marieb, 2008; Martini, 2009).

Berdasar jenis, tulang terdiri atas tulang kompak atau kortikal dan spongiosa atau trabekular atau kanselus. Tulang kompak relatif padat dan kuat, dimana tulang spongiosa membentuk jaringan terbuka terdiri atas lempeng dan penyangga. Kedua jenis tulang tersebut terdapat pada tulang skelet seperti humerus dan femur. Tulang kompak membentuk dinding dan lapisan dalam tulang spongiosa yang mengelilingi rongga medula. Rongga medula mengandung sumsum tulang, jaringan ikat yang didominasi oleh adiposit (sumsum kuning) atau oleh campuran matur dan imatur sel darah merah dan putih, dan stem sel yang memproduksi sumsum merah (Martini, 2009; Watkins, 2010).

Komposisi matriks dalam tulang kompak dan spongiosa adalah sama tetapi berbeda pada susunan tiga dimensi osteosit, kanalikuli dan lamela. Unit fungsional dasar tulang kompak matur adalah osteon silindris atau sistem *Havers*. Dalam sebuah osteon, osteosit tersusun dalam lapisan konsentris yang mengelilingi kanal sentral atau kanal *Havers* yang mengandung

pembuluh darah yang menyuplai osteon. Kanal sentral biasanya terletak paralel terhadap permukaan tulang. Saluran lain adalah kanal *Volkman*, berjalan tegak lurus terhadap permukaan. Pembuluh darah pada kanal *Volkman* menyalurkan darah ke osteon tulang yang lebih dalam dan melayani bagian dalam rongga medula. Lamela setiap osteon adalah silindris dan tersusun paralel terhadap sumbu panjang tulang, dikenal sebagai lamela konsentris. Serabut kolagen tersusun spiral sepanjang lamela dan membentuk susunan spiral dengan lamela yang berdekatan akan memperkuat osteon. Kanalikuli menghubungkan lakuna dalam osteon dan membentuk cabang jaringan yang mencapai kanal sentral. Ruang periseluler di sekeliling lakuna memungkinkan molekul bergerak dari kapiler tulang ke lakuna osteosit (Wang, 2007). Cairan periseluler berperan sebagai pembawa sinyal mekanik, elektrik dan kimia antara sirkulasi sistemik dan sel tulang (Gu 2007). Lamela interstisial mengisi ruangan antara osteon dalam tulang kompak. Tergantung pada lokasinya, lamela lain juga diproduksi sepanjang pertumbuhan tulang atau mengganti sisa osteon yang komponen matriksnya mengalami daur ulang oleh osteoklas sepanjang perbaikan atau remodeling tulang (Martini, 2009; Watkins, 2010).

Perbedaan utama antara tulang kompak dan spongiosa (juga disebut tulang trabekular atau kanselus) adalah susunan tulang spongiosa dalam bentuk piringan bercabang disebut trabekula atau spikula. Bila trabekula cukup tebal, osteon akan muncul. Antara tulang spongiosa dan kompak tidak ada perbedaan sel, struktur dan komposisi lamela. Tulang spongiosa membentuk jaringan terbuka sehingga lebih ringan dari tulang kompak.

Percabangan trabekula membuat tulang spongiosa amat kuat meskipun beratnya relatif ringan, sehingga keberadaan tulang spongiosa mengurangi berat skeleton dan membuat otot lebih mudah menggerakkan tulang. Tulang spongiosa ditemukan pada tulang yang tidak mendapatkan tekanan berat atau tekanan datang dari berbagai arah (Martini, 2009; Watkins, 2010).

Tulang panjang mempunyai dua ujung atau epifisis yang dipisah oleh tubular diafisis atau *shaft*. Diafisis dihubungkan dengan epifisis pada zona sempit disebut metafisis. Pada keadaan normal diafisis tulang meneruskan tekanan dari epifisis satu ke yang lain. Osteon di dalam diafisis terletak paralel dengan sumbu panjang tulang menyebabkan femur sangat kuat ketika mendapat tekanan sepanjang sumbu. Sehingga tulang panjang tidak bengkok ketika diberi tekanan pada ujung lain tetapi kekuatan dari samping diafisis dapat dengan mudah menyebabkan patah tulang atau fraktur (Martini, 2009; Watkins, 2010). Imobilisasi dan hilangnya gravitasi menyebabkan atrofi tulang, sedangkan pembebanan mekanik penting untuk menjaga homeostasis dan pembentukan tulang (Harada dan Rodan, 2003).

Sifat biomekanika tulang ditentukan oleh sifat struktural tulangnya, yang merupakan fungsi dari sifat material dan sifat geometrik (desain arsitektur) tulang (Manolagas, 2000). Faktor lain yang ikut mempengaruhi sifat biomekanika tulang adalah cara, kecepatan dan frekuensi pembebanan tulang. Peningkatan pembebanan akibat beban tertentu yang besarnya diketahui akan menyebabkan percepatan sementara pembentukan tulang. Aktifitas sel tulang akan meningkat sampai struktur baru yang terbentuk mencapai kekuatan yang dibutuhkan. Sekali adaptasi tercapai, aktifitas sel akan kembali pada tingkat non latihan dan struktur baru tersebut

dipertahankan pada intensitas latihan yang sama (Burr dan Martin, 1992).

Tulang dipengaruhi oleh rangsangan mekanik dan hormonal, di mana rangsangan mekanik merupakan pencetusnya. Sedangkan dari penelitian lain ditemukan bahwa tulang juga memiliki sifat elektrik dan kimia tertentu, sehingga dapat disimpulkan bahwa tulang dapat dirangsang melalui *mechano-electro-chemico-humoral pathway* (Ferreti, 2001).

Faktor genetik, hormonal dan nutrisi berkontribusi pada proses metabolisme tulang (*modeling – remodeling*) untuk mempertahankan homeostasis mineral, dan beban mekanik yang dialami setiap hari menentukan integritas struktural yaitu ukuran dan bentuk tulang. Bila suatu gaya yang berbeda diberikan pada tulang, maka gaya tersebut akan mengubah pola tulang normal sehingga akan terjadi mekanisme adaptasi tulang yaitu perubahan massa dan ukuran tulang untuk bertahan terhadap perubahan bentuk yang dialaminya (Cullen, 2000).

Imobilisasi dan hilangnya gravitasi menyebabkan atrofi tulang. Homeostasis tulang dewasa dipertahankan dengan keseimbangan aktifitas pembentukan tulang oleh osteoblas dan penyerapan tulang oleh osteoklas (Harada dan Rodan, 2003).

Mekanisme transformasi yang menkonversikan rangsangan fisik ke dalam respon sel disebut mekanotransduksi, belum sepenuhnya dipahami. Integrin, chaderin dan kanal Ca^{2+} diduga terlibat dalam mekanisme transfer sinyal mekanik, yang selanjutnya menyebar melalui jalur transduksi sinyal seluler ke inti, di mana terjadi modifikasi transkripsi gen (Gu, 2007). Kalsium juga berperan dalam hampir semua proses metabolisme dalam tubuh, termasuk dalam proses sinyaling sel yang dirangsang oleh aliran cairan (*fluid*

shear stress) akibat aktifitas fisik (Sharan, 2008). Pada fase awal mekanotransduksi pada jaringan tulang, deformasi membran sel oleh karena regangan atau *shear stress* yang diperantarai pengaliran cairan dalam kanalikuli terdeteksi oleh osteoblas dan osteosit (Pavalko, 2002).

Tulang spongiosa tidak sekuat tulang kompak tetapi lebih mampu menahan tekanan dari berbagai arah. Epifisis tulang femur terisi tulang spongiosa. Di samping mengurangi berat dan mengatasi tekanan dari berbagai arah, kerangka trabekula mendukung dan melindungi sel sumsum tulang. Sumsum kuning yang sering ditemukan di dalam rongga medula diafisis merupakan cadangan energi yang penting. Area sumsum merah yang luas seperti yang ditemukan dalam tulang spongiosa epifisis femur adalah tempat penting pembentukan sel-sel darah (Martini, 2009; Watkins, 2010).

2.2 Proses Remodeling Tulang

Remodeling tulang adalah proses regenerasi tulang dengan mengganti secara periodik tulang tua dengan tulang baru pada lokasi yang sama. Tujuannya untuk mencegah akumulasi tulang tua, memperbaiki mikrolesi sehingga memungkinkan tulang beradaptasi terhadap perubahan pembebanan mekanik. Setiap tahunnya terjadi pemugaran tulang trabekular 25% dan kortikal 3% dan proses ini berlangsung dengan kecepatan 50 $\mu\text{m}/\text{hari}$. Remodeling tulang merupakan mekanisme *coupling*, dimana terjadi proses resorpsi tulang oleh osteoklas dan diikuti formasi tulang oleh osteoblas. Proses resorpsi dan formasi berpasangan ini terjadi pada permukaan tulang trabekular disebut *Howship lacunae* dan pada tulang

kortikal disebut sebagai *Haversian system*, yang membutuhkan waktu lebih kurang 120 hari (Manolagas, 2000; Kumar et al, 2005).

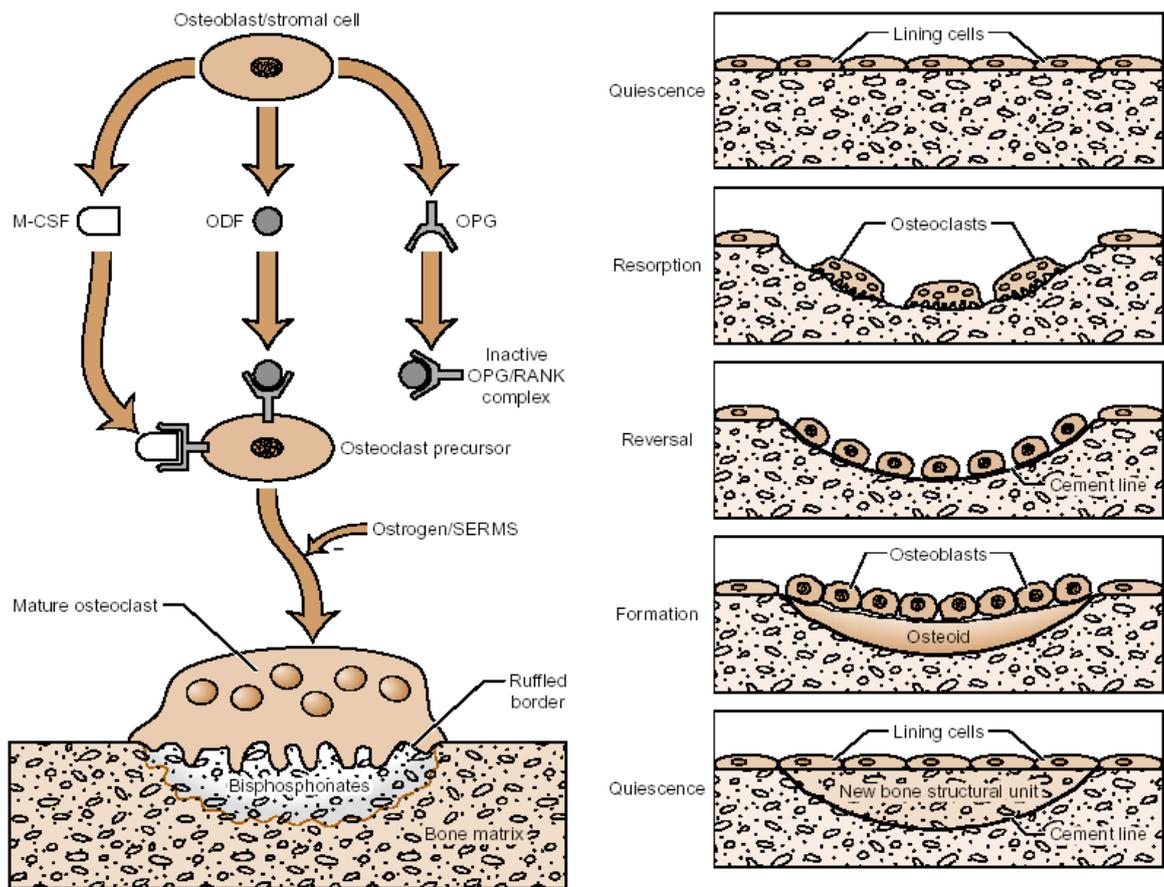
Menurut Ehrman (2009) remodeling tulang adalah perubahan tulang hasil proses kontinyu resorpsi dan formasi tulang, meliputi pemeliharaan arsitektur dan kekuatan tulang, mengatur kadar kalsium, dan mencegah kerusakan tulang. Remodeling tulang, khas pada tulang dewasa, paling aktif pada bagian yang kaya jaringan tulang trabekuler (vertebra, femur proksimal, kalkaneus dan radius di bagian ultradistal).

Osteoklas dan osteoblas membentuk struktur temporer yang disebut *basic multicellular unit* atau BMU dengan masa hidup (*lifespan*) 6-9 bulan lebih lama daripada umur osteoklas dan osteoblas. Oleh karena itu pasokan osteoblas dan osteoklas baru dari progenitor dalam sumsum tulang sangat diperlukan, dengan konsekuensi keseimbangan antara pasokan sel baru dan masa hidup merupakan kunci yang menentukan jumlah dan fungsi masing-masing jenis sel dari BMU yang mempunyai peran penting untuk mempertahankan homeostasis tulang. Peningkatan kecepatan remodeling tulang akan menimbulkan penurunan massa tulang karena penempatan sel osteoblastik memerlukan periode waktu yang lebih lama daripada waktu resorpsi tulang. Dengan demikian pembentukan tulang yang tidak adekuat dalam proses remodeling merupakan faktor yang penting dalam patogenesis osteoporosis (Raisz, 2005, Ehrman, 2009).

Remodeling juga penting sepanjang periode pertumbuhan, pubertas, dan dewasa. Modeling dan remodeling tulang sering terjadi secara simultan, dan perbedaan diantara keduanya tidak selalu jelas tetapi secara umum,

modeling tulang merujuk pada perubahan bentuk tulang seperti perubahan panjang. Modeling tulang biasanya berhenti sekitar usia 18 sampai 20 tahun ketika tulang berhenti tumbuh dimana remodeling tulang terus berlangsung sepanjang hidup. Remodeling tulang adalah proses yang kompleks. Secara ringkas remodeling tulang dibentuk oleh *basic multicellular units* (*bone multicellular units* atau *bone modeling units* atau *BMU*) terdiri dari osteoklas dan osteoblas. BMU mempunyai dua peran: osteoklas mengikis tulang tua (resorpsi), dan osteoblas membentuk tulang baru (formasi). Setelah pertumbuhan berhenti, formasi tulang seimbang dengan resorpsi tulang, yang berarti kepadatan tulang tidak berubah. Tetapi bagaimanapun tulang mempunyai umur seperti halnya sel lain dalam tubuh. Tampaknya osteoblas lebih terpengaruh oleh umur daripada osteoklas, sehingga formasi tulang lebih cepat menurun daripada resorpsi tulang sehingga dikatakan kehilangan tulang seiring dengan bertambahnya usia, yang menyebabkan osteoporosis (Ehrman, 2009).

Modeling adalah perubahan dalam ekspresi genotip skelet yang terjadi dari hasil faktor lingkungan seperti nutrisi dan regangan mekanik sebagai kegiatan rutin. Remodeling adalah koordinasi antara aktivitas osteoblas dan osteoklas yang bertanggung jawab terhadap perubahan bentuk eksternal dan arsitektur internal tulang meliputi perbaikan tulang (Watkins, 2010).



Gambar 2.1 Proses remodeling tulang (Sambrook, 2002)

Gambar 2.1 menunjukkan bahwa proses remodeling tulang dimulai dengan aktivasi prekursor hematopoietik untuk menjadi osteoklas, yang memerlukan interaksi dengan sel osteoblastik.

Regulator sistemik seperti hormon paratiroid (PTH), hormon tiroid, vitamin D serta metabolitnya, gaya elektrik dan mekanik, hormon estrogen, androgen, kortisol, kalsitonin dan faktor pertumbuhan seperti *insulin-like growth factor* (IGF-1), *transforming growth factor* β (TGF- β) serta regulator lokal seperti sitokin interleukin-1 (IL-1) dan interleukin-6 berperan dalam regulasi homeostasis tulang. Heterogenitas osteoporosis bukan hanya dipengaruhi oleh regulator sistemik dan lokal, tetapi juga oleh perubahan

reseptor, mekanisme sinyal transduksi, faktor transkripsi nuklear dan enzim yang memproduksi atau yang melakukan inaktivasi regulator lokal. Pada akhir dekade ini studi genetik mendapatkan hubungan massa tulang, fragilitas tulang dan polimorfisme gen reseptor vitamin D (Raisz, 2005).

2.3 Sel Tulang

2.3.1 Osteoklas

Osteoklas adalah sel besar, multinuklear, berasal dari stem sel yang memproduksi monosit dan netrofil. Osteoklas menyekresi asam melalui proses eksositosis lisosom. Asam memecah matriks tulang dan melepaskan asam amino dan menyimpan kalsium dan fosfat. Proses erosi, disebut osteolisis, meningkatkan konsentrasi kalsium fosfat cairan tubuh. Osteoklas selalu memecah matriks dan melepas mineral, dan osteoblas selalu memproduksi matriks yang dengan cepat akan mengikat mineral. Keseimbangan aktivitas osteoblas dan osteoklas sangat penting, ketika osteoklas melepas garam kalsium lebih cepat dari deposisi oleh osteoblas, maka tulang menjadi lebih lemah. Ketika aktivitas osteoblas lebih dominan maka tulang akan menjadi lebih kuat dan tebal (Marieb, 2008; Martini, 2009; Watkins, 2010)

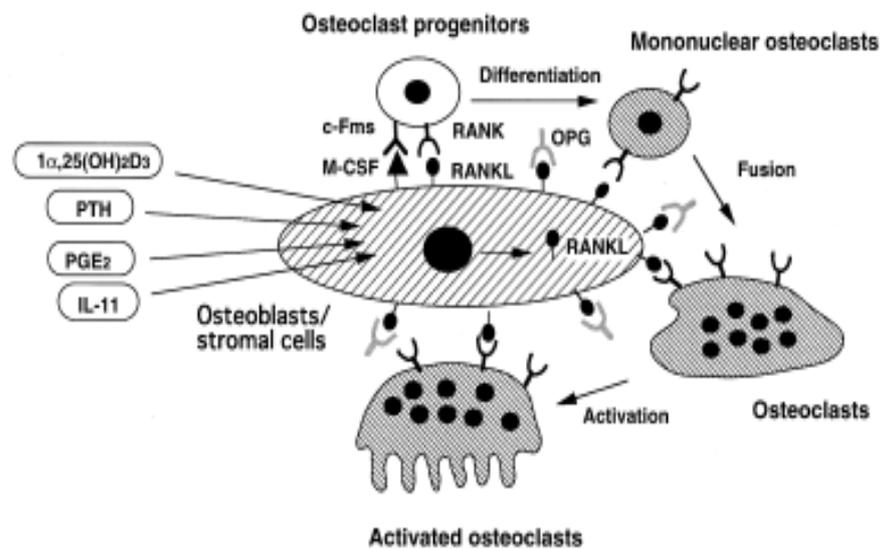
Proses pertumbuhan dan perkembangan osteoklas dimulai dari progenitor sel osteoklas yang berasal dari jaringan hematopoietik yang berdiferensiasi dan berproliferasi menjadi osteoklas melalui *cell-to-cell interaction* dengan sel stromal osteoblas. Regulasi mekanisme molekuler osteoklastogenesis ini dilakukan oleh suatu protein *receptor activator of nuclear factor- κ B* (NF- κ B) atau RANK yang diekspresikan di progenitor

osteoklas (sel hematopoietik makrofag dan monosit), sedangkan RANK-ligand diekspresikan di sel preosteoblastik dan limfosit (Manolagas, 2000; Riggs et al., 2002). Kalsitriol atau $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, hormon paratiroid (PTH), *parathyroid hormon-related peptide* (PTHrP), interleukin IL-1, IL-6, IL-11 dan *tumor necrosis factor α* (TNF- α) menstimulasi ekspresi RANK-ligand (RANKL) sel stromal dan sel osteoblastik. RANKL akan mengikat RANK dan ikatan ini dapat dihambat oleh osteoprotegerin (OPG) yang mempunyai efek mengikat RANKL dan menghambat interaksi RANKL-RANK, oleh karena itu peran OPG penting dalam regulasi pembentukan osteoklas (Gori, 2000; Manolagas, 2000; Galli, 2008).

Penelitian *in vivo* menunjukkan bahwa pada tikus dengan gen OPG KO terjadi osteoporosis berat (Raisz, 1999). Osteoprotegerin juga berperan sebagai reseptor untuk *cytotoxic ligand TRAIL* (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) sehingga terjadi inhibisi TRAIL yang berperan sebagai media apoptosis limfosit. Pengikatan RANK dan RANKL menimbulkan aktivasi *Fos* dan *Fos-1* yang diperlukan untuk diferensiasi osteoklas dan aktivasi progenitor osteoklas menjadi osteoklas aktif. Walaupun TNF- α dan RANKL mempunyai reseptor yang berbeda tetapi keduanya mengaktifasi jaras sinyal intraseluler NF- κ B dan JNK di dalam sel osteoklas. Pada mencit dengan defisiensi p-55 TNF- α receptor (TNF- α R), TNF- α gagal menginduksi pembentukan osteoklas (Raisz, 1999).

Osteoklas adalah sel multinuklear yang terdiri dari banyak mitokondria, lisosom dan ribosom dengan morfologi bentuk tepi membran berkerut karena invaginasi plasma membran (*ruffled border*). Osteoklas juga dilengkapi area

yang disebut *clear zone* yang terdiri dari berkas *actin-like filament* yang berfungsi untuk menutup area yang akan diresorpsi. *Vacuolar H⁺-ATPase* atau *ATP-driven proton pump* yang terletak di tepi membran menyebabkan area asam sehingga melarutkan komponen mineral matriks tulang. Sekresi *matrix metalloproteinase* (MMP), kolagenase dan gelatinase serta cathepsin K, B dan L (suatu *lysosomal cystein proteinase*) menyebabkan degradasi komponen protein matriks tulang terutama kolagen (Billezikian, 2002).



Gambar 2.2 Mekanisme osteoklastogenesis (Billezikian, 2002).

Osteoklas membentuk enzim *phosphohydrolase* dan *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAPase). Enzim TRAPase dilepas ke dalam lakuna tempat resorpsi tulang pada saat pembongkaran tulang, diduga berperan untuk melarutkan mineral matriks tulang. Pada saat pembongkaran tulang, osteoklas juga melepas *collagen crosslink* hasil degradasi matriks protein (kolagen tipe 1) seperti *pyridinium crosslink* (*free pyridinoline* dan *deoxypyridinoline*), *cross-linked telopeptide* (*N-telopeptides* dan *C-*

telopeptides) di samping enzim TRAP dan kalsium, sebagai substansi petanda biokimiawi resorpsi atau pembongkaran tulang (Watts, 1999; Caufield dan Reitz, 2004; Seibel, 2005).

Petanda biokimiawi resorpsi tulang sebagian besar adalah hasil degradasi produk kolagen tulang. *Crosslinked telopeptide* kolagen tipe 1 adalah peptida nonheliks pada regio spesifik dari molekul kolagen tipe 1 yang matur disebut sebagai *aminoterminal* dan *carboxyterminal*. Produk degradasi ini dilepas selama resorpsi tulang. Akhir-akhir ini dikembangkan *sandwich* ELISA menggunakan dua monoklonal antibodi untuk pemeriksaan *carboxyterminal crosslinked telopeptide* (CTx) serum yang berkorelasi tinggi ($r=0,86$) (Seibel, 2005).

Masa hidup sel osteoklas terbatas hingga 12,5 hari. Setelah resorpsi tulang maksimum tercapai, osteoklas mengalami fase *reversal* (lebih kurang 9 hari) yang diduga karena osteoklas mengalami apoptosis, retraksi sel osteoklas akibat akumulasi kalsium dalam lakuna tempat resorpsi tulang, inhibisi pelepasan enzim yang pada akhirnya menghentikan resorpsi tulang. Pelepasan TGF- β dari matriks tulang selama resorpsi juga menghambat aktivitas osteoklas dan menstimulasi apoptosis osteoklas. Selama fase *reversal*, osteoklas digantikan oleh sel makrofag yang melepas faktor yang menginhibisi osteoklas dan menstimulasi osteoblas. Jika osteoklas telah selesai melakukan resorpsi, osteoblas kemudian menuju tempat tersebut dan mulai dengan pembentukan tulang baru (Manolagas, 2002).

Terdapat kontroversi mengenai pengerahan osteoblas yaitu model serial atau paralel. Pada model serial faktor yang dilepas dari tempat resorpsi

tulang akan menstimulasi proliferasi dan diferensiasi prekursor osteoblas. Model paralel menjelaskan bahwa proliferasi dan diferensiasi prekursor osteoblas serta osteoklas terjadi bersamaan. Percobaan *in vitro* menunjukkan bahwa sel osteoklas tidak terbentuk apabila tidak terdapat stromal. Defisiensi *core binding factor a1* (Cbfa 1) pada mencit menyebabkan defisiensi osteoblas dan juga osteoklas. Hasil penelitian ini menyokong model paralel (Manolagas, 2000).

2.3.2 Osteoblas

Osteoblas adalah sel berbentuk kuboid dan ditemukan di dalam atau permukaan tulang. Sel ini menyekresi komponen matriks organik tulang (kolagen) yang nantinya akan termineralisasi melalui mekanisme yang belum diketahui. Osteoblas bertanggung jawab terhadap pembentukan tulang baru yang disebut osteogenesis. Walaupun perangsang pasti belum diketahui, diperkirakan bahwa osteoblas bertanggung jawab terhadap rangsangan mekanik atau hormonal untuk mengawali proses osteogenesis. Bila osteoblas dikelilingi matriks maka akan berdiferensiasi menjadi osteosit (Martini, 2009; Watkins, 2010)

Proses pembentukan tulang merupakan kaskade yang kompleks, dimulai dari proliferasi *primitive mesenchymal cell* yang kemudian berdiferensiasi menjadi sel prekursor osteoblas atau osteoprogenitor/ pre-osteoblas. Progenitor osteoblas adalah mesensimal multipoten sel stem yang juga membentuk sel stromal sumsum tulang, kondrosit, sel otot dan adiposa. Fase awal dari fase pembentukan tulang adalah pengerahan prekursor osteoblas ke tempat resorpsi tulang yang dimediasi TGF- β . Kemudian diikuti

fase kedua yaitu proliferasi prekursor osteoblas yang dimediasi *osteoblast-derived growth factor* dan *platelet-derived growth factor (PDGF)*. Fase ke tiga dari pembentukan tulang adalah diferensiasi prekursor osteoblas menjadi sel yang matur. Aktivitas osteoblas berhenti diduga akibat *negative feedback inhibition* atau induksi apoptosis oleh TNF yang dilepas oleh sel sumsum tulang di dekatnya (Manolagas, 2000).

Faktor pertumbuhan (*growth factor*) yang dapat menstimulasi osteoblastogenesis dari *uncommitted progenitor* adalah *bone morphogenetic protein* (BMP), yaitu BMP-2 dan 4 yang merupakan keluarga superfamili polipeptida TGF- β . Faktor pertumbuhan ini (BMP) menstimulasi transkripsi gen yang menyandi *osteoblasts specific transcription factor* yaitu Runx2 (*run-related transcription factor 2*) disebut juga sebagai *osteoblast specific factor 2* (Osf2) atau *core binding factor a1* (Cbfa1). Faktor transkripsi ini (Cbfa1) mengaktifkan gen spesifik osteoblas seperti osteopontin, *bone sialoprotein*, kolagen tipe 1 dan osteokalsin (Manolagas, 2000).

Mencit gen Cbfa1 KO menunjukkan hambatan perkembangan osteoblas, tetapi pada ekspresi Cbfa1 yang berlebihan justru meningkatkan pengerahan osteoklas (Manolagas, 2000). Faktor transkripsi lain diketahui berperan dalam diferensiasi osteoblas seperti *Osterix* (Osx) dan Fra-1 (Raisz, 2005). Faktor transkripsi yang berperan dalam diferensiasi sel adiposit adalah *enhancer binding protein* (EBP) α , β dan γ serta *preoxisome proliferator activated receptor* yaitu PPAR γ 1 dan PPAR γ 2. Pada sel klonal dari isolasi sel sumsum tulang murine, pemberian PPAR γ 2 menyebabkan konversi fenotip osteoblastik menjadi adiposit. Faktor transkripsi ini juga mensupresi ekspresi Cbfa1 dan gen spesifik osteoblas (Manolagas, 2000). Diduga

reseptor BMP berperan dalam spesifikasi dan diferensiasi dari progenitor osteoblas dan adiposit.

Sel osteoblas mensekresi matriks tulang yang kemudian mengalami mineralisasi yang dimulai 13 hari setelah awal aktivitas osteoblas. Waktu yang diperlukan untuk mengisi kavitas tempat resorpsi tulang lebih kurang 124-168 hari. Produksi terbanyak osteoblas adalah kolagen tipe 1, selain itu juga memproduksi osteokalsin, osteonektin, glikosaminoglikan, osteopontin, *bone sialoprotein*, fibronektin, vitronektin dan trombospondin (Seibel, 2005).

Osteokalsin atau bone GLA protein/BGP adalah suatu protein non kolagen, terdiri dari 49 asam amino dengan berat molekul 5,8 kDa yang kaya dengan *glutamic acid* yang diduga terlibat dalam kalsifikasi matriks tulang. *Bone specific alkaline phosphatase* adalah suatu *isoenzim alkaline phosphatase* yang diduga berperan untuk kalsifikasi matriks atau mineralisasi dan pembentukan *osteoid*. *Procollagen-1 extension peptide* (PINP dan PICP) adalah suatu prekursor peptida untuk sintesis pembentukan kolagen tipe 1. *Osteocalcin*, *bone-specific alkaline phosphatase* dan *procollagen-1 extension peptide* dalam sirkulasi darah (serum atau plasma) dapat dideteksi dengan pemeriksaan *immunoassay* sebagai substansi petanda biokimiawi pembentukan tulang (Rosen dan Tenenhouse, 1998; Caulfield dan Reitz, 2004; Seibel, 2005).

Kadar serum imunoreaktif osteokalsin menunjukkan korelasi dengan parameter histomorfometrik kecepatan pembentukan tulang (Kaniawati, 2005; Seibel, 2005). Osteokalsin dalam serum cepat mengalami degradasi sehingga dalam serum terdapat osteokalsin intak dan fragmen osteokalsin.

Oleh karena itu dikembangkan bermacam teknik *immunoassay* untuk deteksi osteokalsin. Akhir akhir ini dikembangkan *two-site immunoassay* dengan *radioimmunoassay* (RIA) atau *enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA) menggunakan antibodi yang mendeteksi bagian yang berbeda dari 1-49 molekul osteokalsin intak di antaranya dengan degradasi osteokalsin yang terbesar dan lebih stabil yaitu fragmen asam amino 1-43 osteokalsin atau *N-Mid osteocalcin* yang dapat menggambarkan keseluruhan konsentrasi osteokalsin (Seibel, 2005).

Substansi petanda biokimiawi metabolisme tulang ini dapat digunakan untuk deteksi ketidakseimbangan proses dinamik metabolisme tulang atau kondisi *turnover* tulang, sehingga dapat digunakan untuk menunjang diagnosis risiko osteoporosis dan memantau kecepatan kehilangan masa tulang atau respon terapi, juga untuk membantu memprediksi densitas tulang dan risiko fraktur (Rosen, 1998). Walaupun demikian substansi petanda biokimiawi tulang ini mempunyai keterbatasan karena ada variabilitas yang dapat berasal dari variabilitas teknik dan biologis (Rosen dan Tennenhouse, 1998; Seibel, 2005).

2.3.3 Osteosit

Osteosit adalah sel tulang matur yang memelihara dan memonitor protein dan mineral pengisi matriks. Mineral dalam matriks selalu mengalami daur ulang. Setiap osteosit langsung berhubungan dengan pelepasan kalsium dari tulang ke darah dan mendeposisikan garam kalsium ke matriks. Matriks tersusun atas lamella yang merupakan lapisan matriks kalsium yang di antaranya terdapat ruang tempat osteosit berada, disebut *lacunae*. Dari

lacuna menyebar kanalikuli menuju permukaan tulang atau pembuluh darah terdekat. Melalui kanalikuli tonjolan sitoplasma akan berhubungan dengan sitoplasma yang berdekatan melalui *tight junctions* dalam fungsi difusi nutrisi dan pembuangan bahan sisa (Martini, 2009; Watkins, 2010).

Osteosit adalah sel osteoblas yang terkubur dalam lakuna dan termineralisasi dalam matriks tulang dengan morfologi *stellate*, 10 kali jumlah osteoblas. Osteosit melalui penonjolan membran plasma (panjang 5-30 μm) atau kanalikuli dapat berkomunikasi dengan osteoblas. Osteoblas berkomunikasi dengan sel dalam sumsum tulang dengan memproyeksikan selnya ke sel endotel di sinusoid, dengan demikian lokasi strategis osteosit menjadikan sel ini sebagai kandidat sel mekanosensori untuk deteksi kebutuhan tulang, menambah atau mengurangi massa tulang selama adaptasi fungsi skeletal. Osteosit juga mempunyai kemampuan deteksi perubahan aliran cairan interstisial dalam kanalikuli yang dihasilkan akibat pembebanan mekanik dan deteksi perubahan kadar hormon, oleh karena itu gangguan pada jaringan osteosit meningkatkan fragilitas tulang (Manolagas, 2000).

Pada percobaan *in vivo*, osteosit menunjukkan ekspresi mRNA untuk *β -actin*, *osteocalcin*, *connexin-43*, *IGF-1*, *c-fos* dan *c-jun*. Kultur sel osteosit menghasilkan sedikit kolagen, fibronectin, dan produksi lebih banyak osteokalsin, osteonektin, dan osteopontin dari osteoblas. Reseptor PTH telah dibuktikan *in vitro* dan *in vivo* terdapat pada sel osteosit. Percobaan *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan bahwa pembebanan mekanik menimbulkan respon seluler meliputi metabolisme energi, aktivasi gen, produksi faktor

pertumbuhan (IGF-1) dan sintesis matriks tulang (Burger dan Klein-Nulend, 1999).

Masa hidup osteoklas lebih kurang selama 2 minggu sedangkan osteoblas 3 bulan. Baik osteoklas dan osteoblas mengalami kematian melalui apoptosis yang ditandai dengan kondensasi kromatin, degradasi DNA dan pembentukan *bleb* pada membran plasma dan nukleus. TGF- β menstimulasi apoptosis osteoklas dan inhibisi apoptosis osteoblas. Mekanisme apoptosis pada osteoklas masih belum diketahui dengan jelas.

Pada sel osteoblas manusia dan binatang, IL-6 menunjukkan efek antiapoptotik, *in vitro* menunjukkan antagonis efek proapoptotik dari glukokortikoid (Manolagas, 2000).

2.4 Apoptosis

Apoptosis yang juga dikenal sebagai *programmed cell death*, terjadi normal selama proses perkembangan dan penuaan sebagai mekanisme homeostatik untuk memelihara populasi sel dalam jaringan. Apoptosis juga terjadi sebagai mekanisme pertahanan, misalnya reaksi imun atau apabila sel rusak akibat penyakit atau agen perusak. Walaupun ada berbagai jenis rangsangan dan keadaan, baik fisiologik maupun patologik, tidak semua sel harus mati sebagai respons terhadap rangsangan yang sama. Beberapa hormon seperti kortikosteroid dapat menyebabkan apoptosis pada beberapa jenis sel walaupun jenis sel lain tidak terkena dampak atau bahkan terstimulasi. Pada beberapa kasus, jenis dan derajat stimulus menentukan apakah sel akan mati melalui apoptosis atau nekrosis. Pada

dosis rendah, berbagai jenis stimulus seperti suhu tinggi, radiasi, hipoksia dan obat sitotoksik anti kanker dapat menginduksi apoptosis, tetapi stimulus yang sama dengan dosis tinggi dapat berakibat nekrosis (Elmore, 2007).

Apoptosis perlu dibedakan dari jenis kematian sel yang lain yaitu nekrosis. Nekrosis adalah kematian sel tidak terkontrol yang diinduksi oleh kehilangan ATP atau gangguan pompa membran mitokondria, walaupun nekrosis juga dapat diinduksi oleh apoptosis (nekrosis sekunder). Ada bukti bahwa TNF-R yang merupakan salah satu *death receptor* untuk apoptosis juga dapat memediasi nekrosis, demikian pula bahwa TRAF2 dan FADD (*Fas-associated death domain* dalam jalur apoptosis) dapat bertindak sebagai mediator untuk produksi ROS pada nekrosis (Kim, 2006).

Apoptosis merupakan proses aktif, terkoordinasi, dan merupakan bergantung kepada energi (*energy-dependent*) yang melibatkan aktivasi *caspase* (golongan protease *cystein*) melalui kaskade kompleks yang menghubungkan stimulasi awal dengan kematian sel (Derakhsan, 2007; Ghavani, 2009). Akhir-akhir ini juga terbukti bahwa selain *cystein protease* (*caspase*), golongan *non-caspase-protease* yaitu *serine-protease* juga berperan dalam apoptosis, namun besar kemungkinan bahwa non-caspase protease ini tidak bertindak sebagai eksekutor apoptosis melainkan mengamplifikasi dan mempercepat terjadinya apoptosis (Elmore, 2007; Schroder, 2010).

Homeostasis jaringan tidak hanya tergantung pada pertumbuhan dan proliferasi sel tetapi juga pada keseimbangan antara sel yang hidup dan sel yang mati. Apoptosis adalah suatu proses fisiologis yang dikendalikan dengan kontrol genetik yang ketat, berlangsung melalui proteolisis,

kondensasi dan fragmentasi DNA disusul dengan pengerutan sel. Secara biokimiawi terjadi banyak fragmen dengan panjang berbeda. Proses ini berakhir dengan dimakannya sel tersebut oleh sel yang berada di sekitarnya misalnya makrofag, tanpa merangsang respons inflamasi. Tidak terjadinya inflamasi pada proses apoptosis disebabkan: 1) sel apoptotik tidak melepaskan isi sel ke jaringan sekitarnya; 2) sel yang mengalami apoptosis dengan cepat difagositosis oleh makrofag untuk menghindari nekrosis sekunder, dan 3) sel yang menelan badan apoptotik tidak menghasilkan sitokin pro-inflamasi. Seperti disebut di atas apoptosis merupakan proses penting baik dalam perkembangan jaringan normal maupun homeostasis jaringan pada orang dewasa (Ghavani, 2009).

Mekanisme terjadinya apoptosis sangat kompleks dan canggih melibatkan suatu kaskade aktivasi berbagai molekul bergantung energi (*energy dependent*). Saat ini diketahui ada 2 jalur utama apoptosis yaitu jalur ekstrinsik atau jalur reseptor kematian (*death receptor pathway*) dan jalur intrinsik atau jalur mitokondria. Walaupun demikian ada bukti bahwa kedua jalur itu terhubung satu dengan lain dan bahwa molekul di jalur yang satu dapat mempengaruhi molekul di jalur yang lain. Selain itu ada jalur tambahan yang melibatkan sitotoksitas yang dimediasi oleh sel T dan pembunuhan sel yang bergantung pada perforin/granzim (Goping, 2003).

Jalur ekstrinsik yang mengawali apoptosis melibatkan interaksi yang dimediasi oleh reseptor transmembran, mencakup antara lain reseptor kematian (*death receptor*) keluarga TNF. Reseptor dari keluarga ini memiliki domain ekstrasel yang kaya akan *cystein* dan memiliki domain sitoplasmik yang disebut *death domain* yang berperan penting dalam meneruskan sinyal

kematian dari permukaan sel ke jalur sinyal intrasel. Saat ini telah diketahui ada beberapa jenis ligand untuk masing-masing reseptor yang karakteristik dan fungsinya sudah jelas, yaitu Fas/FasR, TNF α /TNFR, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 dan Apo2L/DR5. Urutan peristiwa yang terjadi pada jalur ekstrinsik dimulai dengan pengikatan ligand, misalnya FasL dengan FasR, disusul dengan rekrutmen protein adapter sitoplasmik yang merupakan *death domain* yang berikatan dengan reseptor tersebut. Pada jalur TNF/TNFR protein adapter yang terikat adalah TRADD (*TNF receptor associated death domain*). TRADD kemudian berikatan dengan *pro-caspase-8*. Setelah *caspase-8* diaktivasi, terjadi stimulasi fase eksekusi. Apoptosis yang dimediasi oleh reseptor kematian dapat dihambat oleh protein yang disebut FLIP yang mengikat *caspase-8* sehingga keduanya menjadi tidak efektif (Elmore, 2007).

Jalur intrinsik yang mengawali apoptosis melibatkan sejumlah besar stimulus yang tidak dimediasi reseptor (*non-receptor-mediated*), yang menghasilkan sinyal intraseluler yang langsung beraksi dengan sasaran intrasel dan berkaitan erat dengan mitokondria. Stimulus yang mengawali jalur intrinsik menghasilkan sinyal intrasel yang dapat berupa sinyal negatif atau sinyal positif. Sinyal negatif terjadi pada kondisi ketiadaan faktor pertumbuhan, sitokin atau hormon tertentu yang menyebabkan kegagalan supresi program kematian, sehingga berakibat kematian, sedangkan sinyal positif diantaranya dihasilkan oleh radiasi, toksin, hipoksia, hipertermia, infeksi virus atau radikal bebas. Semua stimulus ini menyebabkan perubahan pada pori membran mitokondria sehingga menjadi permeabel dan dilepaskannya 2 kelompok protein pro-apoptotik ke dalam sitosol. Kelompok pertama terdiri

atas *cytochrome-c*, Smac/DIABLO, dan *serine protease* HtrA2/Omi. Protein ini mengaktivasi jalur mitokondria yang bergantung pada *caspase*. Cytochrome – c mengikat Apaf-1 dan *pro-caspase-9* dan membentuk apoptosom. Smac/DIABLO dan HtrA2/Omi mempromosikan apoptosis dengan cara menghambat IAP (*inhibitor of apoptosis protein*). Kelompok kedua adalah AIF, endonuklease G dan CAD, yang dilepaskan pada saat sel akan mengalami apoptosis. Pengontrolan dan pengaturan proses dalam jalur mitokondria dilakukan melalui keluarga protein BCL2 (Elmore, 2007).

Proses apoptosis dapat dibagi dalam tiga fase, yaitu: fase inisiasi atau induksi heterogen yang tergantung pada stimulus, fase efektor atau komitmen di mana diambil keputusan untuk "bunuh diri", dan fase degradasi atau eksekusi di mana sel yang bersangkutan memperlihatkan gambaran biokimia dan morfologi apoptosis. Selama fase induksi atau inisiasi yang heterogen, sel menerima stimulus yang menginduksi kematian, kehilangan berbagai faktor yang menunjang ketahanan hidup, kekurangan suplai untuk metabolisme dan terjadi pengikatan reseptor yang meneruskan sinyal kematian. Reaksi kimia yang berperan dalam fase induksi ini sangat heterogen bergantung pada seberapa *lethal* stimulus yang diterimanya. Pada fase berikutnya, yaitu fase efektor, proses inisiasi dilanjutkan dengan reaksi metabolik dengan pola yang lebih teratur, dan sel mengambil keputusan atau komitmen untuk "bunuh diri". Pada fase selanjutnya, yaitu fase degradasi atau fase eksekusi, terjadi berbagai peningkatan aktivasi berbagai enzim katabolik dan produksi *reactive oxygen species* (ROS). Caspase-3 merupakan *executioner caspases* terpenting yang diaktifkan oleh beberapa initiator caspases seperti caspase-8, caspase-9 atau caspase-10. Pada fase ini

perubahan morfologi dan biokimia sel, diantaranya fragmentasi DNA, degradasi berbagai jenis protein dan lain-lain menjadi lebih jelas. Semua sel mengalami apoptosis menurut pola tertentu dan mengandung inhibitor sintesis protein *cycloheximide*, yang menunjukkan bahwa sel tersebut mengekspresikan semua komponen protein yang diperlukan untuk mengeksekusi kematian sel (Elmore, 2007; Ghavani 2009).

2.5 Latihan Fisik

Menurut *Webster's Ninth New Collegiate Dictionary*, ada tiga definisi penting tentang latihan fisik: (1) penggunaan organ tubuh secara teratur dan berulang, (2) penggunaan tubuh untuk kepentingan perkembangan dan menjaga kebugaran tubuh, dan (3) sesuatu yang dilakukan dan dipraktikkan untuk mengembangkan, memperbaiki, atau menunjukkan kekuatan atau keahlian khusus. Latihan fisik adalah aktifitas fisik yang berulang dan bertujuan memelihara, meningkatkan atau mengekspresikan kebugaran tubuh. Program latihan fisik adalah serangkaian latihan fisik dengan tujuan meningkatkan kebugaran (Robergs, 2003).

Setiap aktivitas fisik yang dilakukan oleh seseorang akan menuju ke perubahan secara anatomis, fisiologis, biokimiawi, dan psikologis. Efisiensi aktivitas fisik tergantung dari durasi, jarak dan jumlah repetisi (volume); beban dan kecepatan (intensitas); dan frekuensi (densitas). Sebagai komponen utama latihan, volume merupakan persyaratan kuantitatif yang diperlukan untuk meraih keuntungan fisik yang tinggi (Bompa, 1994).

Intensitas latihan adalah komponen penting dalam latihan merupakan komponen kualitatif dari kerja yang dilakukan dalam periode waktu tertentu sehingga semakin banyak kerja yang dilakukan per unit waktu semakin tinggi intensitasnya. Derajat intensitas diukur sesuai dengan jenis latihan. Latihan kecepatan diukur dalam meter/detik (m/det), latihan ketahanan diukur dalam kilogram (kg) atau kgm (satu kilogram beban terhadap satu meter melawan gravitasi) (Bompa, 1994).

Ada beberapa metoda untuk mengukur kekuatan rangsangan atau intensitas antara lain tampak pada tabel 2.1. Pada latihan yang dilakukan melawan ketahanan, 105% menunjukkan beban maksimal seorang atlet tidak dapat lagi melakukan gerakan kecuali isometrik.

Tabel 2.1. Skala intensitas pada olahraga kecepatan dan kekuatan (Bompa, 1994)

Nomor Intensitas	Persentase Penampilan Maksimum	Intensitas
1	30-50%	Ringan
2	50-70%	Sedang
3	70-80%	Menengah
4	80-90%	Submaksimum
5	90-100%	Maksimum
6	100-105%	Supermaksimum

Metoda alternatif untuk mengevaluasi intensitas berdasar pada sistem energi yang digunakan sebagai bahan bakar aktivitas. Klasifikasi ini paling tepat untuk olahraga siklik seperti pada tabel 2.2.

Tabel 2.2. Lima zona intensitas untuk olahraga siklik (Bompa, 1994)

Nomor zona	Durasi kerja	Intensitas	Sistem produksi energi kerja	Ergogenesis %	
				An-aerobik	Aerobik
1	1-15 detik	Lebih batas maksimum	<i>ATP-CP</i>	100-95	0-5
2	15-60 detik	Maksimum	<i>ATP-CP</i> dan <i>LA</i>	90-80	10-20
3	1-6 menit	Submaksimum	<i>LA</i> + aerobik	70-(40-30)	30-(60-70)
4	6-30 menit	Sedang	Aerobik	(40-30)-10	(60-70)-90
5	Lebih 30 menit	Ringan	Aerobik	5	95

Keterangan: *ATP-CP* = Adenosine triphosphate – creatine phosphate
LA = Lactic acid

Tubuh mempunyai kemampuan untuk merespon dan beradaptasi terhadap penambahan dosis latihan fisik, bila penambahan dosis tersebut terlalu mendadak dan terlalu besar akan menyebabkan tubuh mengalami distress. Penentuan dan penerapan dosis yang tidak adekuat akan menimbulkan cedera atau stresor pada sistem tubuh (Bompa, 1994).

Dosis latihan fisik meliputi: frekuensi, intensitas, waktu dan bentuk latihan. Intensitas menunjuk pada kecepatan dan kekuatan latihan fisik yang dilakukan atau dengan kata lain seberapa berat latihan fisik dilakukan (Howard, 2000), biasanya diukur dengan menggunakan satuan denyut nadi maksimal (*Maximum Heart Rate/MHR*) atau volume oksigen maksimal (*VO₂ max*) yang dibutuhkan. Berdasar satuan denyut nadi dan juga *VO₂ max* intensitas latihan fisik dibagi menjadi 4 yaitu:

1. Intensitas rendah, yaitu bila mencapai 28-50% $VO_2 max$ dan 50-66 MHR.
2. Intensitas sedang, yaitu bila mencapai 60-70% $VO_2 max$ dan 70-78 MHR
3. Intensitas tinggi, yaitu bila mencapai 70-80% $VO_2 max$ dan 80-90 MHR
4. Intensitas sangat tinggi, yaitu bila mencapai 83-100% $VO_2 max$ dan 90-100 MHR

Berdasarkan penelitian pada manusia dan hewan, untuk mencapai hasil yang maksimal maka latihan fisik untuk kesehatan tulang umumnya dilakukan dengan intensitas sedang, dengan frekuensi yang dianjurkan adalah 3-5 kali/minggu dengan lama waktu (durasi) 30-60 menit (Kemmler, 2002; Umemura, 2002; Kohort, 2004). Dapat diartikan bahwa latihan fisik di bawah atau di atas intensitas tersebut justru akan berakibat negatif terhadap kesehatan tulang.

2.6 Latihan Fisik dan Aksis Hipotalamus Pituitari Adrenal (aksis HPA)

Efisiensi latihan fisik sesungguhnya tergantung pada intensitas, volume dan lama rangsangan latihan. Ketidakseimbangan antara latihan fisik dan pemulihan serta stresor lain pada individu yang toleran akan mempengaruhi terjadinya sindroma *overtraining*. Sindroma ini ditunjukkan dengan hilangnya penampilan fisik bersamaan dengan munculnya kelelahan fisik (Warren, 2000).

Menurut Wittert dalam Warren, 2000, respons terhadap berbagai rangsangan dari luar antara lain stres fisik, emosi, nutrisi dan *overtraining*

akan diterima sebagai ancaman terhadap homeostasis (stres), yang terjadi karena aktivasi sistem saraf otonomik dan peningkatan kortisol plasma sebagai akibat aktivasi hipotalamus-pituitari-adrenal (HPA) aksis. Hormon hipotalamus *corticotropin releasing hormone* (CRH) dan *arginine vasopressin* (AVP) adalah regulator utama *corticotropin* (*adrenocorticotrophic hormone*; ACTH) yang disekresi dari kelenjar pituitari anterior. ACTH pada gilirannya akan merangsang produksi dan pelepasan kortisol dari zona fasikulata korteks adrenal dengan kecepatan sekitar 12-15 mg/m²/hari pada dewasa nonstres. Kurang lebih 90-93% kortisol yang bersirkulasi terikat pada protein, *cortisol binding globulin* (CBG), dan hanya fraksi bebasnya yang dapat larut melalui membran sel dan menyebabkan efek biologis. Kadar kortisol plasma mencapai puncaknya pada saat bangun dan titik terendah sekitar tengah malam dan mencapai titik terendah pada tengah malam. Sifat dan durasi stres dapat mengubah sensitivitas umpan balik kortisol pada manusia. Sebagai contoh aktivitas fisik berat dapat mempengaruhi sensitivitas limfosit perifer. Terdapat bukti bahwa perbedaan respon HPA aksis terhadap latihan intensif antar individu mungkin berkaitan dengan perbedaan sensitivitas glukokortikoid (Bompa, 1994; Warren, 2000; Wilmore, 2008).

Efek dari aksis HPA, CRH (*Corticotropin Releasing Hormone*) mengatur aktivitas sistem saraf simpatis seperti pada banyak perubahan tingkah laku yang terjadi selama stres. Di pituitari anterior, CRH berasal dari neuron pada divisi *parvicellular* dari nukleus *paraventricular* (PVN), merangsang sintesa ACTH melalui pengaruh transkripsi gen *proopiomelanocortin* (POMC). Gen CRH mempunyai *estrogen-respon elemen*

fungsi pada wanita, dan di hipotalamus mempunyai kadar CRH lebih tinggi dari pada pria. Estradiol menurunkan ikatan reseptor glukokortikoid. Ada bukti untuk peningkatan sistem stres sentral pada wanita dan hewan mempunyai kadar kortisol basal lebih tinggi daripada laki-laki (Warren, 2000).

Aktivitas fisik intensif mempengaruhi peningkatan aktivitas aksis HPA tetapi mekanisme latihan fisik mengaktivasi aksis HPA belum sepenuhnya jelas. Latihan fisik lebih mempengaruhi sekresi ACTH dan kortisol daripada CRH sendiri.

Peningkatan laktat plasma dilibatkan sebagai salah satu mekanisme yang bertanggung jawab terhadap aktivasi aksis HPA sepanjang latihan. Mediator humoral lain seperti angiotensin II dan interleukin yang meningkat selama latihan juga mampu mengaktivasi aksis HPA tetapi bagaimanapun mekanisme selama latihan masih belum jelas.

Hipotesis stres menekankan bahwa latihan fisik akan mengaktifkan hipotalamus pituitari adrenal axis dimana latihan fisik aerobik jangka panjang (*prolonged aerobic exercise*) tanpa tambahan glukosa sangat mengaktifkan aksis adrenal. Lebih jauh Selye, dalam Warren, 2000, menyatakan bahwa latihan fisik tersebut mempengaruhi anestrus dan atrofi ovarium pada tikus dengan lari kencang dalam jangka waktu lama, juga pada *forced swimming* dan *forced running*.

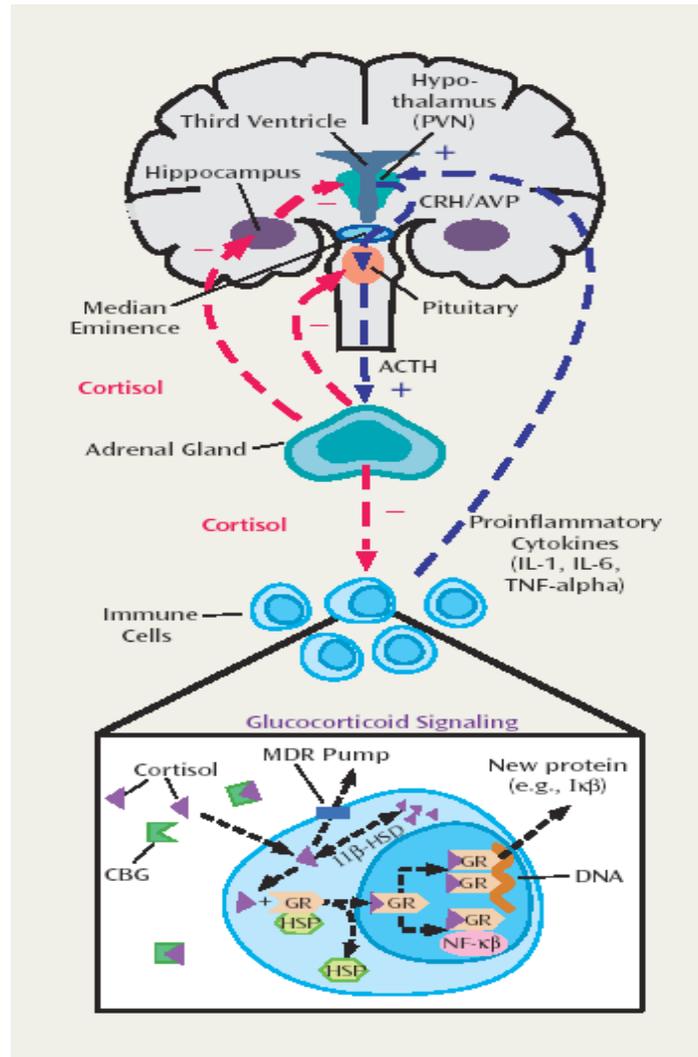
Kortisol menghambat aktivitas aksis HPA pada tingkat pituitari dan hipotalamus. Sensitivitas umpan balik kortisol adalah mekanisme penting dalam pengaturan aksis HPA. Sifat dan lama stres dapat meningkatkan

sensitivitas umpan balik kortisol pada manusia. Sebagai contoh, latihan fisik berat dapat mempengaruhi perubahan sensitivitas glukokortikoid di limfosit darah perifer. Perbedaan respon aksis HPA terhadap latihan intensitas berat antar individu mungkin berhubungan juga dengan perbedaan sensitivitas glukokortikoid.

Bila hewan dan manusia terpajan berbagai rangsangan yang mengganggu atau potensial mengganggu, terjadi peningkatan sekresi ACTH dan akibatnya terjadi peningkatan kadar glukokortikoid dalam darah yang penting untuk kelangsungan hidup. Konsentrasi ACTH plasma pagi hari pada seorang dewasa sehat yang beristirahat adalah sekitar 25 pg/mL (5,5 pmol/L). Selama stres berat, jumlah ACTH yang disekresikan melebihi jumlah yang diperlukan untuk menghasilkan pengeluaran glukokortikoid yang maksimal. Peningkatan sekresi ACTH untuk memenuhi kebutuhan dalam situasi darurat diperantarai hampir semata-mata oleh hipotalamus melalui pelepasan CRH. Polipeptida ini dihasilkan oleh neuron di nuklei paraventricularis. Polipeptida ini disekresikan di eminensia mediana dan disalurkan dalam pembuluh darah portal-hipofisis ke hipofisis anterior, tempat peptida ini merangsang sekresi ACTH. Bila eminensia mediana dirusak, peningkatan sekresi sebagai respons terhadap berbagai stres terhambat. Jalur saraf aferen dari berbagai bagian otak menyatu di nuklei paraventricularis. Serat nukleus amigdaloid memperantarai respons terhadap stres emosional, dan rasa takut, kecemasan, dan ketegangan menyebabkan peningkatan mencolok sekresi ACTH. Terdapat input inhibitorik dari baroreseptor melalui nukleus traktus solitarius. Bertentangan dengan teori yang dahulu, epinefrin dan norepinefrin

dalam sirkulasi tidak meningkatkan sekresi ACTH pada manusia, dan sekresi korteks adrenal dan medula adrenal secara independen diatur oleh hipotalamus (Ganong, 2004).

Glukokortikoid bebas menghambat sekresi ACTH, dan derajat inhibisi hipofisis setara dengan kadar glukokortikoid dalam darah. Efek inhibisi bekerja baik pada tingkat hipofisi maupun hipotalamus. Inhibisi ini disebabkan terutama oleh efek pada DNA, dan timbul inhibisi maksimal memerlukan waktu beberapa jam, walaupun selain itu terdapat "umpan balik cepat". Aktivitas berbagai steroid dalam menghambat ACTH setara dengan potensi glukokortikoidnya. Penurunan kadar glukokortikoid istirahat merangsang sekresi ACTH, dan pada insufisiensi adrenal kronik terjadi peningkatan mencolok kecepatan sintesis dan sekresi ACTH, seperti tampak pada gambar 2.3 berikut.



Gambar 2.3 Hipotalamus Pituitari Adrenal Aksis (Raison, 2003)

Sebagai tambahan efek HPA aksis, CRH mengatur aktivitas sistem saraf simpatis seperti beberapa perubahan kebiasaan yang terjadi sepanjang stres. Di pituitari anterior, CRH berasal dari neuron di *parvicellular* bagian dari nukleus *paraventricular* (PVN), merangsang sintesis, seperti sekresi ACTH oleh pengaruh transkripsi gen *proopiomelanocortin* (POMC). Beberapa neuron parvicellular yang mengandung CRH juga mengandung AVP. Hormon endogen penting untuk proses fisiologis dan adaptasi sepanjang aktivitas dan

mempengaruhi proses regenerasi oleh perubahan proses anabolik dan katabolik.

Lebih dari 15 tahun beberapa studi telah menunjukkan adanya perubahan akibat latihan fisik terhadap fisiologi sistem imun (Pedersen, 2000, Sherwood, 2001). Dampak latihan fisik pada pertahanan imun bergantung pada intensitas latihan. Latihan fisik yang lama dan berintensitas tinggi akan menekan pertahanan imun. Interaksi antara stres latihan fisik dan sistem imun memberikan wawasan yang menghubungkan fisiologi dasar dan klinik dan untuk mengevaluasi peran stres yang mendasari dan mekanisme imunofisiologi. Hal ini mendukung bahwa latihan fisik merupakan model stres fisik. Banyak stresor fisik klinis (pembedahan, trauma, luka bakar, sepsis) yang mirip dengan latihan fisik yang mempengaruhi pola respon imunologis dan hormonal. Salah satu respon hormonal adalah perubahan kadar glukokortikoid tubuh. Peningkatan konsentrasi kortisol (glukokortikoid utama) plasma hanya terjadi karena latihan dengan durasi yang panjang. Jadi latihan fisik dalam jangka pendek tidak meningkatkan konsentrasi kortisol plasma dan hanya terjadi sedikit perubahan konsentrasi yang berkaitan dengan stres. Secara umum, besarnya peningkatan konsentrasi kortisol plasma sebanding dengan intensitas rangsangan (Pedersen, 2000; Sherwood, 2001; Raison, 2003; Ganong, 2004; Plotkin, 2007).

Penelitian terkini semakin menunjang hipotesis bahwa latihan fisik yang melelahkan akan menekan pertahanan imun. Suatu survei pada 2300 pelari yang bertanding di Maraton Los Angeles 1987 menunjukkan peningkatan 60% hormon stres kortisol (Sherwood, 2001). Menurut Gatra, 30

September 1996, pelari nasional maraton Ruwiyati harus mengurangi porsi latihan larynya karena diduga mengalami osteoporosis, sehingga harus selalu didampingi dokter olahraga.

Efek dari kekuatan kontraksi otot dan efek beban akibat latihan fisik dapat menimbulkan kompresi (*compression*), tegangan (*tension*), dan *shear stress (fluid shear stress)* pada tulang. Hal ini diduga dapat berakibat terjadi perubahan struktur jaringan/sel seperti pada pemberian stimulasi mekanik terhadap kultur sel. Perubahan struktur jaringan atau sel yang dikenal sebagai *strain* dapat bekerja sebagai sinyal mekanik yang dapat menimbulkan respon biokimia pada osteoblas (Cullen, 2000).

2.7 Respon Hormonal terhadap Latihan Fisik

Latihan fisik sangat mempengaruhi perubahan sekresi hormon melalui: (1) perubahan rangsangan yang menyebabkan pelepasan hormon, (2) perubahan kemampuan sel merespon hormon, atau (3) perubahan kapasitas maksimal jaringan endokrin melepas hormon (Robergs, 2003).

Kelenjar pituitari adalah sebagai sumbu dalam pengaturan mobilisasi bahan, keseimbangan cairan dan fungsi ginjal, sintesis protein, dan fungsi gonad sepanjang latihan. Pengaturan utama metabolisme energi terjadi melalui katekolamin, dan kontrol primer regulasi glukosa darah oleh pankreas. Latihan fisik yang lama dan sekresi kortisol, hormon pertumbuhan, dan estrogen pada wanita juga mengubah metabolisme seluler dan regulasi glukosa darah. Pengetahuan fungsi hormonal terhadap latihan fisik, bagaimana tubuh dapat mentolerir dan kadang tidak terhadap berbagai tipe,

intensitas dan durasi dari latihan fisik masih perlu dikaji lebih lanjut (Robergs, 2003).

Pada manusia yang sehat, latihan fisik intensitas sedang dan tinggi dalam waktu yang lama (lebih kurang 12 minggu) akan meningkatkan konsentrasi serum kortisol dan kemudian akan kembali ke tingkat basal. Serum kortisol meningkat secara progresif dan pada $VO_2 \text{ max}$ 60% tampaknya menjadi nilai ambang kritis terjadinya peningkatan konsentrasi kortisol, walaupun batas tersebut tergantung pada durasi dan perbedaan antar individu (Chatzitheodorou, 2007).

Latihan fisik intensitas tinggi dan kronik menurut penelitian Pederson (2000) adalah melakukan latihan *forced exercise* pada mencit C3H jantan selama 9 minggu dengan cara *treadmill running* (15 m/menit, 30 menit/hari) dibandingkan dengan *sedentary control* dan *treadmill control group* (5 m/min, 5 min/hari). Pada penelitian lain pada atlet elit yang berlari di *treadmill* selama tiga jam dengan kecepatan seperti perlombaan lari memperlihatkan peningkatan 60% hormon kortisol (Pederson, 2000; Sherwood, 2004). Pemberian glukokortikoid kronik pada tikus akan menurunkan mRNA GHRH hipotalamus. Glukokortikoid menekan fungsi GHRH dan sintesis peptida sehingga menghambat sekresi GH (Giustina, 1998).

Regulasi hormon terhadap metabolisme energi tergantung pada intensitas dan durasi latihan. Epinefrin dan norepinefrin meningkat eksponensial karena peningkatan intensitas latihan. Peningkatan katekolamin merangsang lipolisis pada muskuloskeletal dan jaringan adiposa dan meningkatkan aktivitas fosforilase, dimana katalisis glikogen (meningkatkan

glikogenolisis) dalam sistem muskuloskeletal dan hepar. Pada latihan fisik intensitas sedang sampai maksimal, kadar insulin dan glukagon akan menurun pada awalnya, kemudian kembali ke nilai basal saat istirahat. Pada pemberian latihan fisik intensitas submaksimal, latihan fisik ketahanan (*endurance training*) menurunkan konsentrasi katekolamin, hormon pertumbuhan dan kortisol dalam darah (Robergs, 2003).

Tulang dipengaruhi oleh rangsangan mekanik dan hormonal. Jalur mekanik melibatkan peran *Ocy* sebagai sel mekanoreseptor terhadap *fluid shear stress* yang timbul akibat gaya mekanik pada tulang. *Ocy* mengendalikan remodeling tulang secara langsung maupun tidak langsung. Jalur hormonal melibatkan hormon estrogen dan paratiroid. Defisiensi estrogen akan menyebabkan peningkatan umur osteoklas dan penurunan pengontrolan aktivitas osteoklas sehingga menyebabkan peningkatan *bone loss*, serta penurunan pembentukan osteoblas dan peningkatan apoptosis osteoblas sehingga terjadi penurunan pembentukan tulang. Sedangkan hormon paratiroid dapat bersifat anabolik atau katabolik, namun mekanismenya belum jelas (Selim, 2006; Bouassida, 2006).

Pada wanita yang secara biologis bisa menstruasi tetapi tidak mendapatkannya, disebut dalam keadaan amenore. Bila penyebab amenore adalah berhubungan langsung dengan latihan fisik maka keadaan ini disebut atletik amenore. Penjelasan mekanisme ini masih belum jelas, tetapi diketahui bahwa atletik amenore karena perubahan pelepasan LH dan FSH yang ditunjukkan dengan ketidakteraturan sekresi LH dan FSH pada regulasi

hipotalamus pituitari aksis dan juga diawali oleh penurunan masa fase luteal (Robergs, 2003).

2.8 Latihan Fisik pada Wanita

Gen CRH mempunyai elemen yang bereaksi terhadap fungsi estrogen, dan pada wanita, hipotalamus mempunyai kadar CRH lebih tinggi dari pria. Estradiol menurunkan ikatan reseptor glukokortikoid (Warren, 2000). Hormon sex khususnya estradiol dan testosterone menurun pada penderita yang mendapat terapi steroid dosis tinggi (Montecucco C, 1992). Secara farmakologis penggunaan glukokortikoid juga berhubungan dengan hambatan absorpsi kalsium intestinal. Penurunan kalsium intestinal merangsang kelenjar paratiroid untuk melepas hormon paratiroid, tetapi peran paratiroidisme sekunder pada osteoporosis karena glukokortikoid belum jelas (Bronner, 2005).

Defisit energi pada atlet wanita menyebabkan perubahan metabolisme insulin, hormon pertumbuhan, *insulin-like growth factor-1*, leptin, kortisol dan hormon tiroid, yang semuanya penting dalam metabolisme tulang dan merupakan faktor independen terhadap status estrogen dalam mempengaruhi massa tulang (Madden, 2010).

Latihan fisik menahan beban (*weight-bearing*) yang inadkuat merupakan salah satu faktor risiko osteoporosis selain umur, kurus (berat badan kurang dari 127 *pound*), perokok, menggunakan terapi kortikosteroid lebih dari 3 bulan, defisiensi estrogen, asupan rendah kalsium sepanjang hidup, sejarah fraktur fragil, genetik Kaukasia atau Asia, peminum alkohol lebih dari 2 gelas per hari (Madden, 2010).

Sejak usia kira-kira 30 tahun pada wanita dan 45 tahun pada pria, massa tulang dan elastisitas tulang akan menurun secara bertahap. Pada wanita khususnya, dapat berkembang menjadi osteoporosis yang akan menyebabkan perubahan bentuk tubuh yang parah dan pada beberapa kasus akan menyebabkankematian karena komplikasi fraktur tulang osteoporotik. Penyebab osteoporosis masih belum jelas, para peneliti menduga bahwa salah satu penyebab utama adalah kesalahan stres mekanik (Watkins , 2010).

Penurunan kadar estrogen pada wanita tidak mengubah aktivitas formasi tulang tetapi meningkatkan resorpsi tulang, karena resorpsi tulang dihambat oleh estrogen. Sepanjang hidup wanita kehilangan 50% masaa tulang trabekuler, dan sebagian besar berhubungan dengan defisiensi estrogen (Ehrman, 2009).

2.9 Latihan Fisik pada Hewan Percobaan

Penelitian tentang latihan fisik lebih efektif bila dilakukan pada manusia sebagai obyek, tetapi ini tidak selalu bisa bila dilakukan apabila menggunakan tindakan *invasive* yang melanggar etik, sehingga digunakan hewan ketika menggunakan manusia sebagai obyek penelitian akan berakibat buruk (Kregel, 2006).

Aktivasi sistem saraf simpatis dan aksis HPA karena latihan fisik menyebabkan perubahan fisiologis yang digambarkan sebagai respons terhadap stres. Banyak pustaka yang isinya menyatakan bahwa regulasi aktivasi respons stres akut melibatkan berbagai aspek dari respon *fight-or-*

flight. Contoh stimulasi sistem saraf simpatis dan aksis HPA adalah pada peningkatan tekanan darah, mobilisasi energi, dan peningkatan beberapa respon imun. Rangsangan kronik terhadap sistem simpatis dan aksis HPA akan meningkatkan kekakuan vaskular, menekan sistem imun, menurunkan ketahanan terhadap virus, mempengaruhi kejadian ulkus, dan kerusakan otak. Banyak faktor yang mempengaruhi respon stres latihan fisik antara lain umur, gender, status kesehatan, kondisi tempat tinggal. Jenis latihan fisik yang mempengaruhi respon stres meliputi intensitas, frekuensi, dan durasi. Lingkungan baru bagi hewan percobaan juga memicu respon stres, oleh karena itu harus dilakukan pengendalian terhadap lingkungan dan kebiasaan baru tersebut. Kontrol terhadap kebiasaan baru tersebut dapat dimaksimalkan dengan memilihkan waktu, kecepatan dan lama latihan (Kregel, 2006).

Untuk meminimalisasi respons stres hewan coba dipapar latihan berulang untuk mengenal jenis latihan dan lingkungan baru sebelum dilakukan latihan yang sesungguhnya. Fisiologis respons stres adalah kompleks antara lain melibatkan proses molekuler, seluler, fisiologis, dan kebiasaan. Beberapa tanda stres kronik seperti pembesaran kelenjar adrenal atau ulkus, tidak boleh terjadi. Oleh karena itu harus diperiksa keadaan organ dalam hewan setelah *euthanasia* dan protokol latihan harus dipertimbangkan lagi untuk penelitian berikutnya apabila diperlukan (Kregel, 2006).

Pada saat renang, tikus mempunyai kecenderungan untuk menyelam atau mengapung, tidak berenang terus menerus sebagai strategi menghindari stres karena tenggelam. Untuk itu peneliti harus meminimalisasi hal tersebut dengan memperhitungkan kedalaman air supaya tikus tidak menyelam. Penelitian Kawanaka (1998) menggunakan tangki bundar dengan kedalaman

air 50 cm. Kregel (2006) menyebutkan kedalaman air minimal 100 cm untuk mengurangi hewan menyelam. Berdasar beberapa penelitian terdahulu menggunakan kedalaman air 50 cm tidak mengalami hambatan. Apabila tikus selalu menyelam dan tidak bisa dihindari lagi maka harus dikeluarkan dari obyek penelitian (Kregel, 2006).

Perlakuan yang diberikan adalah latihan fisik renang. Renang merupakan jenis latihan yang murah dan tidak membutuhkan peralatan khusus seperti alat *treadmill* atau *wheel running*. Peneliti harus berhati-hati memilih kontainer tempat tikus berenang, termasuk temperatur dan kedalaman air. Selain itu bila dibandingkan dengan *treadmill* atau *wheel running*, renang mempunyai kelebihan tidak menyebabkan cedera kaki, sehingga renang menyebabkan trauma fisik yang kecil bagi hewan (Kregel, 2006). Tangki berbentuk bundar lebih baik daripada segiempat karena hewan tidak bisa bergantung dan mengurangi intensitas renangnya. Tangki harus mempunyai kedalaman yang cukup untuk menghindari hewan menyelam, permukaan air ke mulut tangki harus cukup tinggi supaya hewan tidak melompat keluar, dan permukaan air cukup luas agar hewan bebas berenang, lebih kurang permukaan area 1000 -1500 cm². Bahan yang jernih lebih baik dari yang *opaque* untuk memudahkan melihat apabila tikus kelelahan. Meskipun begitu kedua bahan tersebut tidak akan mempengaruhi performa hewan. Cara tikus berenang berbeda-beda tetapi harus selalu dipertahankan agar terus menerus berenang untuk memenuhi latihan dengan intensitas tertentu. Tipe lain berenang – meliputi mengambang, mendaki, menyelam – tidak sesuai untuk penelitian latihan akut atau kronis karena tipe latihan ini akan menyebabkan hipoksia. Apabila tidak bisa dicegah maka

hewan ini harus dikeluarkan dari data penelitian karena akan menjadi faktor pengganggu yang mempengaruhi interpretasi hasil. Berenang secara terus menerus juga akan membuat gerakan terus menerus pada tungkai depan dan belakang dan menjaga moncong hewan ke atas permukaan air. Latihan renang ini termasuk latihan intensitas ringan bila tanpa beban dan akan menjadi latihan intensitas sedang atau tinggi bila diberi beban yang diikatkan pada ekor. Latihan renang akan mendapatkan tenaga baru yang bermakna dari kedua otot tungkai depan dan belakang, walaupun pola pengambilan tenaga berbeda seperti pada lari treadmill, berdasar pada penipisan glikogen dan aliran darah otot skelet, sehingga tikus tidak menjadi hipoksis. Tangki air dibuat cukup dalam supaya tikus tidak dapat mencapai dasar tangki, dengan demikian tikus akan berenang terus menerus hingga akhir latihan. Setelah latihan tikus harus dikeringkan dan diletakkan di tempat yang hangat. Untuk meningkatkan intensitas renang, peneliti dapat menambahkan beban yang diikatkan pada badan atau ekor (biasanya pada ekor). Jumlah beban yang diberikan berdasar perhitungan total berat badan dan harus dapat mengikuti gerakan renang secara terus menerus. Sebagai contoh bila beban 2% berat badan yang diikatkan 2 *inch* dari akhir ekor, $VO_2 \text{ max}$ adalah 81 ml/menit/kg, dimana normal adalah 85-100 ml/menit/kg (Kregel, 2006).

Renang dapat digunakan untuk mengidentifikasi fisiologi, biokimia dan respon molekuler terhadap tekanan latihan fisik akut dan adaptasi terhadap latihan kronik. Untuk menambah respon latihan dapat dilakukan dengan mengubah frekuensi, durasi, dan intensitas setiap latihan renang. Tikus dapat direnangkan sekali atau beberapa kali per hari dan setiap hari per minggu. Intensitas latihan renang dapat ditingkatkan dengan sejumlah beban

yang dikaitkan pada ekor (Kregel, 2006). Pada umumnya latihan renang pada tikus mempunyai efek akut yang sama dengan *treadmill* atau *wheel running*. Sepanjang latihan, frekuensi detak jantung dan konsumsi oksigen meningkat dan kecepatan sekresi insulin dan glukagon konsisten dengan peningkatan penggunaan otot, pengeluaran energi dan aktivitas sistem saraf simpatis. Sekresi kortikosteron juga meningkat setelah latihan renang baik satu kali atau sampai terjadi kelelahan. Latihan renang juga menghasilkan adaptasi muskuloskeletal seiring dengan peningkatan ketahanan sampai kelelahan.

Menurut penelitian Kawanaka (1998), beban 3% berat badan dan direnangkan selama 10, 30, 120 menit adalah renang dengan intensitas ringan, sedangkan beban 18% berat badan selama 20 detik, satu kali berenang per menit, diulang 1, 3 atau 8 kali adalah latihan dengan intensitas tinggi. Pada akhir latihan intensitas tinggi, konsentrasi laktat darah meningkat bermakna dibanding pada saat istirahat (Kawanaka, 1998).

Dosis latihan pada tikus tidak dapat diukur dengan *VO2 max* atau maksimal *Heart Rate* seperti pada manusia sehingga dipakai ukuran Kerja Maksimal yaitu dengan mengukur waktu atau beban latihan. Dosis latihan tergantung pada: modus, intensitas dan durasi. *Forced swimming* adalah suatu stresor kuat yang mengkombinasikan aspek stresor fisik (perubahan suhu badan, aktivitas motorik) dan psikis (gelisah, panik). Stres menyebabkan peningkatan konsentrasi glukokortikoid di atas pola sekresi sirkadian normal. Setelah stres fisik (pada tikus dengan fraktur tibia) terjadi peningkatan sekresi dalam waktu 4-20 menit kemudian (Guyton, 2006). Tinggi dan pola respon glukokortikoid plasma sangat tergantung pada stresor itu sendiri. Stresor mempunyai pengaruh yang berbeda pada berbagai aspek respons stres,

tergantung pada jenis dan berat stresor. Pada latihan fisik intensitas tinggi dengan *swim forced* akan menimbulkan peningkatan kadar glukokortikoid plasma (Kregel, 2006; Droste, 2008). Penelitian Droste (2008), semua sampel menunjukkan respon nyata terhadap *forced swimming* dengan peningkatan kadar kortikosteron dimulai setelah 15 menit sejak awal dipapar stresor dan mencapai kadar maksimal pada menit ke 50. Setelah mendapat paparan stresor, konsentrasi glukokortikoid segera kembali ke *baseline* menuju normal sirkadian (Droste, 2008).

2.10 Glukokortikoid dan Pengaruhnya terhadap Tulang

Glukokortikoid merupakan salah satu hormon korteks adrenal yang merupakan komponen esensial dalam proses adaptasi terhadap keadaan stres berat. Preparat sintetik yang analog dengan golongan hormon tersebut digunakan untuk keperluan terapi. Secara khusus, banyak preparat analog glukokortikoid merupakan obat antiinflamasi yang poten. Kadar di dalam plasma yang berlebihan atau kekurangan sebagai akibat penyakit maupun penggunaan terapeutik, akan menimbulkan berbagai komplikasi yang serius (Harper, 2001).

Korteks adrenal manusia dewasa memiliki tiga buah lapisan atau zona yang berbeda. Daerah subkapsular dinamakan zona glomerulosa dan berikatan dengan produksi mineralokortikoid. Zona fasikulata bersama zona retikularis menghasilkan kelompok glukokortikoid (Harper, 2001).

Hormon korteks adrenal adalah turunan kolesterol, yang mengandung inti siklopentanoperhidrofenantren (Ganong, 2004). Glukokortikoid merupakan

steroid 21-karbon yang mempunyai banyak fungsi dan di antaranya yang paling penting adalah untuk meningkatkan proses glukoneogenesis. Kortisol adalah glukokortikoid yang dominan pada manusia yang dibuat di zona fasikulata. Kortikosteron yang dibuat di zona fasikulata dan glomerulosa tidak sebanyak kortisol tetapi merupakan glukokortikoid yang dominan pada hewan pengerat (Harper, 2001). Kortisol adalah glukokortikoid utama yang berperan dalam metabolisme karbohidrat, protein, lemak dan berperan penting dalam adaptasi terhadap stres. Glukokortikoid juga memiliki banyak efek inhibitorik pada proses imun keseluruhan, misal menghilangkan sel darah putih yang bertanggung jawab menghasilkan antibodi dan menghancurkan sel asing. Penggunaan terapi glukokortikoid secara terus menerus dalam jangka panjang dalam dosis suprafisiologis akan menekan respon peradangan dan imunitas normal yang merupakan tulang punggung sistem pertahanan tubuh. Di samping itu glukokortikoid eksogen yang tinggi akan menimbulkan umpan balik negatif yang menekan sumbu hipotalamus-hipofisis anterior yang penting untuk mendorong sekresi glukokortikoid normal dan mempertahankan integritas korteks adrenal (Sherwood, 2004; Guyton, 2004)

Hanya sedikit simpanan hormon steroid di dalam sel adrenal (atau gonad) mengingat hormon ini akan dilepas ke dalam plasma ketika dibuat. Pelepasan kortisol terjadi secara berkala yang diatur oleh irama diurnal pelepasan ACTH. Sebagai konsekuensinya, kadar kortisol akan mencapai nilai tertinggi pada pagi hari segera setelah bangun tidur dan nilai terendah pada akhir sore harinya serta awal malam harinya (Guyton, 2006).

Kortisol, glukokortikoid utama, beredar dalam plasma dalam bentuk terikat protein dan bentuk bebas. Protein pengikat yang terutama di dalam plasma adalah α -globulin yang dinamakan transkortin atau *corticosteroid-binding globulin* (CBG). CBG diproduksi di hati dan ditingkatkan sintesisnya oleh estrogen. CBG mengikat sebagian besar hormon tersebut kalau kadar kortisol plasma berada dalam kisaran normal; kortisol dalam jumlah yang jauh lebih kecil terikat pada albumin. Kekuatan pengikatan membantu menentukan usia paruh biologik berbagai glukokortikoid. Kortisol terikat erat pada CBG dan memiliki $t_{1/2}$ 1,5 – 2 jam. Deoksikortikosteron dan progesteron berinteraksi dengan CBG dengan afinitas yang cukup untuk bersaing dalam pengikatan dengan kortisol. Fraksi bebas membentuk sekitar 8% dari jumlah total kortisol plasma dan merupakan fraksi kortisol yang biologik aktif (Guyton, 2006).

Kortisol dan metabolitnya membentuk sekitar 80% dari jumlah 17-hidroksikortikoid di dalam plasma; 20% lainnya terdiri atas kortison dan 11-deoksikortisol. Sekresi kortisol bergantung pada ACTH yang selanjutnya akan diatur oleh *corticotropin-releasing hormone* (CRH). Hormon ini berhubungan lewat lingkaran umpan balik negatif yang klasik (Ganong, 2004).

Glukokortikoid adalah hormon steroid, seperti molekul lipid lainnya bersifat hidrofobik yang tidak larut air. Sebagai hormon steroid berikatan dengan protein plasma untuk ditransportasikan dalam darah menuju jaringan target. Glukokortikoid tidak berikatan dengan reseptor membran sel tetapi dapat melalui membran sel dan berikatan dengan reseptor steroid sitoplasmik yang spesifik (Robergs, 2003).

Berbagai efek glukokortikoid terpicu oleh terikatnya hormon pada reseptor glukokortikoid, dan oleh kompleks steroid reseptor yang berperan sebagai faktor yang mentranskripsi segmen tertentu dari DNA. Kemudian melalui mRNA yang sesuai akan menyebabkan sintesis enzim yang mengubah fungsi sel. Selain itu, tampaknya terdapat efek nongenomik glukokortikoid (Ganong, 2004).

Glukokortikoid memengaruhi aktivitas beberapa *skeletal growth factor* dan sitokin, yaitu menurunkan *insulin-like growth factor (IGF)-I* dan *(IGF)-II receptor transcription*; ekspresi *IGF binding protein (IGFBP)-3,-4*, dan *-5*; dan meningkatkan transkripsi *IGFBP-6*. Juga mengaktifkan *transforming growth factor β* , tetapi mengubah ikatannya ke *nonsignal transducing betaglycan*. Walaupun efek *in vitro* telah diketahui tetapi mekanisme molekulernya masih belum dimengerti. Aktivitas glukokortikoid diperantarai oleh reseptor glukokortikoid yang spesifik (GRs). GRs adalah *ligand dependent DNA-binding nuclear protein* dan termasuk dalam superfamili dari reseptor steroid/tiroid/asam retinoat. GR pada manusia pertama kali diklon dan disekuensing oleh Hollenberg dkk. Mereka menunjukkan dua isoform reseptor, GR α and GR β , yang berbeda pada pada asam amino 727 dan mengandung tambahan 50 dan 15 asam amino *open reading frame* pada *carboxy termini*. Isoform α diekspresikan secara dominan di banyak jaringan dan berikatan dengan ligand dimana GR β tidak. Keberadaan GRs ditunjukkan pada *mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1)* dan pada sel osteoblas primer *in vitro* menggunakan studi ikatan ligand. Pada sel osteoblas manusia, tempat ikatan glukokortikoid deksametason beberapa kali lebih besar daripada

dihidrotestosteron, estradiol dan 1,25-(OH)₂ vitamin D₃. Bagaimanapun juga keberadaan GRs belum ditunjukkan pada tulang manusia *in situ* (Abu, 2000).

Glukokortikoid mempunyai efek yang kuat terhadap skeleton, tetapi mekanisme kavitas tulang karena glukokortikoid masih belum jelas. Pengaruh glukokortikoid terhadap metabolisme tulang melalui beberapa mekanisme yang berbeda. Mereka menghambat absorpsi gastrointestinal dan reabsorpsi kalsium tubulus renalis sehingga menghasilkan efek hiperparatiroidisme sekunder. Juga menyebabkan kekurangan hormon sex, mempengaruhi ekspresi c-fos dan p-53 di osteoblas dan mungkin meningkatkan metabolisme vitamin D. *In vitro*, glukokortikoid menurunkan replikasi sel preosteoblas tetapi meningkatkan diferensiasi maturitas osteoblas. Juga meningkatkan ekspresi kolagenase dan menurunkan ekspresi jaringan penghambat *metalloproteinase-1* yang memungkinkan peningkatan resorpsi tulang (Abu, 2000).

Glukokortikoid diproduksi dan dilepas oleh kelenjar adrenal sebagai respon terhadap stres, mengatur beberapa proses fisiologis jaringan. Di antaranya, hormon ini menimbulkan aksi imunosupresi dan anti inflamasi dan mempengaruhi apoptosis beberapa tipe sel antara lain limfosit T dan monosit. Oleh karena itu glukokortikoid digunakan secara luas untuk terapi sistem imun dan proses inflamasi. Bagaimanapun juga penggunaan glukokortikoid jangka panjang berhubungan dengan efek samping. Khususnya penggunaan terapi jangka panjang obat ini menyebabkan kehilangan mineral dan kekuatan tulang secara dramatis seiring dengan peningkatan glukokortikoid endogen (Manolagas, 2002; O'Brien, 2004).

Kejadian yang meningkat beberapa tahun terakhir ini menunjukkan peningkatan prevalensi apoptosis osteosit dan osteoblas yang berkaitan dengan sindroma fragilitas tulang yang disebabkan oleh glukokortikoid. Efek pro-apoptotik ini merupakan aksi langsung steroid pada sel *osteoblastic lineage*, yang telah ditunjukkan melalui penelitian terdahulu pada kultur sel osteosit dan osteoblas. Lebih jauh lagi, over ekspresi *11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2* - enzim yang menginaktivasi glukokortikoid – melindungi osteosit dan osteoblas dari fragilitas tulang karena glukokortikoid (Plotkin, 2007).

Pertahanan hidup sel dan perlekatan dikontrol oleh *focal adhesion kinase* yang terletak pada membran plasma dimana integrin berinteraksi dengan matriks ekstraseluler, struktur intraseluler dan molekul katalitik. Sinyaling yang diperantarai oleh integrin berlangsung dua arah. Carson (2000) menyatakan bahwa integrin memelihara dua peran penting yaitu: adhesi sel dan transduksi sinyal. Protein-protein matriks ekstraseluler mempengaruhi integrin dan mengaktifasi sinyaling intraseluler (*referred to as outside-in signaling*). Sebaliknya aktivasi sinyal intraseluler atau perubahan-perubahan komposisi *focal adhesion* mengatur interaksi integrin dengan protein matriks ekstraseluler (*referred to as inside-out signaling*). Domain ekstraseluler bertanggung jawab untuk ikatan terhadap ligan sedang domain sitoplasma berperan penting terhadap fungsi seluler. Ada beberapa protein ekstraseluler yaitu *fibronectin*, *vitronectin*, *fibrinogen* yang memiliki peran berinteraksi dengan reseptor integrin (Carson, 2000; Plotkin, 2005; Pellinen, 2006).

Mekanisme aksi glukokortikoid di tulang meliputi ikatan dengan reseptor spesifiknya yaitu reseptor glukokortikoid (GR α), perubahan konformasi, dan translokasi nukleus kompleks reseptor yang berikatan dengan ligan (*ligand-bound receptor*), diikuti oleh interaksi cis atau trans dengan DNA sehingga menyebabkan induksi atau represi transkripsi gen. Selain itu, glukokortikoid juga melakukan aksi yang tidak tergantung pada perubahan transkripsi gen, yaitu memodulasi aktivitas berbagai macam kinase seperti *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs), c-Jun N-terminal kinase (JNK), dan *proline-rich tyrosine kinase 2* (Pyk2). Pyk2, juga dikenal sebagai *related adhesion focal tyrosine kinase* (RAFTK), *cellular adhesion kinase β* , atau *calcium dependent tyrosine kinase*, adalah anggota *focal adhesion kinase* (FAK) dari banyak *non receptor tyrosine kinase*. Meski Pyk2 dan FAK sangat homolog, protein ini menunjukkan efek yang berlawanan, dimana aktivasi FAK menyebabkan persebaran sel dan pertahanan hidup, Pyk2 mempengaruhi reorganisasi sitoskeleton, kerusakan sel dan apoptosis. Stimulasi mekanik juga mendukung pertahanan osteosit melalui aktivasi FAK. Glukokortikoid meningkatkan apoptosis osteosit dengan mengaktifasi Pyk2 dan JNK, berlawanan dengan mekanisme pertahanan hidup oleh FAK. Pyk2 dan JNK saling berhubungan dimana glukokortikoid mengaktifasi Pyk2 dengan mempengaruhi influks kalsium ekstraseluler yang menyebabkan peningkatan cepat kalsium intraseluler sehingga pada gilirannya aktivasi Pyk2 ini akan mengaktifasi JNK yang menyebabkan kerusakan sel dan apoptosis. Apoptosis karena kerusakan sel disebut juga *anoikis*. Lane, 2006, menyatakan bahwa beberapa studi *in vitro* dan *in vivo* terdahulu menunjukkan bahwa glukokortikoid mempengaruhi osteoblas dan osteosit pada mencit dan

manusia. Weinstein dkk. (Lane, 2006) telah menemukan bahwa pemberian glukokortikoid pada mencit menyebabkan penurunan formasi tulang, meningkatkan resorpsi tulang dan meningkatkan apoptosis osteosit dan osteoblas. Aksi glukokortikoid ini terjadi melalui mekanisme yang diperantarai oleh reseptor, tetapi tidak tergantung pada transkripsi gen baru (Park dan Avraham, 2000; Lane NE, 2006; Plotkin, 2007).

Baik pria maupun wanita mulai kehilangan masa tulang setelah usia 40 tahun. Wanita mengalami fase kehilangan tulang yang lebih cepat pada 5-10 tahun pertama pasca menopause. Sesudah *osteoporosis pasca menopause*, *glucocorticoid-induced osteoporosis* (GIOP) merupakan *drug-induced osteoporosis* yang paling sering dijumpai. Dari segi komunitas, glukokortikoid digunakan oleh 0,2-0,5% populasi. Pasien dengan Reumatoid Arthritis, polymyalgia Rheumatica, temporal arthritis, dan penyakit rematik kronik yang lain merupakan 50% pengguna glukokortikoid di masyarakat. Di Indonesia angka tersebut belum diketahui (Suatmadji, 2001).

Dalam 6-12 bulan pertama terapi glukokortikoid dijumpai adanya kehilangan yang cepat (3-27%) BMD. Terutama tulang trabekula dan diikuti dengan tulang korteks. Dosis steroid yang kumulatif merupakan prediktor kehilangan massa tulang yang paling penting, sedangkan dosis alternatif tidak mempertahankan tulang. Sampai saat ini masih belum ada keseragaman tentang pengaruh glukokortikoid terhadap osteoblas, serta perbedaan pengaruh glukokortikoid pada siklus hidup osteoklas yang berbeda. Misalnya pada glukokortikoid meningkatkan pembentukan osteoklas dari sel progenitor sumsum tulang, sebaliknya meningkatkan apoptosis osteoklas matur.

Keseimbangan pengaruh yang berbeda tersebut masih dapat berbeda untuk konteks klinik yang satu dengan yang lain, serta dapat menimbulkan perbedaan dalam berbagai studi klinik (Suatmadji, 2001).

Berkurangnya pembentukan tulang dan osteonekrosis saat ini dapat dijelaskan dari berbagai bukti bahwa kelebihan glukokortikoid mempunyai efek supresi osteoblastogenesis di dalam sumsum tulang serta meningkatkan apoptosis osteoblas dan osteoklas. Pada mencit yang menerima glukokortikoid 4 minggu (setara dengan 3-4 tahun pada manusia), menunjukkan penurunan *bone mineral density* yang terkait dengan menurunnya jumlah osteoblas, osteoklas, progenitor di dalam sumsum tulang, dan pengurangan secara dramatis daerah tulang trabekular (Suatmadji, 2001).

Menurut penelitian Abu (2000), ketiadaan GRs dalam osteoklas dan ekspresinya yang tinggi di osteoblas pada tempat modeling dan remodeling sesuai dengan efek tidak langsung glukokortikoid pada osteoklas matur melalui aktivitas osteoblas. Hal ini didukung oleh hiperparatiroid sekunder oleh glukokortikoid yang menyebabkan *glukokortikoid-induced osteoporosis*. Lokasi GRs pada mononuklear sel di sumsum tulang yang mendukung peran glukokortikoid pada proses diferensiasi osteoklas. Penelitian ini menunjukkan bahwa glukokortikoid mempunyai efek langsung pada tulang selama pertumbuhan dan perkembangan tulang juga pada skeleton matur (Abu, 2000).

Hasil penelitian Jia (2006) menunjukkan bahwa pemberian glukokortikoid pada mencit selama tujuh hari akan menyebabkan kehilangan

densitas mineral tulang yang cepat karena adanya ketidakseimbangan jumlah osteoblas dan osteoklas, padahal eksekusi glukokortikoid menurunkan prekursor osteoblas dan osteoklas atau dengan kata lain menurunkan proses osteoblastogenesis dan osteoklastogenesis. Tetapi hasil penelitian tersebut menggambarkan bahwa tidak ada penurunan jumlah osteoklas. Hal ini mungkin terjadi karena glukokortikoid meningkatkan *life span* osteoklas (Jia, 2006).

Pemberian glukokortikoid jangka panjang menyebabkan kehilangan tulang yang cepat dan berat dan kerusakan perlahan dalam waktu lama. Walaupun pengaruh glukokortikoid pada proliferasi dan diferensiasi osteoblas telah dipelajari secara luas tetapi aktivitas langsung pada osteoklas masih kontroversial dan tidak dapat disimpulkan. Penelitian menggunakan deksametason mempunyai efek bifasik pada proses osteoklastogenesis. Pemberian deksametason dosis rendah ($<10^{-8}$ M) akan merangsang ekspresi RANKL dan TGF- β pada proses osteoklastogenesis, sedangkan pemberian dengan dosis tinggi ($>10^{-7}$ M) justru akan menghambat. RANKL merupakan molekul paling kritis untuk proses osteoklastogenesis, bekerjasama dengan M-CSF dalam berinteraksi dengan sel stroma dan *osteoclasts-lineage*. Di samping RANKL dan M-CSF, TGF- β endogen penting untuk proses osteoklastogenesis (Takuma, 2003).

Pemberian glukokortikoid pada mencit meningkatkan prevalensi apoptosis osteoblas vertebra 3 kali lipat dan menginduksi apoptosis osteosit di korteks tulang metafiseal sebanyak 28%. Walaupun ada korelasi yang bermakna antara beratnya bone loss dan luasnya pengurangan pembentukan

tulang, sebagian dari *bone loss* mungkin akibat dari peningkatan resorpsi tulang yang dini. Hal tersebut tampak dari meningkatnya jumlah osteoklas di perimeter tulang kancellus vertebra 7 hari sesudah terapi steroid. Studi *in vivo* pada mencit dari kelompok peneliti yang sama menunjukkan bahwa pada fase dini (7 hari sesudah pemberian glukokortikoid) osteoklastogenesis kultur *ex vivo* sumsum tulang berkurang sampai setengahnya, sedangkan jumlah osteoklas di tulang meningkat 2 kali lipat. Hal tersebut menunjukkan bahwa pengaruh dini ekse glukokortikoid mungkin adalah peningkatan survival osteoklas. Temuan tersebut menunjukkan bahwa pada terapi glukokortikoid, hilangnya tulang secara cepat pada fase awal mungkin disebabkan oleh meningkatnya osteoklas *life span* yang sudah ada, dan hal tersebut dimediasi oleh RANK-ligand (Suatmadji, 2001).

Di lain pihak, studi *in vitro* oleh kelompok peneliti lain menunjukkan bahwa glukokortikoid menghambat osteoprotegerin (OPG) dan sekaligus menstimulasi ekspresi RANK-ligan osteoblas manusia dan *immortalized* sel stromal sumsum tulang. Osteoprotegerin (OPG) adalah elemen ke tiga dari *triumvirate* RANK:RANKL:OPG. Simonet (1997), mengidentifikasi osteoprotegerin sebagai anggota baru TNFR superfamili. Ikatan RANKL pada *soluble decoy receptor* mencegah RANKL berikatan ke targetnya di prekursor osteoklas, sehingga disebut osteoprotegerin (OPG) yang berarti melindungi tulang. Sehingga OPG sering diatur secara *in vivo* dan *in vitro* dalam proporsi yang berlawanan terhadap kadar RANKL (Hofbauer, 2001).

OPG mengandung 401 asam amino yang menyandi sinyal peptida sebagai molekul yang diekspresikan di berbagai jaringan meliputi hepar, paru,

jantung, dan ginjal dan terutama pada tulang dan kartilago. Tidak mengandung asam amino hidrofobik yang akan membuat domain rentang transmembran (*transmembrane-spanning domain*), sehingga setelah sekresi tidak berhubungan dengan sel. Protein N-terminal mempunyai homologi dengan anggota superfamili TNFR, sehingga dapat berikatan dengan RANKL dan setidaknya satu anggota family TNF lain, TRAIL (Lacey, 1998). Overekspresi OPG pada mencit transgenik menyebabkan osteopetrosis (umumnya meningkatkan massa tulang). Pemberian OPG pada hewan normal mencegah kehilangan massa tulang karena ovariektomi. *Soluble cytokine receptor OPG* meniadakan efek biologis OPG-Ligand, yang identik dengan RANKL, dengan berkompetisi dan mencegah berikatan dengan reseptornya pada prekursor osteoklas. Menurut Gori (2000), RANKL diperlukan pada proses osteoklastogenesis, dan aktivitasnya dinetralkan melalui ikatan dengan suatu *soluble decoy receptor*, osteoprotegerin (OPG), dimana keduanya diproduksi oleh *osteoblast lineage cells*. Ekspresi gen OPG dan produksi protein di sel osteoblastik diatur oleh berbagai hormon kalsitropik dan sitokin. Produksi OPG dirangsang oleh 1,25-dihidroksi vitamin D3, *bone morphogenic protein-2*, TNF- α dan - β , interleukin (IL)-1 α dan - β dan diturunkan oleh prostaglandin E2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa glukokortikoid menurunkan OPG dan meningkatkan produksi OPG-L oleh sel osteoblastik *lineage*. Penelitian Hofbauer menunjukkan bahwa pemberian glukokortikoid menunjang proses osteoklastogenesis dengan cara menghambat OPG dan juga merangsang produksi OPG-L oleh *osteoblastic lineage cells*. Udagawa (2000) menemukan bahwa OPG yang diproduksi oleh osteoblas/sel stromal secara fisiologis penting sebagai regulator pada

diferensiasi dan fungsi osteoklas. Menurut Swanson (2006), TNF ligan dan superfamili reseptor : RANKL, OPG dan RANK memegang peranan penting pada proses osteoklastogenesis. RANKL berperan sebagai protein membran di sel stromal/osteoblas dan sebagai protein dapat larut. Ekspresi RANKL ditingkatkan oleh beberapa rangsangan resorpsi tulang meliputi paratiroid dan vitamin D3. RANKL mengaktifasi reseptor RANK yang ditemukan pada permukaan sel progenitor osteoklas dan pada akhir diferensiasi yaitu osteoklas. Interaksi antara RANKL dan RANK dapat dihambat oleh OPG yang dilepas oleh sel stromal atau osteoblas. (Hofbauer, 1999; Gori, 2000; Udagawa, 2000; Kim, 2006; Swanson, 2006).

Progenitor sel osteoklas berasal dari jaringan hematopoietik yang berdiferensiasi dan berproliferasi menjadi osteoklas melalui *cell-to-cell interaction* dengan sel stromal osteoblas (Hill, 1998; Billezikian, 2002). Regulasi mekanisme molekuler osteoklastogenesis ini dilakukan oleh suatu protein *receptor activator of nuclear factor- κ B* (NF- κ B) atau RANK yang diekspresikan di progenitor osteoklas (sel hematopoietik makrofag dan monosit), sedangkan *RANK-ligand* diekspresikan di sel preosteoblastik dan limfosit T (Manolagas, 2000; Riggs et al., 2002). Glukokortikoid berikatan dengan reseptor GR α di sel stromal/osteoblas tulang. Ikatan ini akan merangsang ekspresi RANKL dan menghambat produksi OPG oleh sel stroma/osteoblas (Hofbauer, 1999; Takuma, 2003; Kim, 2006)). RANKL akan mengikat RANK dan ikatan ini dapat dihambat oleh OPG yang mempunyai efek mengikat RANKL dan menghambat interaksi RANKL-RANK, oleh karena itu peran OPG penting dalam regulasi pembentukan osteoklas (Manolagas,

2000). Pengikatan RANK dan RANKL menimbulkan aktivasi Fos dan Fos-1 yang diperlukan untuk diferensiasi osteoklas dan aktivasi progenitor osteoklas menjadi osteoklas aktif (Gori, 2000; Udagawa, 2000; Riggs, 2002; Teitelbaum, 2007).

Remodeling tulang adalah proses regenerasi tulang melalui resorpsi oleh osteoklas dan formasi oleh osteoblas yang terjadi secara berpasangan dan berurutan terjadi pada permukaan tulang trabekular disebut *Howship lacunae* dan pada tulang kortikal disebut *Haversian system* (Manolagas, 2000; Kumar et al, 2005).

Glukokortikoid meningkatkan apoptosis osteosit dan osteoblas melalui mekanisme yang diperantarai oleh reseptor yang tidak memerlukan transkripsi gen dimana proses ini didahului oleh penurunan proses sitoplasmik yang merupakan indikator kerusakan sel (Plotkin, 2007). Glukokortikoid memodulasi aktivitas intraseluler kinase Pyk2. *Proline-rich tyrosine kinase 2* atau *related adhesion focal tyrosine kinase, cellular adhesion kinase β* atau *calcium-dependent tyrosine kinase* adalah anggota *focal adhesion kinase* (FAK) famili *non receptor tyrosine kinase*. Walaupun Pyk2 dan FAK sangat homolog, tetapi protein ini menunjukkan efek yang berbeda pada nasib sel. Aktivasi FAK menyebabkan perbanyakan dan pertahanan sel, Pyk2 mempengaruhi reorganisasi sitoskeleton, kerusakan sel dan apoptosis. Glukokortikoid mempengaruhi masuknya Ca^{2+} ekstraseluler sehingga terjadi peningkatan Ca^{2+} intraseluler yang akan mempengaruhi dengan cepat proses fosforilasi Pyk2. Aktivasi Pyk2 pada gilirannya akan

mengaktivasi c-Jun N-terminal kinase (JNK) yang menyebabkan kerusakan sel sehingga terjadi apoptosis sel osteoblas (Park, 2004; Plotkin, 2007).

Penurunan *turnover* tulang dikaitkan dengan penurunan produksi osteoklas akibat eksese glukokortikoid, sedangkan penurunan produksi osteoblas dan peningkatan apoptosis dapat menjelaskan penurunan pembentukan tulang dan tebalnya trabekula. Akumulasi apoptosis osteosit mungkin dapat menjelaskan peristiwa osteonekrosis yang juga dikenal sebagai nekrosis avaskuler, salah satu manifestasi dari *steroid-induced osteoporosis*, penyebab dari 25% kolaps kepala femur. Hal tersebut juga dapat dibuktikan dari pemeriksaan dekat daerah fraktur. *Glucocorticoid-induced osteocyte apoptosis* suatu kerusakan yang kumulatif dan tidak dapat diperbaiki, dapat merusak peran mekanosensori jaringan osteosit dan oleh sebab itu dapat menimbulkan kolaps kepala femur (Jia, 2006; Kim, 2006; Swanson, 2006; Plotkin, 2007).

Glukokortikoid akan menurunkan prekursor osteoblas atau dengan kata lain menurunkan proses osteoblastogenesis dengan cara meningkatkan apoptosis osteoblas (Jia, 2006), ditandai dengan penurunan *Osteocalcin*, *bone-specific alkaline phosphatase* dan *procollagen-1 extension peptide* dalam sirkulasi darah (serum atau plasma) yang dapat dideteksi sebagai substansi petanda biokimiawi pembentukan tulang. Pada saat pembongkaran tulang, osteoklas juga melepas *collagen crosslink* hasil degradasi matriks protein (kolagen tipe 1) seperti *pyridinium crosslink (free pyridinoline* dan *deoxypyridinoline)*, *cross-linked telopeptide (N-telopeptides* dan *C-telopeptide)* disamping enzim TRAP dan kalsium, sebagai substansi petanda

biokimiawi resorpsi atau pembongkaran tulang. *Cross linked telopeptide* dan *osteocalcin* ini merupakan substansi petanda biokimiawi metabolisme tulang yang dapat digunakan untuk deteksi ketidakseimbangan proses dinamik metabolisme tulang atau kondisi *turnover* tulang, sehingga dapat digunakan untuk menunjang diagnosis risiko osteoporosis dan memantau kecepatan kehilangan masa tulang atau respon terapi, juga untuk membantu memprediksi densitas tulang dan risiko fraktur (Rosen dan Tenenhouse, 1998; Watts, 1999; Caulfield dan Reitz, 2004; Seibel, 2005).

2.11 Pengaruh Latihan Fisik Intensitas Tinggi terhadap Tulang

Lingkup kesehatan tulang meliputi kekuatan tulang yang bagus sampai massa tulang yang rendah hingga osteoporosis. Akibat kesehatan tulang yang buruk antara lain menyebabkan peningkatan risiko fraktur stres sepanjang karir seorang atlet yang berkompetisi (Madden, 2010). Fraktur stres adalah patah tulang yang disebabkan penggunaan yang berlebih pada tulang yang lemah. Selama periode latihan fisik yang tinggi, tekanan berlebihan yang berulang, akan mengubah keseimbangan remodeling tulang. Biasa terjadi pada rekrutmen militer, atlet lapangan, dan penari balet (Madden, 2010). Kekuatan tulang tergantung pada *bone mineral content*, *bone mineral density*, dan kualitas tulang itu sendiri. Kepadatan tulang atau densitas tulang adalah gram mineral per volume tulang yang bisa diukur dengan alat (ultrasonografi atau tomografi). Sedangkan kualitas tulang tergantung pada mikroarsitektur, geometri, ukuran tulang dan penghancuran dan pembentukan kembali (mineralisasi) tulang yang tidak bisa dihitung dengan angka (Tandra H, 2009).

Remodeling tulang adalah proses dinamik meliputi resorpsi tulang oleh osteoklas dan formasi tulang yaitu pembentukan matrik tulang baru atau osteoid oleh osteoblas. *Bone mineral density*, walaupun hanya merupakan salah satu aspek kekuatan tulang, adalah metoda terkini yang digunakan untuk mengevaluasi kesehatan tulang, mendiagnosis osteoporosis, dan memprediksi risiko fraktur. BMD dinilai dengan *dual-energy x-ray absorptiometry* (DXA). BMD rendah berhubungan dengan eumenore atlet dengan kemampuan energi rendah dan atlet amenore. Massa tulang yang rendah dapat dinilai setelah 6 bulan amenore, oligomenore, gangguan makan, atau setelah fraktur stress. Kehilangan massa tulang dapat ireversibel. Riset mendatang membutuhkan kejelasan penggunaan BMD yang lebih baik untuk mengukur kualitas dan kekuatan tulang. Atlet dengan olahraga *weight-bearing* mempunyai BMD 12-15% lebih besar dari wanita tanpa aktivitas (*sedentary women*). BMD mempunyai distribusi normal yang terbagi atas unit standar deviasi (SD) dari rerata wanita muda sehat (distribusi T) atau rerata kronologi umur (distribusi Z) (Madden, 2010).

Banyak faktor risiko penyebab penurunan BMD antara lain orang Asia atau Kaukasia, wanita, fraktur osteoporotik pada derajat pertama relatif, tinggi kurang dari 67 in. (170 cm), berat kurang dari 127 lb (58 kg). Faktor risiko lain adalah faktor lingkungan antara lain berat badan dibawah normal, hilangnya fungsi menstruasi, asupan rendah kalsium, inaktivitas, penggunaan kostikosteroid jangka panjang, perokok, peminum alkohol, kafein (Ehrman, 2009).

Sepanjang hari, sebagian besar hormon dalam darah berfluktuasi dan menunjukkan variasi siklik. Penyebab variasi ritmis ini berhubungan dengan perubahan aktivitas, makanan, stres, siang dan malam, dan tidur dan bangun (Warren, 2000).

Short bouts of anaerobic exercise (latihan intensitas tinggi dengan durasi beberapa detik sampai beberapa menit) mempengaruhi dua sampai empat kali peningkatan β -endorphin tergantung lama latihan atau stressor. Kadar katekolamin berhubungan terhadap konsentrasi laktat maksimal.

Aerobic exercise of longer duration latihan yang berlangsung lama lebih dari 10 menit adalah latihan intensitas rendah, tidak mempengaruhi peningkatan konsentrasi laktat atau katekolamin dan kortisol (Warren, 2000).

Sejak usia kira-kira 30 tahun pada wanita dan 45 tahun pada pria, massa tulang dan elastisitas tulang akan menurun secara bertahap. Pada wanita khususnya, dapat berkembang menjadi osteoporosis yang akan menyebabkan perubahan bentuk tubuh yang parah dan pada beberapa kasus akan menyebabkankematian karena komplikasi fraktur tulang osteoporotik. Penyebab osteoporosis masih belum jelas, para peneliti menduga bahwa salah satu penyebab utama adalah kesalahan stres mekanik (Watkins, 2010).

2.12 Pemeriksaan Kepadatan Tulang

Penetapan kesehatan tulang primer adalah mengukur *bone mineral density*. BMD sering digunakan untuk mengukur tulang belakang, panggul (*femoral neck*), dan pergelangan, karena merupakan tempat yang paling sering mengalami patah tulang pada osteoporosis. Jadi pengukuran pada

ketiga tempat tersebut dapat mewakili, khususnya tulang belakang dan panggul, karena kejadian patah tulang sering terjadi pada kedua tulang tersebut. Pengukuran *bone mineral content* biasanya diartikan sebagai jumlah mineral tulang (terutama hidroksiapatit) per unit area. BMD diartikan sebagai gram *bone mineral content* per sentimeter persegi tulang ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) karena sebagian besar teknologi hanya dapat mengukur area, bukan volume tulang. *Quantitative computed tomografi* adalah satu-satunya cara yang dapat menyediakan pengukuran aktual volume densitas (kepadatan) tulang (Tandra H, 2009, Ehrman, 2009).

Cara lain yang mungkin adalah: *single-photon absorptiometry*, *dual-photon absorptiometry*, *single-energy X-ray absorptiometry*, *dual-energy X-ray absorptiometry* (DXA). Semua cara menunjukkan kepadatan tulang sebagai pengukuran area. Penggunaan teknik densitometri yang paling luas adalah DXA karena *quantitative computed tomography* mempunyai kelebihan *three-dimensional image*, dapat memisahkan tulang trabekuler dan kortikal, sehingga merupakan pemeriksaan pilihan. *Quantitative computed tomography* adalah prosedur yang mahal dan mempunyai paparan radiasi yang lebih tinggi daripada DXA, sehingga kurang dipakai dalam pemeriksaan klinik (Ehrman, 2009).

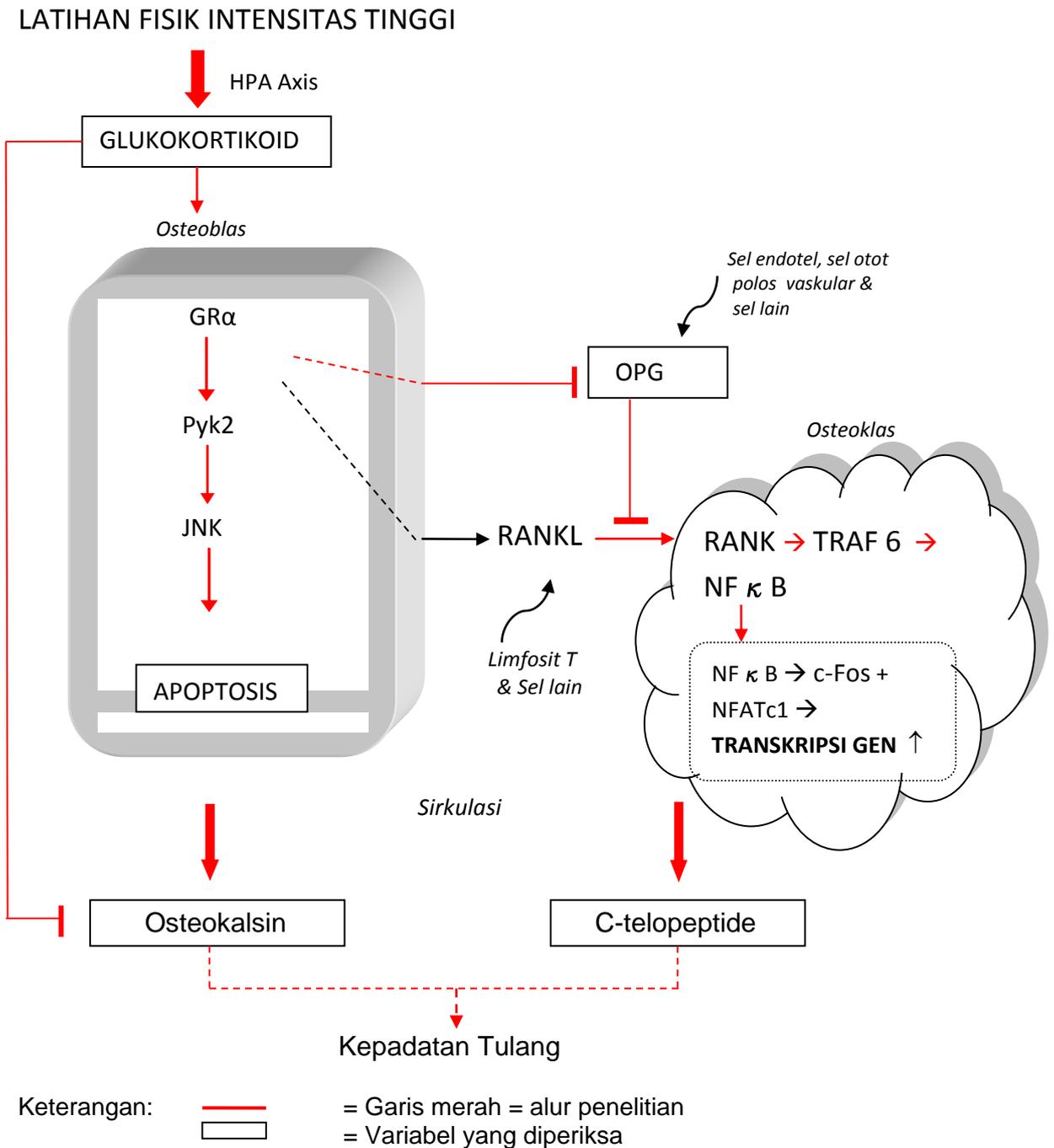
Pemeriksaan kesehatan tulang cara lain adalah *quantitative ultrasound*. Ultrasonografi tidak mengukur densitas tulang tetapi lebih mengukur dua parameter yang disebut kecepatan suara dan *broadband ultrasound attenuation*, yang berhubungan dengan struktur tulang. Kelebihan perangkat ultrasonografi adalah kecil, *portable*, dan tidak ada radiasi ion, sehingga merupakan alternatif pilihan (Ehrman, 2009).

Marker biokimia metabolisme tulang juga digunakan untuk memonitor terapi atau progresivitas kelainan tulang. Walaupun *marker* ini menunjukkan hubungan yang rendah dengan pengukuran aktual kepadatan tulang, tetapi dapat digunakan untuk menetapkan kecepatan relatif formasi dan resorpsi tulang. Kelebihan *marker* biokimia adalah dapat mendeteksi perubahan formasi dan resorpsi tulang dalam satuan minggu, dimana mendeteksi perubahan BMD memerlukan waktu beberapa bulan. Penelitian klinis juga menunjukkan bahwa penurunan risiko fraktur karena terapi antiresorptif dapat terdeteksi sebelum terjadi perubahan BMD, sehingga memonitor *bone turnover* dengan *marker* biokimia akan meningkatkan kemampuan memprediksi risiko fraktur mendatang (Ehrman, 2009).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Penjelasan kerangka konseptual:

Latihan fisik intensitas tinggi berpengaruh pada aksis *hypothalamus pituitary adrenal* (HPA Axis) yang akan meningkatkan sekresi *corticotropin releasing hormone* (CRH) yang selanjutnya merangsang peningkatan glukokortikoid (Pedersen, 2000; Sherwood, 2004; Ganong, 2004; Plotkin, 2007; Chatzitheodorou, 2007).

Remodeling tulang adalah proses regenerasi tulang melalui resorpsi oleh osteoklas dan formasi oleh osteoblas yang terjadi secara berpasangan dan berurutan terjadi pada permukaan tulang trabekular disebut *Howship lacunae* dan kortikal disebut *Haversian system* (Manolagas, 2000; Kumar, 2005).

Regulasi mekanisme molekuler osteoklastogenesis ini dilakukan oleh suatu protein *receptor activator of nuclear factor- κ B* (NF- κ B) atau RANK yang diekspresikan di progenitor osteoklas, sel hematopoietik makrofag dan monosit, sedangkan *RANK-ligand* atau RANKL diekspresikan di sel osteoblas, sel stroma sumsum tulang, limfosit T dan sel lain di bawah pengaruh faktor pertumbuhan, hormon dan sitokin (Manolagas, 2000; Riggs, 2002; Kearns, 2008).

Glukokortikoid berikatan dengan reseptor GR α di sel stromal dan osteoblas. Ikatan ini akan merangsang ekspresi RANKL dan menghambat produksi *decoy receptor for RANKL* atau *osteoprotegerin* (OPG) oleh sel stroma dan osteoblas (Hofbauer, 1999; Takuma, 2003; Kim, 2006). Ketiadaan OPG menyebabkan RANKL mengaktivasi reseptornya yaitu RANK yang ditemukan pada osteoklas dan prekursor osteoklas. Interaksi RANK-RANKL

menyebabkan peningkatan rekrutmen TRAF6 yang menyebabkan aktivasi NF- κ B sehingga terjadi translokasi ke nukleus osteoklas. NF κ B meningkatkan ekspresi c-Fos yang berinteraksi dengan NFATc1 yang memicu proses transkripsi gen osteoklas (Manolagas, 2000; Riggs, 2002; Teitelbaum, 2007; Kearns 2008).

Glukokortikoid memodulasi aktivitas intraseluler kinase Pyk2 (*Proline-rich tyrosine kinase 2*) yang mempengaruhi reorganisasi sitoskeleton, merusak sel dan apoptosis. Aktivasi Pyk2 pada gilirannya akan mengaktifasi c-Jun N-terminal kinase (JNK) yang menyebabkan apoptosis sel osteoblas (Park, 2004; Plotkin, 2007)

Glukokortikoid akan menurunkan prekursor osteoblas atau dengan kata lain menurunkan proses osteoblastogenesis dengan cara meningkatkan apoptosis osteoblas (Jia, 2006), ditandai dengan penurunan osteokalsin salah satu produk osteoblas, dalam sirkulasi darah (serum atau plasma) sebagai substansi petanda biokimiawi formasi tulang. Glukokortikoid menurunkan serum osteokalsin, tetapi mekanisme belum diketahui (Weinstein, 1998; Bronner, 2005). Pada saat pembongkaran tulang, osteoklas melepas *cross-linked telopeptide (C-telopeptide)*. *C-telopeptide* dan osteokalsin ini merupakan substansi petanda biokimiawi metabolisme tulang yang dapat digunakan untuk mengetahui penurunan kepadatan tulang (Rosen dan Tenenhouse, 1998; Watts, 1999; Caulfield dan Reitz, 2004; Seibel, 2005).

3.2 Hipotesis

Hipotesis penelitian adalah:

1. Kadar glukokortikoid darah lebih tinggi pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik.
2. Kadar osteoprotegerin darah lebih rendah pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik.
3. Kadar c-telopeptide darah lebih tinggi pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik.
4. Kadar osteokalsin lebih rendah pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik.
5. Jumlah osteoblas apoptotik lebih tinggi pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik.
6. Ada hubungan kausal antara kadar glukokortikoid, osteoprotegerin, c-telopeptide, osteokalsin dan jumlah osteoblas apoptotik akibat latihan fisik intensitas tinggi

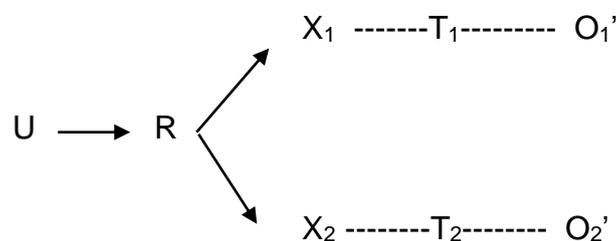
BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental, sesuai dengan masalah yang akan diteliti dan tujuan penelitian untuk menelaah pengaruh perlakuan dalam periode waktu tertentu. Penelitian pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) menggunakan rancangan penelitian *randomized post test only control group design*, dengan asumsi kelompok penelitian berasal dari satu populasi yang sama sehingga tidak diperlukan pengukuran awal (Campbell, 1966 dalam Gibbon et al, 1997).

Bagan rancangan penelitian :



Gambar 4.1 Bagan rancangan penelitian

Keterangan :

U = Unit eksperimen

R = Randomisasi

X₁ = Kelompok 1 adalah kelompok kontrol yang tidak diberi latihan fisik

X₂ = Kelompok 2 adalah kelompok perlakuan yang diberi latihan fisik intensitas tinggi

O₁ = Observasi X₁

O₂ = Observasi X₂

T₁, T₂ = Waktu perlakuan selama 8 minggu

4.2 Unit Eksperimen dan Ulangan

4.2.1 Unit eksperimen

Pada penelitian ini sebagai unit eksperimen adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar, jenis kelamin betina, umur ± 3 bulan, dan berat badan 125 – 175 gram.

4.2.2 Ulangan

Jumlah ulangan ditentukan berdasarkan rumus besar sampel dari Steel dan Torrie (1991) dengan rumus sebagai berikut :

$$r \geq \frac{2 (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 S_c^2}{(\bar{X}_c - \bar{X}_t)^2}$$

Dimana $\bar{X}_c = 1,032$; $\bar{X}_t = 1,017$; $S_c = 0,01$ (West, 2008)

Keterangan:

r = Besar ulangan

X_c = Nilai rerata *Bone Mineral Density* kelompok kontrol

X_t = Nilai rerata *Bone Mineral Density* kelompok perlakuan

S_c = Simpangan baku *Bone Mineral Density* kelompok kontrol

Z_{α/2} = 1,96

Z_β = 0,84

f = proporsi kegagalan 25%

dari hasil perhitungan tersebut diperoleh besar ulangan (r) sebanyak 7, dengan faktor koreksi f sebesar 25%, maka: $(1 / 1-f) \times 7 \geq (1/0,75) \times 7 \geq 9,33$ ekor, dibulatkan menjadi 10 ekor.

4.3 Variabel penelitian

4.3.1 Variabel bebas (*independent variable*)

Latihan fisik intensitas tinggi.

4.3.2 Variabel tergantung (*dependent variable*)

1. Kadar glukokortikoid.
2. Kadar osteoprotegerin.
3. Kadar c-telopeptide.
4. Kadar osteokalsin.
5. Jumlah osteoblas apoptotik.

4.3.3 Variabel kendali

1. Jenis kelamin tikus.
2. Umur tikus adalah ± 3 bulan.
3. Berat badan tikus.
4. Kesehatan tikus.
5. Pemeliharaan tikus.

4.3.4 Definisi operasional variabel

1. Latihan fisik adalah aktivitas fisik yang dilakukan untuk menuju ke perubahan anatomis, fisiologis, biokimiawi, dan psikologis (Bompa,

- 1994). Jenis latihan fisik yang diberikan pada tikus dalam penelitian ini adalah renang.
2. Intensitas adalah menunjukkan komponen kualitatif dari kerja yang dilakukan dalam periode waktu tertentu sehingga semakin banyak kerja yang dilakukan per unit waktu, semakin tinggi intensitasnya (Bompa, 1994).
 3. Latihan fisik intensitas tinggi adalah tikus diberi latihan renang dengan pembebanan 18% berat badan dalam waktu 90% dari waktu maksimumnya. Dilakukan dengan repetisi 2 kali per set dengan frekuensi 3 kali per minggu (Bompa, 1994; Kawanaka, 1998).
 4. Glukokortikoid adalah kadar kortikosteron darah yang diukur secara kuantitatif dengan menggunakan ELISA kit dengan satuan ng/ml (CUSABIO BIOTECH CO., LTD).
 5. Osteoprotegerin adalah kadar osteoprotegerin darah yang diukur secara kuantitatif menggunakan *enzyme-linked immunosorbent assay*, kadar diukur dalam satuan pg/ml (Bender MedSystems GmbH Campus Vienna Biocenter 2A-1030 Vienna, Austria, Europe).
 6. C-telopeptide adalah fragmen terminal karboksil kolagen yang dilepas selama proses resorpsi tulang. Terminal karboksil *aspartic acid* ini (CTX) dipergunakan sebagai parameter biokimiawi untuk

resorpsi tulang (Watta, 1999; Kaniawati, 2005). Kadarnya diukur dengan ELISA Kit dengan satuan ng/ml.

7. Osteokalsin adalah suatu protein non kolagen (asam amino 1-49) dalam matriks tulang sebagai parameter biokimiawi untuk formasi tulang (Watts, 1999; Kaniawati, 2005). Kadarnya diukur dengan ELISA Kit dengan satuan ng/ml.
8. Osteoblas apoptotik adalah jumlah sel osteoblas yang mengalami proses apoptosis yang dihitung secara kuantitatif dengan pemeriksaan imunohistokimia dengan metode *Tunnel assay* dengan pembesaran 400 kali. Jumlah sel osteoblas apoptotik pada setiap sampel ditentukan dengan cara menjumlahkan semua sel osteoblas apoptotik yang ditemukan pada 5 (lima) lapangan pandang yang berbeda, pada pembesaran 400 kali. Pada pemeriksaan ini sel osteoblas yang mengalami apoptosis menunjukkan warna coklat tua hingga kehitaman pada inti sel yang mengindikasikan terjadinya fragmentasi DNA. Gambaran morfologis sel apoptosis ditandai dengan ukuran yang mengecil, fragmentasi nukleus, membran sel utuh, isi sel utuh dan dapat dilepas dalam bentuk badan apoptotik, tidak ada tanda inflamasi (Mitchell, 2009).

4.4 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.4.1 Bahan penelitian

1. Hewan coba adalah *Rattus norvegicus*, strain *Wistar*, jenis kelamin betina, umur \pm 3 bulan. Jumlah keseluruhan 20 ekor.

2. Bahan untuk pemeriksaan:
 - a. *Ether anestheticus* (obat bius)
 - b. *Buffer Formalin 10%*
 - c. Bahan Dekalsifikasi tulang (EDTA, parafin blok)
 - d. Aquabides
 - e. *Rat Glucocorticoid* (GC) ELISA Kit. Catalog No. CSB-E11326r (CUSABIO BIOTECH CO., Ltd.)
 - f. *Osteoprotegerin ELISA kit* (Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim)
 - g. *Rat Cross-Linked C-Telopeptides Of Type I Collagen* (CTX) ELISA Kit. Catalog No. CSB-E08403r (CUSABIO BIOTECH CO., Ltd.)
 - h. *Rat Osteocalcin/Bone gla protein (OT/BGP) ELISA Kit*. Catalog No. CSB-E05129r (CUSABIO BIOTECH CO., Ltd.)
 - i. *ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit* S7101 (Chemicon International, a Serological Company, Canada, USA)

4.4.2 Instrumen penelitian

1. Kandang tikus ukuran, 30 x 40 x 25 cm, setiap kandang diisi dengan 1 ekor tikus.
2. Timbangan analitik (Torbal) untuk menimbang berat badan tikus dengan satuan gram.

3. Bak air sebagai kolam renang tikus, diameter 50 cm, tinggi 75 cm (Kawanaka, 1998).
4. Beban logam dengan berbagai ukuran untuk pembebanan.
5. Timbangan emas, untuk mengukur beban logam.
6. Stoples untuk pembiusan.
7. Botol untuk minum tikus.
8. Tempat makanan (pelet).
9. Tinta pewarna untuk memberi tanda pada badan tikus.
10. *Stopwatch*.
11. Gunting dan pisau bedah.
12. *Vacutainer* 5 ml.
13. Spuit 5 ml, Eppendorf Tube, Tip biru, kuning.

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Binatang Percobaan Departemen Biokimia, Departemen Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, Departemen Patologi Klinik RSUD dr Soetomo/FKUA, Departemen Patologi Anatomi RSUD dr Soetomo/FKUA dan Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

4.6 Prosedur Pelaksanaan Penelitian

4.6.1 Pengajuan sertifikat kelaikan etik penelitian

Sebelum pelaksanaan penelitian dilakukan uji kelaikan etik. Proposal penelitian diajukan ke Komite Etik Fakultas Kedokteran

Hewan Universitas Airlangga untuk mendapatkan penilaian dan pengesahan kelaikan etik. Hal ini dilakukan untuk menjamin bahwa semua prosedur yang dilakukan pada penelitian ini laik etik (Lampiran 1).

4.6.2 Perlakuan pada tikus

1. Pemeliharaan tikus sampai umur \pm 3 bulan.
2. Pembagian kelompok hewan coba:
 - a. Kelompok 1, yaitu kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan
 - b. Kelompok 2 yaitu kelompok yang diberi latihan fisik intensitas tinggi renang dengan pembebanan 18% berat badan (Kawanaka, 1998).
3. Aklimatisasi hewan coba selama 1 minggu untuk penyesuaian dengan kondisi lingkungan baru baik untuk kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan.
4. Tikus ditempatkan dalam kandang dari plastik dengan tutup kasa kawat ukuran 30 x 40 x 25 cm dengan alas sekam padi yang berfungsi menyerap kotoran tikus dan dilakukan pembersihan dan penggantian sekam 2 hari sekali. Kandang ditempatkan dalam ruangan berventilasi.



Gambar 4.2 Tikus dalam kandang bersekam

5. Selama penelitian berlangsung, tikus diberi pakan pelet sesuai dengan pakan standar dengan rendah kalsium fosfat. Komposisi pakan seperti pada Lampiran 10.
6. Penimbangan berat badan sebelum perlakuan dengan timbangan analitik (Torbal) dengan satuan gram.
7. Pada kelompok perlakuan, setiap tikus direnangkan dengan pembebanan 18% berat badan, beban diikatkan dengan benang pada 1 cm dari pangkal ekor (Kregel, 2006). Pada kelompok kontrol, tikus diletakkan pada tempat berair dangkal dengan waktu sama dengan tikus kelompok perlakuan.



Gambar 4.3 Pembebanan pada tikus

8. Pada kelompok perlakuan tikus direnangkan sampai tercapai waktu maksimum masing-masing (T_{maks}) dan dihitung waktu 90% dari waktu maksimum (T_{90}), dalam satuan detik.

Waktu maksimum dihitung sejak hewan dimasukkan ke kolam sampai hewan tidak mampu lagi berenang yang ditandai dengan tenggelamnya hewan coba disertai pengeluaran gelembung udara besar pertama kali.

9. Perlakuan latihan fisik intensitas tinggi dengan merenangkan tikus dengan pembebanan 18% berat badan dengan waktu 90% dari waktu maksimumnya (T_{90}) dengan interval 2 kali, waktu istirahat di antara 2 interval adalah 2 kali T_{90} . Direnangkan dengan frekuensi 3 kali perminggu, selama 8 minggu (Bompa, 1994; Kawanaka, 1998).



Gambar 4.4 Tikus berenang dengan pembebanan

10. Setiap minggu dilakukan penimbangan berat badan untuk penyesuaian berat beban sebesar 18% berat badan.

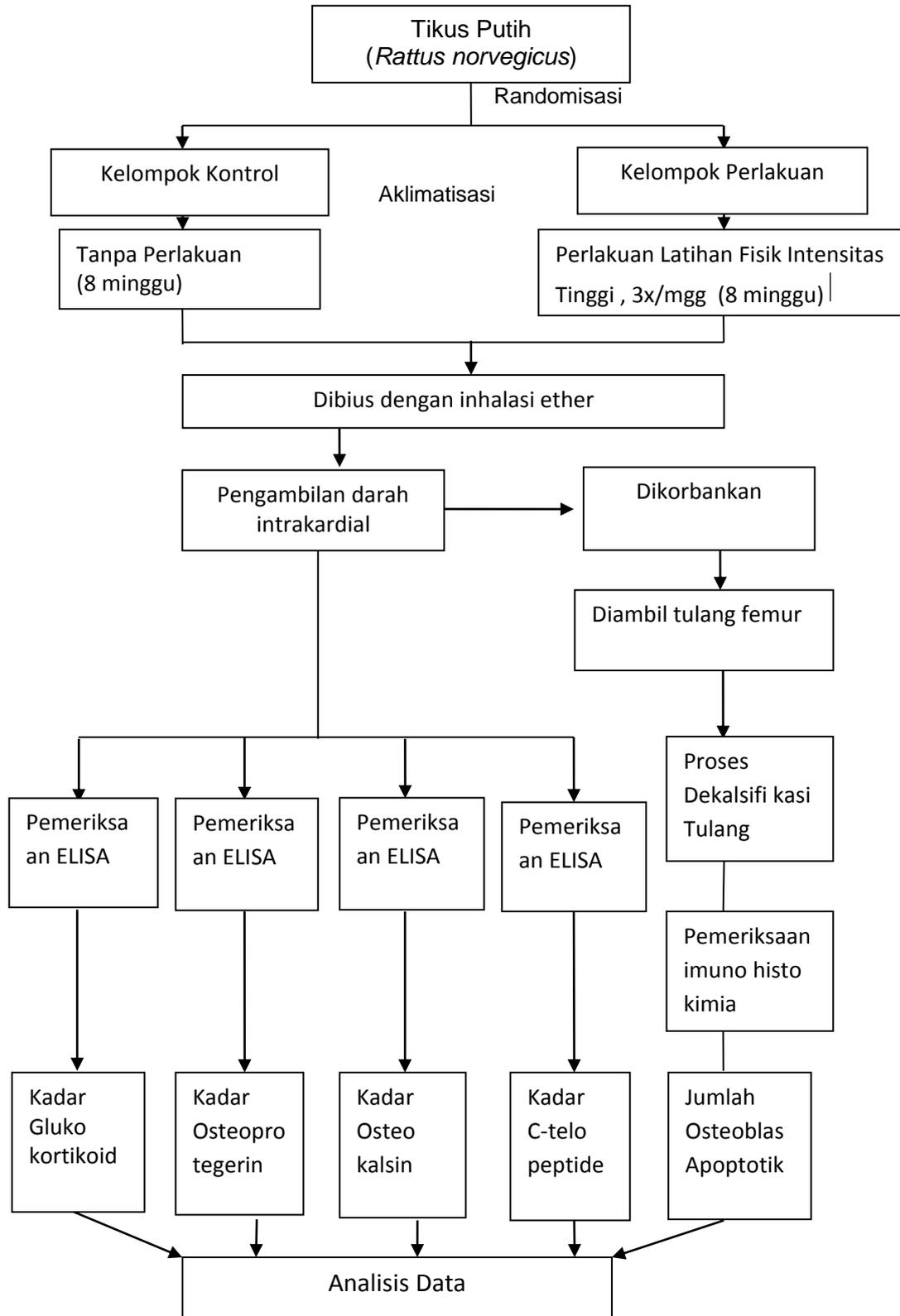
11. Setelah perlakuan 8 minggu, hewan dibius dengan ether setelah 15 menit selesai perlakuan (Droste, 2009), darah subyek penelitian

diambil secara intrakardial sebanyak kurang lebih 5 ml dan dimasukkan dalam tabung vakum tanpa koagulan untuk pemeriksaan kadar glukokortikoid, osteoprotegerin, c-telopeptida dan osteokalsin.

12. Hewan coba dikorbankan dengan menambah dosis ether, untuk diambil bagian tungkai atas (femur) dan dibersihkan/dibuang jaringan otot yang melekat pada tulang.
13. Dilakukan dekalsifikasi tulang femur untuk menghilangkan kalsium yang ada dalam jaringan tulang sehingga sediaan mudah disayat untuk persiapan sediaan mikroskopik (Sudiana, 2005). Proses pembuatan sediaan seperti pada Lampiran 5.
14. Dibuat preparat imunohistokimia untuk pemeriksaan mikroskopik untuk menghitung jumlah osteoblas yang mengalami apoptosis, seperti pada Lampiran 4.

4.7 Cara Pengolahan Data

Data hasil penelitian ditabulasi dan dianalisis dengan Uji t - 2 sampel bebas (*Independent t-test*), setelah itu dilakukan analisis jalur untuk mengetahui hubungan kausalistik antar variabel.



Gambar 4.5 Bagan Kerangka Operasional Penelitian

BAB 5

HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN

5.1 Uji Normalitas Data

Efek latihan fisik intensitas tinggi terhadap gangguan remodeling tulang dibuktikan dengan penghitungan kadar glukokortikoid, osteoprotegerin, osteokalsin, c-telopeptide dan jumlah sel osteoblas apoptotik. Sebelumnya data hasil penelitian dilakukan Uji Normalitas dengan *Kolmogorov-Smirnov Test* untuk mengetahui data terdistribusi normal atau tidak. Hasil analisis menunjukkan data glukokortikoid, osteoprotegerin, osteokalsin, c-telopeptide, osteoblas apoptotik berdistribusi normal ($p > \alpha$) baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan, seperti terdapat pada tabel berikut.

Tabel 5.1 Hasil uji normalitas

Variabel	Kelompok Kontrol (p)	Kelompok Perlakuan (p)
Glukokortikoid	0,975	0,806
Osteoprotegerin	0,961	0,643
Osteokalsin	0,804	0,765
C-telopeptide	0,891	0,325
Osteoblas Apoptotik	0,735	0,770
Rasio CT/OC	0,651	0,417

Keterangan: signifikansi $p > 0,05$

5.2 Deskripsi Data Hasil Penelitian

Efek latihan fisik intensitas tinggi terhadap gangguan remodeling tulang dibuktikan dengan penghitungan kadar glukokortikoid, osteoprotegerin, osteokalsin, c-telopeptide dan jumlah sel osteoblas apoptotik.

Untuk mengetahui perbedaan antara kelompok perlakuan dan kontrol dilakukan uji t - 2 sampel bebas (*Independent t-test*). Berikut adalah analisis perbedaan masing-masing variabel:

Tabel 5.2 Data deskripsi hasil penelitian

Variabel	Kelompok	\bar{x}	SD	Min	Maks	Independent t-test
Glukokortikoid (ng/ml)	Perlakuan	9,633	2,844	6,10	13,56	t=-5,395 p=0,000*
	Kontrol	3,289	2,395	0,36	8,50	
Osteoprotegerin (pg/ml)	Perlakuan	40,240	13,876	13,70	53,70	t=9,044 p=0,000*
	Kontrol	104,400	17,627	80,50	140,10	
Osteokalsin (ng/ml)	Perlakuan	82,990	14,404	50,20	99,00	t=4,631 p=0,001*
	Kontrol	162,210	52,142	99,00	283,20	
Apoptosis Osteoblas (sel/lp)	Perlakuan	18,400	20,222	0,00	62,00	t=-1,785 p=0,101
	Kontrol	6,300	7,118	0,00	21,00	
C Telopeptide (ng/ml)	Perlakuan	5,368	2,715	2,41	12,52	t=-4,055 p=0,001*
	Kontrol	1,825	0,514	0,63	2,51	
Rasio C-Telopeptide/Osteokalsin	Perlakuan	0,066	0,030	0,026	0,138	t=-5,541 p=0,000*
	Kontrol	0,012	0,005	0,002	0,019	

Keterangan : * signifikan pada $\alpha=0,05$

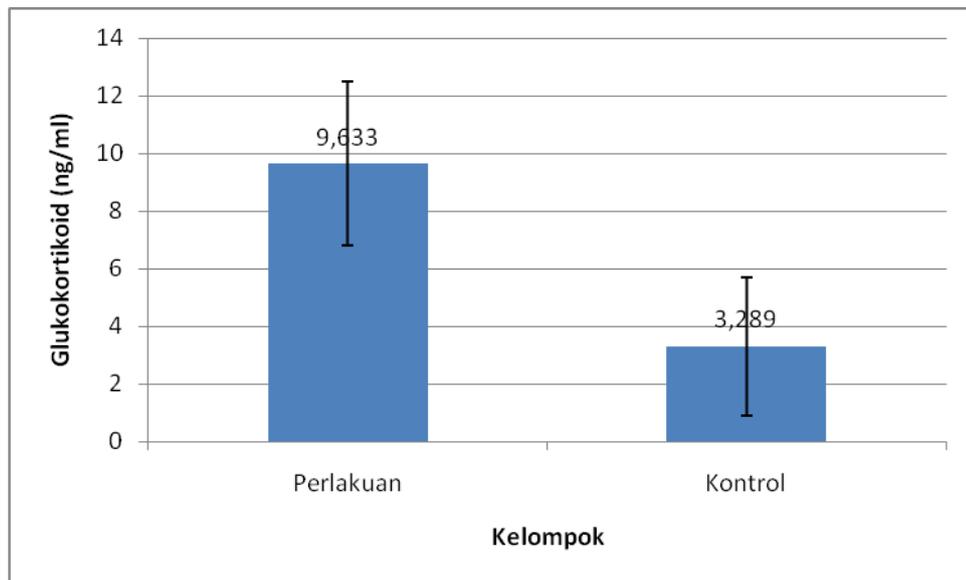
5.3 Hasil Analisis Variabel Penelitian

Untuk mengetahui perbedaan antara kelompok perlakuan dan kontrol dilakukan uji t - 2 sampel bebas (*Independent t-test*). Berikut adalah analisis perbedaan masing-masing variabel:

5.3.1 Kadar glukokortikoid darah

Rerata kadar glukokortikoid di kelompok perlakuan lebih tinggi daripada kelompok kontrol. Variasi data hampir sama pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Hasil Uji t 2 sampel bebas menunjukkan ada perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan dan kontrol ($p < 0,05$), seperti tampak pada tabel 5.2.

Harga minimal kadar glukokortikoid pada kelompok perlakuan lebih besar dari kelompok kontrol. Harga minimal kadar glukokortikoid pada kelompok perlakuan mendekati harga maksimal kelompok kontrol., seperti pada grafik di bawah ini.

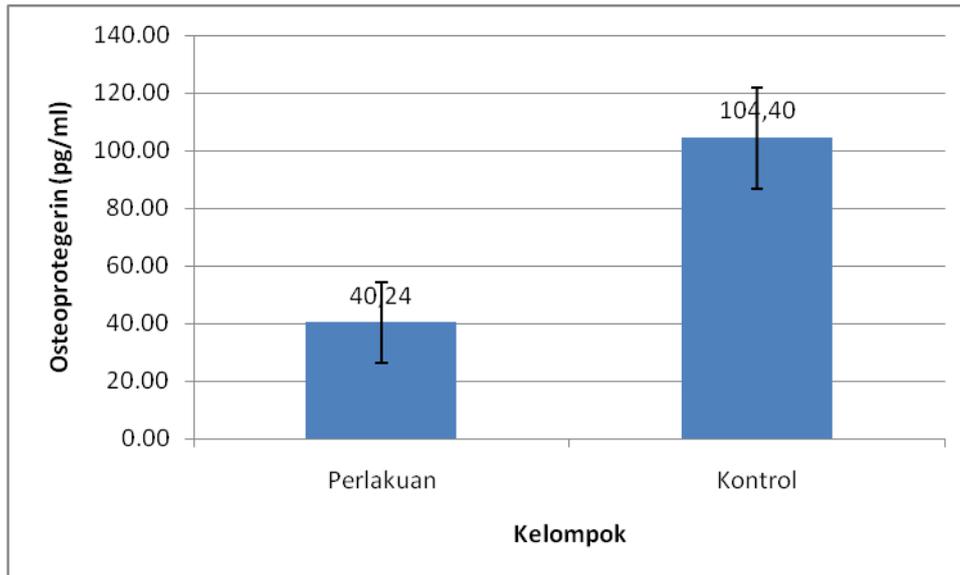


Gambar 5.1 Kadar glukokortikoid kelompok perlakuan dan kontrol

5.3.2. Kadar osteoprotegerin darah

Rerata kadar osteoprotegerin di kelompok perlakuan lebih rendah daripada kelompok kontrol. Variasi data hampir sama pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Hasil Uji t 2 sampel bebas menunjukkan ada perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan dan kontrol ($p < 0,05$), seperti tampak pada tabel 5.2.

Harga minimal kadar osteoprotegerin pada kelompok perlakuan lebih rendah dari kelompok kontrol. Harga maksimal kelompok perlakuan jauh lebih rendah dari harga minimal kelompok kontrol, seperti tampak pada grafik berikut:



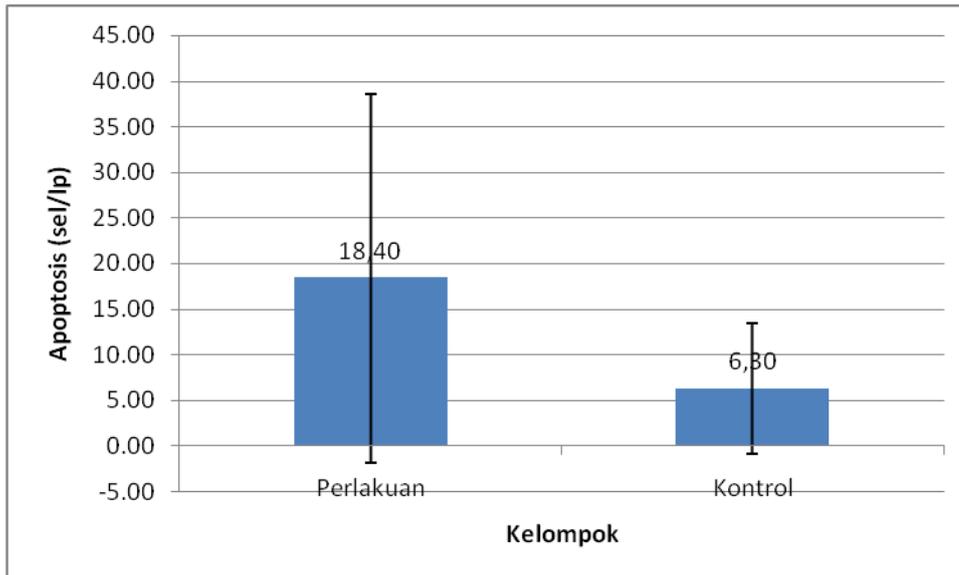
Gambar 5.2 Kadar osteoprotegerin kelompok perlakuan dan kontrol

5.3.3 Jumlah osteoblas apoptotik

5.3.3.1 Jumlah osteoblas apoptotik dalam jaringan tulang

Rerata jumlah osteoblas apoptotik di kelompok perlakuan lebih tinggi daripada kelompok kontrol. Variasi data pada kelompok perlakuan sangat tinggi. Hasil Uji t 2 sampel bebas menunjukkan tidak ada perbedaan antara kelompok perlakuan dan kontrol ($p > 0,05$), seperti tampak pada tabel 5.2.

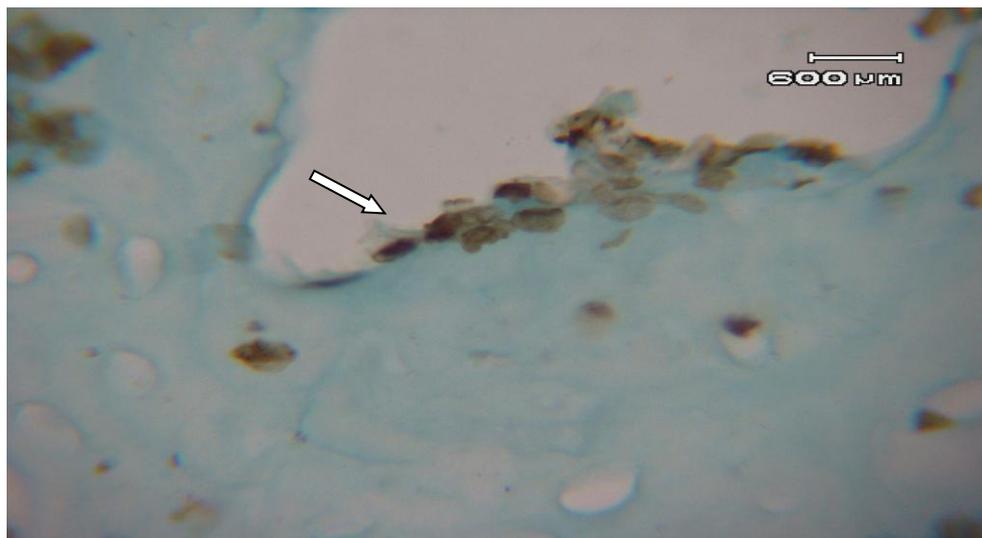
Harga maksimal jumlah Osteoblas Apoptotik pada kelompok perlakuan lebih tinggi dari kelompok kontrol.



Gambar 5.3 Jumlah osteoblas apoptotik kelompok perlakuan dan kontrol

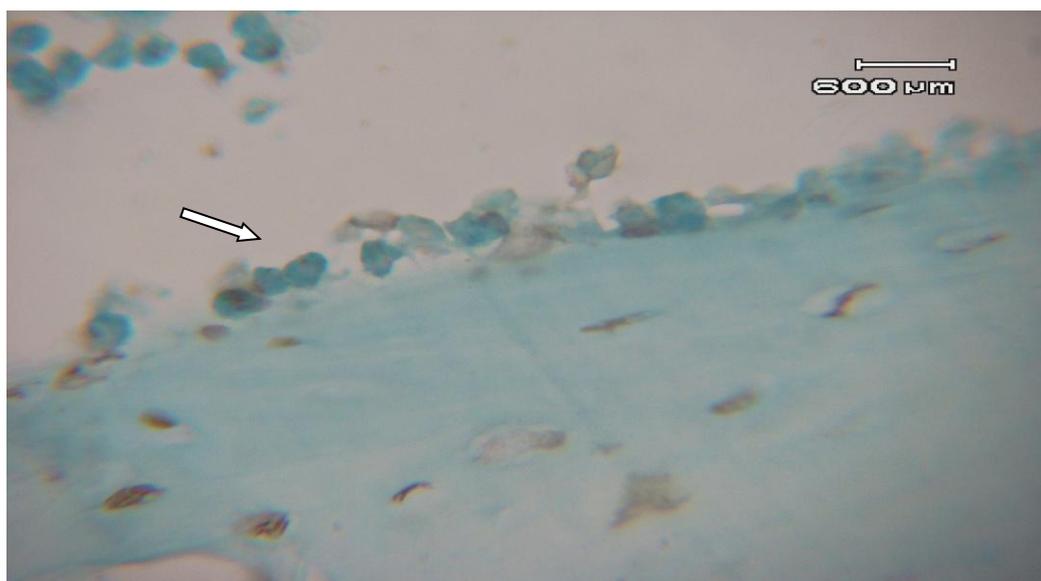
5.3.3.2 Gambaran imunohistologi osteoblas apoptotik

Pada gambar 5.4 dapat dilihat hasil pemeriksaan osteoblas yang mengalami proses apoptosis dengan metode *Tunnel assay* dengan pembesaran 400 x. Metode yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah metode kuantitatif, dimana jumlah sel osteoblas apoptotik pada setiap sampel ditentukan dengan cara menjumlahkan semua sel osteoblas apoptotik yang ditemukan pada 5 (lima) lapangan pandang yang berbeda, pada pembesaran 400 kali. Pada pemeriksaan ini sel osteoblas yang mengalami apoptosis menunjukkan warna coklat tua hingga kehitaman pada inti sel yang mengindikasikan terjadinya fragmentasi DNA.



Gambar 5.4 Gambaran histopatologi osteoblas yang mengalami apoptosis pada kelompok perlakuan (tanda panah), pembesaran 400x.

Gambar 5.5 merupakan hasil pemeriksaan osteoblas pada kelompok kontrol dengan menggunakan metode *Tunnel assay* dengan pembesaran 400x. Pada pemeriksaan ini sel osteoblas tidak mengalami apoptosis ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan warna coklat tua hingga kehitaman pada inti sel yang mengindikasikan terjadinya fragmentasi DNA.

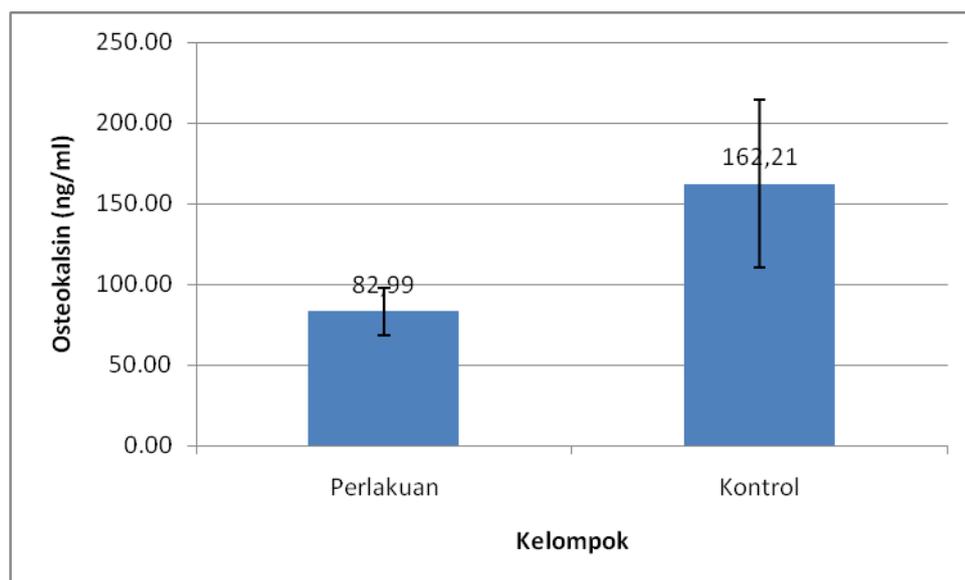


Gambar 5.5 Gambaran histopatologi osteoblas pada kelompok kontrol (tanda panah), pembesaran 400x.

5.3.4 Kadar osteokalsin darah

Rerata kadar osteokalsin di kelompok perlakuan lebih rendah daripada kelompok kontrol. Variasi data hampir sama pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Hasil Uji t 2 sampel bebas menunjukkan ada perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan dan kontrol ($p < 0,05$), seperti tampak pada tabel 5.2.

Harga minimal kadar osteokalsin pada kelompok perlakuan lebih rendah dari kelompok kontrol. Harga maksimal kadar osteokalsin pada kelompok perlakuan sama dengan harga minimal kelompok kontrol., seperti pada grafik berikut.



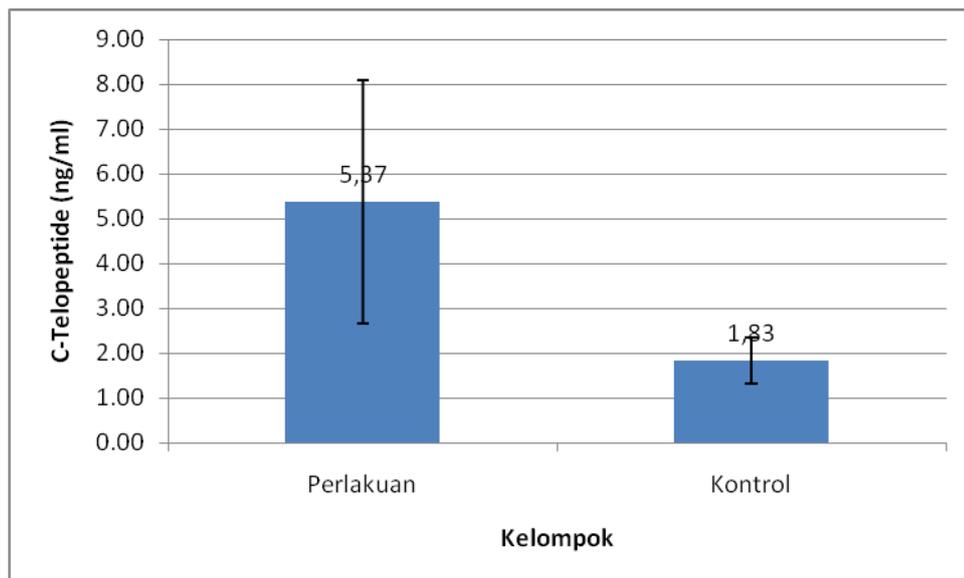
Gambar 5.6 Kadar osteokalsin kelompok perlakuan dan kontrol

5.3.5 Kadar c-telopeptide darah

Rerata kadar c-telopeptide di kelompok perlakuan lebih tinggi daripada kelompok kontrol. Variasi data hampir sama pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Hasil Uji t 2 sampel bebas menunjukkan ada perbedaan

bermakna antara kelompok perlakuan dan kontrol ($p < 0,05$), seperti tampak pada tabel 5.2.

Harga maksimal kadar C-Telopeptide pada kelompok perlakuan lebih besar dari kelompok kontrol.

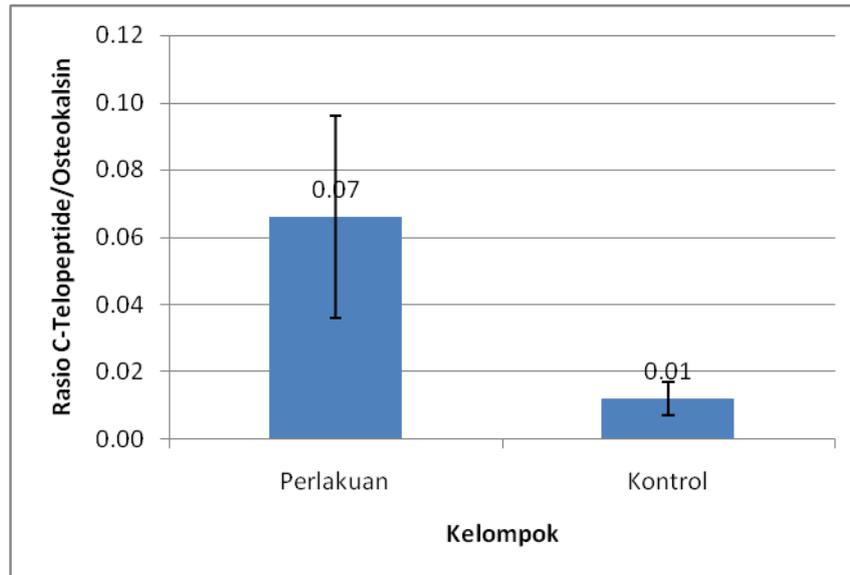


Gambar 5.7 Kadar C-Telopeptide kelompok perlakuan dan kontrol

5.3.6 Rasio c-telopeptide/osteokalsin darah

Rerata rasio C-telopeptide/Osteokalsin di kelompok perlakuan lebih tinggi daripada kelompok kontrol. Variasi data hampir sama pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Hasil Uji t 2 sampel bebas menunjukkan ada perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan dan kontrol ($p < 0,05$), seperti tampak pada tabel 5.2.

Harga minimal rasio kadar C-Telopeptide/Osteokalsin pada kelompok perlakuan lebih besar dari kelompok kontrol. Harga maksimal kelompok kontrol mendekati harga minimal kelompok perlakuan. Seperti tampak pada grafik berikut:



Gambar 5.8 Rasio kadar C-Telopeptide/ Osteokalsin kelompok perlakuan dan kontrol

5.4 Analisis Jalur

Analisis Jalur dalam penelitian ini dilakukan dengan Analisis Regresi yang dilakukan secara bertahap untuk menunjukkan adanya hubungan kausal antar variabel. Hasil analisis yang menunjukkan hubungan antar variabel dengan koefisien jalur positif, berarti apabila variabel yang mempengaruhi ditingkatkan maka variabel yang dipengaruhi juga meningkat. Bila koefisien jalur negatif berarti apabila variabel yang mempengaruhi ditingkatkan maka variabel yang dipengaruhi akan menurun. Atau sebaliknya apabila variabel yang mempengaruhi menurun maka variabel yang dipengaruhi akan meningkat. Berikut adalah hasil pengujian analisis regresi antar variabel .

5.4.1 Pengaruh latihan fisik intensitas tinggi terhadap kadar glukokortikoid

Hasil analisis regresi kategorial menunjukkan ada pengaruh latihan fisik intensitas tinggi terhadap kadar Glukokortikoid ($p < 0,05$), seperti tampak pada tabel 5.3. Hasil analisis menunjukkan nilai koefisien jalur positif berarti apabila latihan fisik intensitas tinggi meningkat maka kadar Glukokortikoid meningkat ($r = 0,793$).

Tabel 5.3 Nilai koefisien latihan fisik intensitas tinggi terhadap kadar glukokortikoid

	Standardized Coefficients		df	F	Sig.
	Beta	Bootstrap (1000) Estimate of Std. Error			
Kelompok Perlakuan Latihan Fisik	0,793	0,076	1	109,936	0,000

Dependent Variable: Glukokortikoid

5.4.2 Pengaruh kadar glukokortikoid terhadap kadar osteoprotegerin

Hasil analisis regresi menunjukkan ada pengaruh perubahan kadar Glukokortikoid terhadap Osteoprotegerin ($p < 0,05$), seperti tampak pada tabel 5.4. Hasil analisis menunjukkan nilai koefisien jalur negatif, berarti menunjukkan perubahan yang berlawanan, apabila kadar Glukokortikoid meningkat maka kadar Osteoprotegerin akan menurun ($r = -0,688$).

Tabel 5.4 Nilai koefisien regresi kadar glukokortikoid terhadap kadar osteoprotegerin

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
(Constant)	111,354	11,441		9,733	0,000
Glukokortikoid	-6,041	1,502	-0.688	-4,023	0,001

a. *Dependent Variable: Osteoprotegerin*

5.4.3 Pengaruh kadar glukokortikoid terhadap osteoblas apoptotik

Hasil analisis regresi menunjukkan tidak ada pengaruh perubahan kadar glukokortikoid terhadap jumlah osteoblas apoptotik ($p > 0,05$), seperti tampak pada tabel 5.5. Hasil analisis menunjukkan nilai koefisien jalur positif, berarti bila terjadi peningkatan kadar Glukokortikoid maka jumlah Osteoblas Apoptotik akan meningkat ($r = 0,212$).

Tabel 5.5 Nilai koefisien regresi kadar glukokortikoid terhadap osteoblas apoptotik

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
(Constant)	7,062	6,785		1,041	0,312
Glukokortikoid	0,819	0,891	0,212	0,919	0,370

a. *Dependent Variable: Apoptotik sel*

5.4.4 Pengaruh kadar osteoprotegerin terhadap kadar c-telopeptide

Hasil analisis regresi menunjukkan ada pengaruh perubahan kadar Osteoprotegerin terhadap C-telopeptide ($p < 0,05$), seperti tampak pada tabel 5.6. Hasil analisis menunjukkan nilai koefisien jalur negatif, berarti menunjukkan perubahan yang berlawanan, bila kadar Osteoprotegerin meningkat maka kadar C-telopeptide akan menurun ($\beta = -0,658$).

Tabel 5.6 Nilai koefisien regresi kadar osteoprotegerin terhadap c-telopeptide

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
(Constant)	7,040	1,034		6,808	0,000
Osteoprotegerin	-0,048	0,013	-0,658	-3,708	0,002

a. *Dependent Variable: C-Telopeptide*

5.4.5 Pengaruh kadar glukokortikoid dan osteoblas apoptotik terhadap osteokalsin

Hasil analisis regresi menunjukkan ada pengaruh kadar Glukokortikoid terhadap kadar Osteokalsin ($p < 0,05$) seperti tampak pada tabel 5.7. Hasil analisis menunjukkan nilai koefisien jalur positif berarti menunjukkan perubahan yang berlawanan. Bila terjadi peningkatan kadar Glukokortikoid maka akan menurunkan kadar Osteokalsin ($\beta = -0,486$).

Analisis regresi pada tabel 5.7 juga menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh yang bermakna perubahan jumlah Osteoblas Apoptotik terhadap kadar Osteokalsin ($p > 0,05$). Hasil analisis menunjukkan nilai koefisien jalur negatif, berarti menunjukkan perubahan yang berlawanan. Bila terjadi peningkatan jumlah Osteoblas Apoptotik maka akan menurunkan kadar Osteokalsin ($\beta = -0,191$).

Tabel 5.7 Nilai koefisien regresi kadar glukokortikoid dan osteoblas apoptotik terhadap osteokalsin

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
1 (Constant)	172,492	21,011		8,210	0,000
Glukokortikoid	-6,467	2,741	-0,486	-2,359	0,031
Apoptotik sel	-0,657	0,709	-0,191	-0,926	0,367

a. *Dependent Variable:* Osteokalsin

5.4.6 Pengaruh kadar c-telopeptide dan osteokalsin terhadap rasio c-telopeptide/osteokalsin

Hasil analisis regresi menunjukkan ada pengaruh perubahan kadar c-telopeptide terhadap rasio c-telopeptide/osteokalsin ($p < 0,05$), seperti tampak pada tabel 5.8. Hasil analisis jalur menunjukkan nilai koefisien jalur positif, berarti apabila terjadi peningkatan kadar c-telopeptide maka akan meningkatkan rasio c-telopeptide/osteokalsin ($\beta = 0,825$).

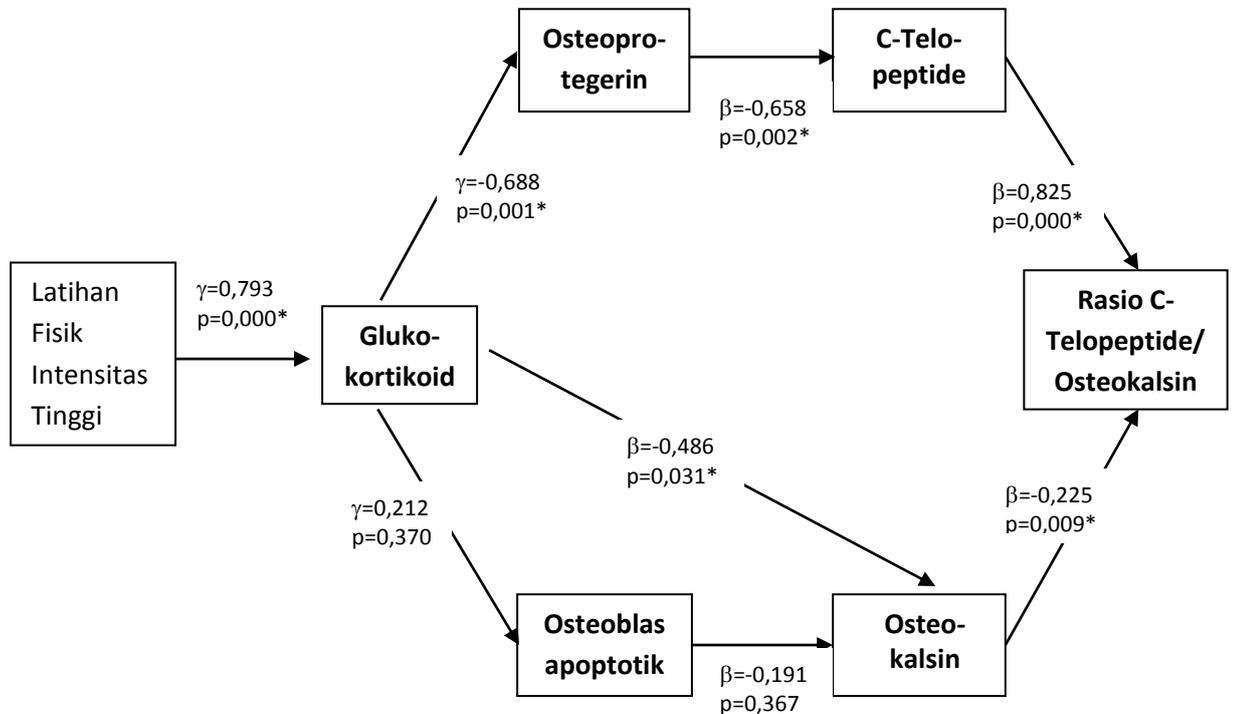
Hasil analisis regresi juga menunjukkan ada pengaruh perubahan kadar osteokalsin terhadap rasio c-telopeptide/osteokalsin ($p < 0,05$), seperti tampak pada tabel 5.8. Hasil analisis menunjukkan nilai koefisien jalur negatif, berarti menunjukkan perubahan yang berlawanan, bila kadar osteokalsin menurun maka rasio c-telopeptide/osteokalsin akan meningkat ($\beta = -0,225$).

Tabel 5.8 Nilai koefisien regresi kadar c-telopeptide dan osteokalsin terhadap rasio c-telopeptide dan osteokalsin

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
1(Constant)	0,017	0,009		2,036	0,058
C-Telopeptide	0,011	0,001	0,825	10,811	0,000
Osteokalsin	0,000	0,000	-0,225	-2,944	0,009

a. Dependent Variable: Rasio CT/OC

Adanya hubungan kausal antar variabel ditunjukkan pada gambar berikut :



Gambar 5.9 Analisis Jalur

Jalur yang berperan dalam peningkatan rasio c-telopeptide/osteokalsin adalah jalur :

1. Latihan fisik berpengaruh pada kadar glukokortikoid ($p < 0,05$) dengan nilai koefisien jalur 0,793.

2. Kadar glukokortikoid berpengaruh pada kadar osteoprotegerin ($p < 0,05$) dengan nilai koefisien jalur $-0,688$.
3. Kadar osteoprotegerin berpengaruh pada kadar c-telopeptide ($p < 0,05$) dengan nilai koefisien jalur $-0,658$.
4. Kadar c-telopeptide berpengaruh pada rasio c-telopeptide/osteokalsin dengan nilai koefisien jalur $0,825$
5. Kadar glukokortikoid berpengaruh pada kadar osteokalsin ($p < 0,05$) dengan nilai koefisien jalur $-0,486$
6. Kadar osteokalsin berpengaruh pada rasio c-telopeptide/osteokalsin dengan nilai koefisien jalur $-0,225$.

BAB 6

PEMBAHASAN

Latihan fisik adalah aktivitas muktifaktor yang memberi efek nyata pada organ dan jaringan tubuh. Latihan fisik tidak hanya memberikan banyak manfaat kesehatan tetapi juga bisa berakibat pada masalah kesehatan kronik apabila tidak dilakukan dengan benar. Para peneliti telah meningkatkan pelaksanaan studi secara sistemik tentang latihan fisik untuk menjelaskan lebih jauh manfaat positifnya. Pemilihan dosis latihan fisik yaitu jenis, intensitas, frekuensi dan waktu yang tidak tepat akan berakibat buruk pada organ dan jaringan tubuh salah satunya terhadap tulang sehingga penting dipelajari pengertian yang benar tentang dosis latihan fisik supaya diperoleh manfaat latihan yang maksimal (Warren, 2000; Kregel, 2006; Wilmore, 2008; Madden, 2010). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui mekanisme gangguan remodeling tulang sebagai faktor risiko penurunan kepadatan tulang akibat latihan fisik intensitas tinggi melalui perubahan kadar glukokortikoid, osteoprotegerin, osteokalsin, c-telopeptide darah, dan jumlah osteoblas apoptotik.

Penelitian tentang latihan fisik lebih efektif bila dilakukan pada manusia sebagai obyek, tetapi ini tidak selalu bisa bila dilakukan apabila menggunakan tindakan *invasive* yang melanggar etik, sehingga digunakan hewan ketika menggunakan manusia sebagai obyek penelitian akan berakibat buruk. Pada penelitian ini digunakan tikus (*Rattus norvegicus strain Wistar*) yang merupakan spesies yang paling sering digunakan untuk studi *exercise* karena

mudah didapatkan, dan mudah diberi perlakuan (Kregel, 2006). Dilakukan pada tikus dewasa muda umur kurang lebih 3 bulan (Smith, 1988) dan berkelamin betina.

Pengukuran dosis latihan adalah berdasar pengukuran VO_2 maksimal atau frekuensi denyut nadi. Tetapi pada hewan pengukuran ini tidak bisa dilakukan sehingga digunakan dosis berdasar Kerja Maksimal yang bisa dilakukan dengan mengukur waktu dan pembebanan (Kregel, 2006; Robergs, 2008).

Jenis latihan fisik yang dilakukan pada penelitian ini adalah renang karena bersifat *unweight-bearing* yang kurang berakibat pada peningkatan kepadatan tulang (Robergs, 2003). Renang merupakan jenis latihan yang murah dan tidak membutuhkan peralatan khusus seperti *treadmill* atau *running wheel* yang mempunyai tingkat kesulitan lebih tinggi. Pada alat tersebut apabila tikus telah mengalami kelelahan maka sering tidak berlari tapi justru diam mengikuti perputaran roda sehingga sulit untuk menentukan waktu maksimumnya. Selain itu renang mempunyai kelebihan tidak menyebabkan cedera kaki, sehingga tidak menyebabkan trauma fisik hewan. Sekresi kortikosteron (glukokortikoid pada tikus) juga meningkat setelah mendapat latihan renang yang dilakukan satu kali atau beberapa kali sampai terjadi kelelahan. (Kregel, 2006).

Untuk mengetahui perubahan variabel yang akan diperiksa akibat latihan fisik intensitas tinggi pada penelitian ini diberikan perlakuan penambahan beban yang diikatkan pada ekor tikus. Jumlah beban yang diberikan berdasar perhitungan total berat badan dan harus dapat mengikuti

gerakan renang secara terus menerus (Kregel, 2006). Pada pemeriksaan imunohistologi apoptosis osteoblas dilakukan pada metafisis yaitu bagian tulang panjang tempat pertemuan epifisis dan diafisis yang lebih banyak mengandung tulang trabekular (Downey, 2006; Watkins, 2010). Tulang trabekular mempunyai kecepatan metabolisme yang lebih tinggi dan kecepatan remodeling 3-10 kali lebih cepat daripada tulang kompak, sehingga lebih mudah mengalami penurunan kepadatan tulang (Downey, 2006). Beberapa publikasi melaporkan kasus patah tulang karena osteoporosis sering terjadi pada leher femur, vertebra dan panggul. Menurut Madden (2010), fraktur yang disebabkan oleh trauma minimal pada atlet wanita sering terjadi pada proksimal femur, proksimal humerus, dan distal radius (Madden, 2010). Efek tiap jenis latihan fisik bersifat lokal pada tulang. Kecepatan *bone turn over* atau remodeling berbeda tergantung lokasi yang sesuai dengan beban fisik, dekat dengan sendi dan keberadaan sumsum merah yang dominan di tulang trabekula (Downey, 2006). Dalam penelitian ini tikus direnangkan, maka yang aktif adalah tulang tungkai bawah sehingga dipakai tulang femur proksimal sebagai bahan penelitian dan dilakukan pemeriksaan imunohistologis pada daerah metafisis untuk melihat proses apoptosis osteoblas.

6.1 Pengaruh Latihan Fisik Intensitas Tinggi terhadap Kadar Glukokortikoid Darah

Latihan Fisik Intensitas Tinggi terbukti mempengaruhi kadar Glukokortikoid darah, hal ini dapat dilihat dengan adanya perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ($p > 0,05$) (tabel 5.2) dan analisis jalur menggunakan analisis regresi menunjukkan nilai

koefisien jalur positif 0,793, berarti latihan fisik intensitas tinggi meningkatkan kadar glukokortikoid darah.

Sesuai dengan penelitian Chatzitheodorou (2007), pada orang sehat dengan latihan fisik intensitas tinggi dalam waktu yang lama (12 minggu) akan meningkatkan konsentrasi serum kortisol. Demikian pula survei yang dilakukan pada 2300 pelari yang bertanding di Maraton Los Angeles 1987 menunjukkan peningkatan 60% hormon kortisol (Sherwood, 2004; Chatzitheodorou, 2007). Sedangkan penelitian Pederson (2000), menunjukkan bahwa latihan fisik intensitas tinggi dengan cara *forced exercise* pada mencit C3H selama 9 minggu dengan cara *treadmill running* (15 m/menit selama 30 menit/hari) meningkatkan respon hormonal terutama kortikosteron dibanding *sedentary control* dan *treadmill control group* (5 m/menit selama 5 min).

Peningkatan kadar glukokortikoid darah ini merupakan efek latihan fisik pada Aksis Hipotalamus-Pituitari-Adrenal (HPA). Sebagai respon terhadap rangsangan dari luar yang diterima sebagai ancaman homeostasis (stres), terjadi aktivasi sistem saraf otonom dan kadar kortisol plasma meningkat sebagai hasil aktivasi aksis hipotalamo-pituitari-adrenal (HPA axis). Hormon hipotalamus *corticotropin-releasing hormone* (CRH) dan *arginine vasopressin* (AVP) adalah pengatur utama kortikotropin (*adrenocorticotrophic hormone*; ACTH) yang disekresi dari kelenjar pituitari anterior. ACTH pada gilirannya akan merangsang produksi dan pelepasan kortisol dari zona fasikulata kortek adrenal (Warren, 2000).

Menurut penelitian Smoak (1991) dalam Warren (2000), latihan fisik intensitas tinggi mempengaruhi peningkatan aktivitas aksis HPA walaupun mekanisme yang mendasari masih belum sepenuhnya dapat dijelaskan. Dalam penelitiannya disebutkan bahwa sekresi ACTH dan kortisol lebih besar karena pengaruh latihan fisik daripada pengaruh CRH sendiri. Pada manusia, latihan fisik diikuti peningkatan pelepasan AVP ke dalam sirkulasi sesuai dengan intensitas latihan fisik. Peningkatan laktat plasma merupakan salah satu penyebab aktivasi aksis HPA sepanjang dilakukan latihan fisik. Mediator humoral lain seperti angiotensin II dan interleukin yang meningkatkan sepanjang latihan fisik juga mampu mengaktifkan aksis HPA tetapi peran pada manusia dalam aktivasi aksis HPA belum jelas. Aktivasi aksis HPA semula dijelaskan terjadi pada saat latihan fisik aerobik lebih dari 60% kekuatan aerobik maksimum. Tetapi pada beberapa penelitian respon kortisol plasma terhadap latihan fisik tergantung pada kondisi dasar (*baseline*) pra latihan (Warren, 2000).

Penelitian lain menunjukkan bahwa latihan fisik submaksimal dalam waktu lama (*prolonged submaximal*) dan latihan fisik intensitas tinggi dalam waktu sangat singkat (*very brief high-intensity exercise*) akan mengaktifkan aksis HPA. Latihan fisik intensitas tinggi dalam waktu singkat akan meningkatkan kadar ACTH plasma lebih tinggi daripada latihan submaksimal dalam waktu lama. Durasi latihan fisik juga berperan penting dalam meningkatkan kortisol plasma (Farrell dan Buono dalam Warren, 2000). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini yaitu adanya peningkatan kadar glukokortikoid akibat perlakuan latihan fisik intensitas tinggi yang dilakukan dalam waktu singkat dalam satuan detik.

Tipe latihan fisik juga menentukan kadar kortisol plasma. Latihan isometrik (*resistance*) mempengaruhi aktivasi aksis HPA yang tergantung pada intensitas latihan. Durasi dan jumlah repetisi tiap set dan lamanya istirahat antar set sangat menentukan respon kortisol. Latihan fisik anaerobik lebih meningkatkan peningkatan kortisol plasma daripada latihan aerobik (Kraemer, 1993, dalam Warren, 2000). Pada umumnya respon terhadap latihan intensif dalam jangka pendek meningkatkan kadar plasma kortisol khususnya anaerobik (Barron, 1985, dalam Warren, 2000).

Kortisol menghambat aktivitas aksis HPA pada tingkat pituitari dan hipotalamus. Sensitivitas terhadap mekanisme umpan balik adalah mekanisme penting dalam pengaturan aksis HPA. Sifat dan lama stres dapat merubah sensitivitas umpan balik kortisol pada manusia. Sebagai contoh, latihan fisik yang berat dapat merubah sensitivitas glukokortikoid di limfosit perifer. Terdapat perbedaan respon aksis HPA terhadap latihan fisik diantara individu berhubungan dengan perbedaan sensitivitas glukokortikoid (Warren, 2000). Setelah latihan fisik dalam jangka lama (*prolonged endurance exercise*), normalisasi kadar kortisol plasma akan kembali setelah 18-24 jam. Hal ini sesuai dengan perlakuan dalam penelitian dimana latihan fisik dilakukan dengan frekuensi 3 kali perminggu dengan selang waktu istirahat 1 hari.

Penelitian lain yang dilakukan Droste dan kawan-kawan (2008), stres menyebabkan peningkatan glukokortikoid plasma yang lebih tinggi diatas pola sekresi sirkadian normal. Tinggi dan pola respon glukokortikoid plasma tergantung sifat stresor. Setelah selesai perlakuan, konsentrasi glukokortikoid segera kembali ke *baseline* yang menyimpulkan adanya sirkadian normal

(Droste, 2008). Demikian juga pada penelitian ini dilakukan latihan fisik yang merupakan salah satu bentuk stresor fisik yaitu dengan menggunakan latihan renang yang menyebabkan peningkatan kadar glukokortikoid darah. Hasilnya semua hewan menunjukkan peningkatan bermakna kortikosteron (glukokortikoid pada tikus) sebagai respon terhadap renang intensitas tinggi. Renang intensitas tinggi adalah suatu stresor kuat, kombinasi aspek fisik dan psikis.

Kortikosteron disekresi oleh kelenjar adrenal secara pulsatil. Mekanisme pasti (dan lokasi generator pulsa) yang mendasari pelepasan secara pulsatil belum diketahui. Kemungkinan adanya keterlibatan PVN (sekresi pulsatil *corticotropin-releasing factor*), sistem saraf simpatis dan mekanisme umpan balik. Frekuensi pulsatil di hipokampus rata-rata adalah sekali perjam, yang berhubungan dengan frekuensi pulsatil kortikosteron dalam sirkulasi darah dan kelenjar adrenal. (Warren, 2000; Droste, 2008) Pada penelitian ini menggambarkan peningkatan bermakna kortikosteron setelah renang intensitas tinggi dibanding penempatan di lokasi baru sebagai stresor ringan pada kelompok kontrol.

Aktivasi sistem saraf simpatis dan aksis HPA karena latihan fisik menyebabkan perubahan fisiologis yang digambarkan sebagai respon terhadap stres. Banyak pustaka yang isinya menyatakan bahwa regulasi aktivasi respon stres akut memfasilitasi timbulnya berbagai aspek dari respon *fight-or-flight*. Stimulasi sistem saraf simpatis dan aksis HPA, misalnya pada peningkatan tekanan darah, mobilisasi energi, dan peningkatan beberapa respon imun. Banyak faktor yang mempengaruhi respon stres latihan fisik antara lain umur, gender, status kesehatan, kondisi tempat tinggal. Jenis

latihan fisik yang mempengaruhi respon stres meliputi intensitas, frekuensi, dan durasi. Lingkungan baru bagi hewan percobaan juga memicu respon stres, oleh karena itu harus dilakukan pengendalian terhadap lingkungan dan kebiasaan baru tersebut. Kontrol terhadap kebiasaan baru tersebut dapat dimaksimalkan dengan memilihkan waktu, kecepatan dan lama latihan (Kregel, 2006). Pada penelitian ini tikus mendapat aklimatisasi selama 1 minggu agar beradaptasi dengan lingkungan baru.

6.2 Pengaruh Latihan Fisik Intensitas Tinggi terhadap kadar Osteoprotegerin (OPG) darah

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar osteoprotegerin darah lebih rendah pada tikus yang mendapat latihan fisik intensitas tinggi dengan p yang bermakna. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Hermann (2004), melaporkan bahwa atlet wanita bila dibandingkan dengan kontrol *sedentary*, terdapat peningkatan kadar bone resorption (serum CTX) dan penurunan serum OPG. Pada penelitian ini penurunan OPG disebabkan peningkatan kadar glukokortikoid. Sesuai dengan penelitian Hofbauer (1999) dan Udagawa (2000) yang mengungkap bahwa pemberian glukokortikoid meningkatkan osteoklastogenesis dengan menghambat OPG sehingga proses resorpsi meningkat menyebabkan osteoporosis berat. Sedangkan penelitian Kahl dkk. (2005), menunjukkan wanita dengan kelainan depresi mayor meningkatkan resorpsi tulang (serum CTX) dan menekan konsentrasi OPG. Menurut Kearns (2008), glukokortikoid menekan ekspresi mRNA OPG khususnya pada osteoblas manusia dan *cell lines* osteoblas. Deksametason

dan prednisolon juga menghambat produksi OPG dan meningkatkan produksi RANKL osteoblas (Hoffbauer, 1999; Udagawa, 2000; Hermann, 2004; Kearns, 2008).

Penelitian West (2008), menunjukkan hasil yang berlawanan dengan menggunakan latihan fisik intensitas ringan-sedang, sehingga memperkuat hasil penelitian ini. West mengamati efek latihan fisik intensitas ringan-sedang pada wanita menstruasi yang latihan secara teratur dengan frekuensi sekali per minggu selama 2-3 bulan tidak memicu peningkatan kadar glukokortikoid dan menunjukkan peningkatan OPG sirkulasi sebesar 26% bila dibandingkan dengan wanita *sedentary* (Hermann, 2004; Kahl, 2005; West, 2008).

Remodeling tulang sangat berhubungan dengan aktivitas osteoblas, osteoklas, sitokin *reseptor activator of nuclear factor $\kappa\beta$ ligand* (RANKL) dan osteoprotegerin (OPG). Ikatan RANKL ke RANK merangsang formasi, diferensiasi, dan aktivasi osteoklas dan resorpsi tulang. Fungsi OPG sebagai reseptor pengecoh (*a decoy receptor*) yang dapat mengikat RANKL ikut berperan mengatur resorpsi tulang melalui hambatan interaksi RANKL-RANK. OPG terbukti penting pada patogenesis kehilangan tulang pada wanita post menopause. Estrogen dan latihan fisik keduanya berpengaruh pada metabolisme tulang. *In vivo*, ketiadaan estrogen meningkatkan rasio RANKL/OPG, mendukung osteoklastogenesis dan selaras dengan kehilangan massa tulang. Penelitian Nakamichi (2007) menunjukkan bahwa kadar RANKL serum meningkat 20 kali pada mencit tanpa OPG. (Nakamichi, 2007).

Penelitian Udagawa (2000) menunjukkan bahwa osteoklastogenesis dapat seluruhnya dihambat oleh OPG pada kultur atau yang diekspresikan di

sel stroma dan osteoblas. Menurut penelitian Bucay (1998), defisiensi OPG pada mencit akan berkembang menjadi awal osteoporosis. Kenyataannya beberapa studi menunjukkan bahwa OPG mengatur osteoklastogenesis secara *in vitro* dan *in vivo* melalui efek pencegahan terhadap RANKL (Lacey, 2000; Udagawa, 2000).

Banyak faktor yang mempengaruhi aktivitas OPG antara lain hormon leptin dari metabolisme lipid memodulasi remodeling tulang yang mekanismenya belum dimengerti, meningkatkan OPG (Burguera, 2001). Glukokortikoid menghambat OPG dan juga merangsang ekspresi RANKL (Hofbauer, 1999). Hormon paratiroid juga menurunkan OPG dan meningkatkan RANKL *in vitro* (Lee, 1999). *Insulin-like growth factor-I* (IGF-I) menurunkan OPG *in vitro* dan *in vivo* (Rubin, 2002).

6.3 Pengaruh Latihan Fisik Intensitas Tinggi terhadap Jumlah Osteoblas Apoptotik

Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara klinis terjadi peningkatan jumlah osteoblas apoptotik, dapat dilihat pada tabel 5.2 terdapat peningkatan rerata osteoblas apoptotik pada kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol tetapi secara statistik tidak menunjukkan hasil yang bermakna ($p > 0,05$). Jadi hasil pada penelitian ini menunjukkan bahwa sebenarnya ada pengaruh latihan fisik. intensitas tinggi terhadap perubahan apoptosis osteoblas. Hasil tidak bermakna kemungkinan disebabkan tidak dilakukan pemeriksaan pada awal penelitian sehingga variasi data lebar atau jumlah sampel terlalu sedikit. Tetapi pada beberapa penelitian terdahulu mendukung

hasil penelitian ini. Penelitian Pavalko (2003) menunjukkan bahwa *fluid shear stress* (FSS) yang terjadi karena rangsangan mekanik pada tulang, mengaktivasi sinyal *PI3-kinase*, mempengaruhi fosforilasi *Akt*, dan menghambat *TNF-alpha* yang menginduksi aktivasi *caspase 3* pada fase eksekusi proses apoptosis, sehingga sel osteoblas tetap hidup.

Mekanosensasi memegang peran penting pada proses perubahan osteoblas pada permukaan tulang menjadi osteosit. Secara *in vivo*, telah ditunjukkan bahwa pembebanan fisiologis mencegah apoptosis osteosit. Penelitian Bonewald (2006) secara *in vitro* menunjukkan bahwa *fluid flow shear stress* menghambat apoptosis osteosit yang dipengaruhi oleh serum *starvation* dan mencegah apoptosis osteosit yang dipengaruhi oleh deksametason dan *tumor necrosis factor-alpha* (Bonewald, 2006).

Glukokortikoid akan menurunkan prekursor osteoblas atau dengan kata lain menurunkan proses osteoblastogenesis dengan cara meningkatkan apoptosis osteoblas (Jia, 2006). Weinstein dan kawan-kawan (Lane, 2006) telah menemukan bahwa pemberian glukokortikoid pada mencit menyebabkan penurunan formasi tulang, meningkatkan resorpsi tulang dan meningkatkan apoptosis osteosit dan osteoblas. Penelitian Plotkin (2007) menunjukkan adanya efek pro-apoptotik yang merupakan aksi langsung steroid pada sel *osteoblastic lineage*, yang telah ditunjukkan melalui penelitian terdahulu pada kultur osteosit dan osteoblas. (Jia, 2006; Lane, 2006; Plotkin, 2007).

6.4 Pengaruh Latihan Fisik Intensitas Tinggi terhadap Kadar Osteokalsin Darah

Penelitian ini menunjukkan bahwa tikus yang mendapat latihan fisik intensitas tinggi mempunyai kadar osteokalsin lebih rendah dari tikus kelompok kontrol dengan p yang bermakna. Pada penelitian ini kadar osteokalsin mengalami penurunan seiring dengan peningkatan kadar glukokortikoid. Hal ini tampak dari analisis jalur terdapat pengaruh glukokortikoid pada osteokalsin yang menunjukkan nilai koefisien jalur negatif $-0,486$ berarti dengan meningkatnya glukokortikoid darah maka akan menurunkan kadar osteokalsin darah.

Hasil ini sesuai dengan penelitian pada mencit yang diterapi kortikosteroid menunjukkan penurunan densitas tulang, penurunan serum osteokalsin, penurunan area tulang kanelus, dan penyempitan area tulang trabekular (Weinstein, 1998; Bronner, 2005). Bagaimana pengaruh kortikosteroid terhadap penurunan serum osteokalsin belum diketahui mekanismenya.

Osteokalsin adalah protein non kolagen yang ditemukan pada tulang dan dentin. Osteokalsin disekresi oleh osteoblas dan berperan pada mineralisasi dan homeostasis kalsium. Osteokalsin juga menentukan fungsi sebagai regulator pembentukan tulang, tetapi peran pastinya belum diketahui., sering digunakan sebagai *marker* biokimia atau biomarker untuk proses pembentukan tulang. Telah sering diamati bahwa kadar osteokalsin serum yang tinggi sangat berhubungan dengan peningkatan *bone mineral density* (BMD) selama mendapat terapi dengan obat pembentukan tulang

untuk osteoporosis. Pada beberapa studi, osteokalsin digunakan sebagai *biomarker* preliminar untuk melihat efektivitas penggunaan obat-obat pembentukan tulang (CUSABIO BIOTECH CO., Ltd).

Osteokalsin adalah salah satu matriks protein non kolagen yang responsif terhadap $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ dan diproduksi sebagian besar oleh osteoblas (Bronner, 2005; Downey, 2006). TNF menurunkan ekspresi mRNA osteokalsin dalam kultur primer osteoblas dan kloning sel *line* osteoblas, yang merupakan aktivitas represi transkripsi oleh Nf- κ B. Disebutkan pula bahwa IL-1 menghambat penyusunan dan sekresi osteokalsin yang merangsang vitamin D melalui osteoblas trabekular tetapi tidak osteoblas periosteum (Bronner, 2005).

6.5 Pengaruh Latihan Fisik Intensitas Tinggi terhadap Kadar C-Telopeptide Darah

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa latihan fisik intensitas tinggi terbukti menurunkan kadar c-telopeptide darah dengan p yang bermakna. Hasil analisis jalur menunjukkan bahwa latihan fisik intensitas tinggi akan meningkatkan kadar glukokortikoid yang menurunkan kadar osteoprotegerin (OPG). Analisis jalur OPG terhadap C-Telopeptide menunjukkan hasil negatif -0,658 yang berarti penurunan kadar OPG meningkatkan kadar c-telopeptide darah.

Sesuai penelitian Hermann (2004), melaporkan bahwa pada atlet wanita bila dibandingkan dengan kontrol *sedentary*, terdapat penurunan serum OPG dan peningkatan kadar serum CTX penanda *bone resorption*.

Demikian juga penelitian Kahl dan kawan kawan (2005) menunjukkan bahwa wanita dengan kelainan depresi mayor meningkatkan serum CTX dan menekan konsentrasi OPG (Hermann, 2004; Kahl, 2005).

Sebaliknya studi yang dilakukan Lacey (2000) menunjukkan bahwa OPG mengatur osteoklastogenesis secara *in vitro* dan *in vivo* melalui efek pencegahan terhadap RANKL, sehingga peningkatan OPG akan menghambat osteoklastogenesis sehingga produk aktivitasnya yaitu CTX menurun (Lacey, 2000).

Pada saat proses resorpsi tulang, osteoklas melepas *collagen crosslink* hasil degradasi matriks protein (kolagen tipe 1) seperti *pyridinium crosslink* (*free pyridinoline* dan *deoxypyridinoline*), *cross-linked telopeptide* (*N-telopeptides* dan *C-telopeptide*) sebagai substansi petanda biokimiawi resorpsi atau pembongkaran tulang (Caulfield dan Reitz, 2004; Seibel, 2005).

6.6 Pengaruh Latihan Fisik Intensitas Tinggi terhadap Ratio C-Telopeptide/Osteokalsin

Latihan fisik intensitas tinggi akan mempengaruhi ratio c-telopeptide/osteokalsin melalui jalur: a) glukokortikoid menghambat kadar osteoprotegerin darah, b) kadar osteoprotegerin rendah meningkatkan kadar c-telopeptide, c) peningkatan c-telopeptide meningkatkan rasio c-telopeptide/osteokalsin, d) glukokortikoid menghambat osteokalsin, e) penurunan osteokalsin meningkatkan ratio c-telopeptida/osteokalsin.

Hasil analisis jalur dalam penelitian ini telah menunjukkan suatu hubungan kausal yang menggambarkan mekanisme ketidakseimbangan atau

gangguan remodeling tulang di mana terjadi peningkatan rasio c-telopeptide/osteokalsin ($\beta=0,825$) karena terjadi peningkatan kadar c-telopeptide darah secara langsung dari penurunan kadar osteoprotegerin akibat peningkatan kadar glukokortikoid. Sedangkan kadar osteokalsin menurunkan rasio c-telopeptide/osteokalsin ($\beta=-0,225$) karena menurunnya kadar osteokalsin darah akibat peningkatan kadar glukokortikoid.

Hasil penelitian ini menunjukkan kebaruan bahwa latihan fisik intensitas tinggi menyebabkan gangguan remodeling tulang melalui peningkatan kadar glukokortikoid darah yang menyebabkan :

1. penurunan kadar osteoprotegerin darah sehingga meningkatkan kadar c-telopeptide darah
2. penurunan osteokalsin darah yang tidak melalui jalur osteoblas apoptotik.
3. peningkatan rasio c-telopeptide/osteokalsin yang menggambarkan ketidakseimbangan atau gangguan remodeling tulang.

Jalur yang lebih berperan pada gangguan remodeling tulang adalah jalur peningkatan kadar glukokortikoid yang menurunkan kadar osteoprotegerin dan meningkatkan kadar c-telopeptide.

Keterbatasan penelitian ini adalah:

- Tidak dilakukan pemeriksaan kepadatan tulang karena belum adanya alat pengukur kepadatan tulang yang khusus untuk tikus.

- Tidak dilakukan pemeriksaan kadar RANKL untuk mengetahui rasio RANKL:OPG untuk mendukung peningkatan aktivitas osteoklastogenesis yang berakibat gangguan remodeling tulang
- Tidak diperiksa ekspresi Pyk2 dan JNK yang turut mempengaruhi proses apoptosis osteoblas.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Simpulan

- 7.1.1 Kadar glukokortikoid darah lebih tinggi pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik.
- 7.1.2 Kadar osteoprotegerin darah lebih rendah pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik.
- 7.1.3 Kadar c-telopeptide darah lebih tinggi pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik..
- 7.1.4 Kadar osteokalsin darah lebih rendah pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik.
- 7.1.5 Tidak terdapat peningkatan jumlah osteoblas apoptotik pada latihan fisik intensitas tinggi dibanding yang tidak diberi latihan fisik.
- 7.1.6 Ada hubungan kausal antara kadar glukokortikoid, osteoprotegerin, c-telopeptide, dan osteokalsin darah akibat latihan fisik intensitas tinggi.

Simpulan dari penelitian ini adalah mekanisme gangguan remodeling tulang akibat latihan fisik intensitas tinggi disebabkan peningkatan kadar glukokortikoid yang menyebabkan penurunan kadar osteoprotegerin sehingga meningkatkan kadar c-telopeptide. Di sisi lain peningkatan kadar glukokortikoid akan menyebabkan penurunan kadar osteokalsin yang tidak melalui jalur apoptotik osteoblas. Peningkatan kadar c-telopeptide dan penurunan kadar osteokalsin meningkatkan rasio c-telopeptide/osteokalsin sehingga terjadi ketidakseimbangan atau gangguan remodeling tulang. Jalur

yang lebih berperan pada gangguan remodeling tulang akibat latihan fisik intensitas tinggi ini adalah jalur penurunan kadar osteoprotegerin yang meningkatkan kadar c-telopeptide.

7.2 Saran

- 7.2 Melanjutkan penelitian ini dengan pemeriksaan kepadatan tulang sehingga bisa ditentukan batas rasio c-telopeptide/osteokalsin yang nantinya bisa dijadikan parameter gangguan remodeling tulang sebagai prediksi penurunan kepadatan tulang penyebab osteoporosis.
- 7.3 Melakukan pemeriksaan kadar RANKL untuk mengetahui rasio RANKL:OPG yang bisa mendukung parameter gangguan remodeling tulang.
- 7.4 Melakukan pemeriksaan ekspresi Pyk2 dan JNK untuk memperjelas faktor lain yang berpengaruh terhadap proses apoptosis osteoblas.
- 7.5 Melanjutkan penelitian dengan pemberian preparat osteoprotegerin pada atlet.

DAFTAR PUSTAKA

- Abu EO, 2000. The Localization of the Functional Glucocorticoid Receptor α in Human Bone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Vol. 85, No. 2, pp.883-889.
- Adler RA, 2003. Suggested Guidelines for Evaluation and Treatment of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis for the Department of Veteran Affairs. *Arch Intern Med*, Vol. 163, pp. 2619-2624.
- Baron R, 2006. Anatomy and Ultrastructure of Bone Histogenesis, Growth and Remodeling. <http://www.endotext.org> (accessed 7/5/2008).
- Baziad A, 2003. Menopause dan andropause. Ed1, Jakarta: Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo, hlm 177-182.
- Bompa OT, 1994. Theory and methodology of training. The key to Athletic Performance. Third edition, Dubuque, Iowa: Kendall/ Hunt Publishing Company, pp 29-48, 75-92.
- Bonewald LF, 2006. Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. *Bonekey Osteovision*. 2006 October ; 3(10): 7–15.
- Bouassida A, Zalleg D, Zaouali-Ajina M, 2006. Parathyroid Hormone And Physical Exercise: A Brief Review. *Journal of Sports Science and Medicine*; 5: 367-374.
- Bouchard C, Shepard RJ and Stephen T, 1993. Physical Activity, fitness and health consensus statement. Kingwood, South Australia: Human Kinetics Publisher, pp 40-41, 186-208.
- Bucay N, 1998. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12:1260-8.
- Burguera, 2001. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology* 142:3546—53.
- Burger EH and Klein-Nulend J, 1999. Mechanotransduction in Bone. Role of The Lacuno-canalicular Network. *The FASEB Journal* 13: S101-S112.
- Burr DB dan Martin RB, 1992. Mechanism of Bone adaptation to the Mechanical Environment in: The changing Architecture of the skeleton. *Triangle Sandoz Journal of Medical Science*, 31(2/3). pp.59-76.
- Burrows M, A M Nevill, S Bird and D Simpson, 2003. Physiological factors associated with low bone mineral density in female endurance runners. *Br. J. Sports Med.*37;67-71.

- Calderwood DA, 2004. Integrin Activation. *Journal of Cell Science*, Vol. 117, pp.657-666.
- Carson E, Clifton D and Lee T, 2005. Mus musculus. Dr House Mouse in the House. Available from URL: [http://www.bio.unc.edu/courses/2005Spring/biol050h/Genome%20prenations/House](http://www.bio.unc.edu/courses/2005Spring/biol050h/Genome%20prenations/House%20FINAL.ppt) Mouse%20FINAL.ppt (accessed 2/3/2008).
- Caulfield MP and Reitz RE, 2004. Biochemical Marker of Bone Turnover and heir Utulity in Osteoporosis. *Medical Laboratory Observer. Montvale* 36: 34-38.
- Chatzitheodorou D, 2007. A Pilot Study of the Effects of High-Intensity Aerobic Exercise Versus Passive Interventions on Pain, Disability, Psychological Strain, and Serum Cortisol Concentrations in People With Chronic Low Back Pain. *Physical Therapy*, Vol. 87, No. 3, pp. 304312.
- Cullen MD, Iwaniec UT, and Lux MJB, 2000. Skeletal Respon to Exercise and Training. Philadelphia, pp. 227-229.
- Derakhsan M, 2007. Apoptosis at a glance: death or life? *Pak J Med Sci*: 23(6): 979-982.
- Dorland's Illustrated Medical Dictionary 31st ed., 2007. Saunders Elsevier, USA, pp. 1161.
- Downey PA, Siegel MU, 2006. Bone Biology and the Clinical Implications for Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell*, Vol. 89, pp, 747-754.
- Dvorak J, 2006. Glucocorticosteroids in football: use and misuse. *British Journal of Sports Medicine*; 40(supplement 1): 148-154.
- Ehrman JK, 2009. Clinical Exercise Physiology Second Edition. Human Kinetics, United States. Pp. 485-495.
- Elmore, 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35: 495-516.
- Ferreti JL, Cointry GR, Capozza RF, Capiglion R dan Chiappe MA, 200. Analysis of Biomechanical Effects on Bone and on the Muscle Bone Interactions in Small Animal Models. *J. Musculoskeletal Neuron Interact*, 1(3). Pp.263-274.
- Fox EL and Mathews DK, 1985. The Physiological Basis of Physical Education and Athletics. 3th ed. Philadephia: Saunders College Publishing, pp574-578.

- Galli C, 2008. Targeted Deletion of a Distant Transcriptional Enhancer of the Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand Gene Reduces Bone Remodeling and Increases Bone Mass. *Endocrinology* 149(1): 146-153.
- Ganong WF, 2004. Review of Medical Physiology. The McGraw-Hill Companies, Inc. USA. Pp. 342-380.
- Garcia AJ, Rayes CD, 2005. Bio-adhesive Surface to Promote Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *J of Dental Research*, Vol84, No. 5, pp. 407-413.
- Ghavani S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshragi M, et al., 2009. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet*, 46: 497-510.
- Gibbon, Barry, Herman & Joan, 1997. True and Quasi Experimental Designs. Practical Assessment, *Research and Evaluation* 5(14).
- Giustina A, 1998. Pathophysiology of the Neuroregulation of Growth Hormone Secretion in Experimental Animals and the Human. *Endocrine Reviews* 19(6): 717-797.
- Gleeson M, 2007. Immune Function in Sport and Exercise. *J. Appl Physiol*, Vol. 103, pp. 693-699.
- Goping IS, Barry M, Liston P, Sawchuk T, 2003. Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity* 18, 355-365.
- Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, et al., 2000. The Expression of Osteoprotegerin and RANK Ligand and the Support of Osteoclast Formation by Stromal-Osteoblast Lineage Cells Is Developmentally Regulated. *Endocrinology* Vol. 141, No. 12, pp. 4768-4776.
- Gu G, Kurata K, Chen Z dan Vaananen K, 2007. Osteocyte: a cellular Basis for Mechanotransduction. *MCB*, 3(4):183-184.
- Guo Y, 2002. Caspase-2 Induces Apoptosis by Releasing Proapoptotic Proteins from Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277, No. 16, pp. 13430-13437.
- Guyton AC, 2006. Textbook of Medical Physiology. WB Saunders Company.
- Hanafiah KA, 2004. Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada, hlm. 5-12.
- Handojo I, 2003. Pengantar Imunoasai Dasar. Airlangga University Press.

- Handojo I, 2008. Imunoasai dari Sitokin (Cytokine), Hand out kuliah. Bagian Patologi Klinik, FK Unair/Dr.Soetomo, Surabaya.
- Harada S and Rodan GA, 2003. Control of osteoblast function and regulation of Bone Mass. *Nature* 423 (15 May 2003): 349-355.
- Hart KJ, Shaw JM, Vajda E, 2001. Swim Trained Rat Hve Greater Bone Mass, Density, Stregth, and Dynamics. *J Appl Physio*, Vol. 91, pp. 1663-1668.
- Hermann, 2004. The assessment of bone metabolism in female elite endurance athletes by biochemical bone markers. *Clin. Chem Lab Med* 2004: 42:1384-9.
- Hofbauer, 1999. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoid in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced. *Endocrinology* 140:4382-9.
- Hofbauer, 2001. Role of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 279:243-53.
- Honda A, 2003. High-impact Exercise Strengthens Bone in Osteopenic Ovariectomized Rats with the Same Outcame as Sham Rat. *J Appl Physiol* 95: 1032-1037.
- Howard B, 2000. Getting Start With Endurance Exercise Aerobic Activities. *Health and Fitness Report*, Vol 1.
- Huang TH, 2003. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. *J. Appl. Physiol* 95: 300-307.
- Hurwitz S, 2004. Diurnal variation of aldosterone and plasma rennin activity: timing relation to melatonin and cortisol and consistency after prolonged bed rest. *J. Appl Physiol*, Vol. 96, pp. 1406-1414.
- Ikeda T, 2001. Expression profiles of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand, receptor activator of nuclear factor kappaB, and osteoprotegerin messenger RNA in aged and ovariectomized rat bones. *J Bone Miner res* 16:1416-25.
- Jia D, 2006. Glucocorticoids Act Directly on Osteoclasts to Increase Their Life Span and reduce Bone Density. *Endocrinology* 147(12): 5592-5599.
- Judex s, 2000. High-impact Exercise and Gowing Bone: Relation between High Strain Rates and Enhanced Bone Formation. *J Appl Physiol* 88: 2183-2191.

- Kahl KG, Rudolf S, Dibbelt L, 2005. Decreased osteoprotegerin and increased bone turnover in young female patients with major depressive disorder and a lifetime history of anorexia nervosa. *Osteoporos Int* 2005; 16:424-9.
- Kaniawati M, 2005. Biochemical Markers of Bone Turnover. The 2nd National Congress Indonesian Osteoporosis Association, Surabaya.
- Kawanaka K, 1998. Effects of high-intensity intermittent swimming on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. *J. Appl. Physiol.* 84(6): 1852-1857, 1998.
- Kearns AE, Khosla S and Kostenuik PJ, 2008. Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease. *Endocrine Reviews*, April 2008, 29(2):155–192
- Kemmler W, 2002. Exercise Effect on Fitness and Bone Mineral Density in Early Post menopausal Women: 1-year EFOPS results. *Med. Science Sport Exercise* 34 (2): 2115-2123.
- Kim R, Emi M, Tabnabe K, 2006. The role of apoptosis in cancer cell survival and therapeutic outcome. *Cancer Biol Ther* 5(11): 1429-42.
- Kohort WM, 2004. Physical Activity and Bone Health. *Medicine and Science in Sport and Exercise* : 1985.
- Kregel KC, 2006. Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols. *American Physiological Society*, pp. 1-35.
- Kumar V, Abbas AK and Fausto N, 2005. Robbins and Cotran Pathologic Basic of Disease, 7th ed. China: Elsevier Saunders, pp. 26-106.
- Kim HJ, 2006. Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast. *The Journal of Clinical Investigation*, volume 116, Number 8. pp. 2152-2160.
- Kondo H, 2005. Unloading Induces Osteoblastic Cell Suppression and Osteoclastic Cell Activation to Lead to Bone Loss via Sympathetic Nervous System. *The journal of Biological Chemistry*, Vol.280, No. 34, pp. 30192-30200.
- Lacey DL, 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165-76.
- Lacey DL, 2000. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. *Am J Pathol* 157:435-48.
- Lee SK, 1999. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acids expression in murine

- bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 140:3552-61.
- Lane NE, 2006. Glucocorticoid-Treated Mice Have Localized Changes in Trabecular Bone Material Properties and Osteocyte Lacunar Size That Are Not Observed in Placebo-Treated or Estrogen-Deficient Mice. *J Bone Miner Res.* 21(3): pp. 466–476.
- Losel RM, 2003. Nongenomic Steroid Actin: Controversies, Questions, and Answers. *Physiol Rev* 83: 965-1016.
- Lu NZ, 2007. Selective regulation of Bone Cell Apoptosis by Translational Isoforms of the Glucocorticoid Receptor. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 27, No. 20, pp. 7143-7160.
- Madden CC, Putukian M, Young CC, McCarty EC, 2010. Netter's Sports Medicine. Saunders Elsevier, Philadelphia. Pp 72-85, 128-133, 189-194, 455-463.
- Marieb EN, 2008. Human Anatomy fifth edition. Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings, 1301 Sansome St., San Francisco, CA 94111. Pp. 126-145.
- Manolagas SC, 2000. Birth and Death of Bone Cells: Basic regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocrine Reviews* 21(2): 115-137.
- Manolagas SC, 2002. Sex Steroid and Bone. *Recent Progress in Hormone Research.* 57: 385-409.
- Martini FH, Timmons MJ, Tallitsch RB, 2009. Human Anatomy 6th edition. Pearson Education, Inc. San Francisco, CA 94111. Pp. 112-130.
- Mazziotti, 2006. Clinical study. Increased serum osteoprotegerin values in long-lived subjects: different effects of inflammation and bone metabolism. *European Journal of Endocrinology*, 154 373–377.
- Mitchell RN, 2009. Robbins & Cotran, Buku Saku Dasar Patologis Penyakit. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, hlm 2-28.
- Montecucco C, Caporali R, Caprotti P, Notario A, 1992. Sex hormones and bone metabolism in postmenopausal rheumatoid arthritis treated with two different glucocorticoids, *J Rheumatol* 19:1895-900.
- Nakamichi Y, Udagawa N, Kobayashi Y, Takahashi N, 2007. *The Journal of Immunology*, 178: 192-200.
- Nakamura, 2003. Osteoprotegerin Regulates Bone Formation through Coupling Mechanism with Bone Resorption. *Endocrinology* Vol. 144 (12), pp. 5441-5449.

- Neiman DC, 1993. Fitness and your health. California: Bull Publishing Company, pp 23-31.
- O'Brien CA, Jia D, Plotkin LI, Bellido T, Powers CC, Stewart SA, 2004. Glucocorticoids acts directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology* 145:1835-41.
- Owen GRH, 2005. Focal Adhesion Quantification – A New Assay of material Biocompatibility. *European Cell and Material* 9: 85-96.
- Park SY, Avraham S, 2004. RAFTK/Pyk2 Activation Is Mediated by Trans-acting Autophosphorylation in a Src-independent Manner. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 279, No. 32, pp. 33315–33322.
- Pavalko FM, Gerard RL, Ponik SM, Gallagher PJ, Jin Y dan Nobell S, 2002. Fluid Shear Stress Inhibits TNF- α Induced Apoptosis in Osteoblasts: A Role for Fluid Shear Stress-Induced Activation of PI3-kinase and Inhibition of Caspase 3. *Journal of Cellular Physiology*; 194:194-205.
- Pedersen BK, 2000. Exercise and the Immune System: Regulation, Integration, and Adaptation. *Physiological Reviews*, Vol. 80, NO.3, pp. 1055-1081.
- Pellinen T and Ivaska J, 2006. Integrin Traffic. *Journal of Cell Science* 119, pp. 3723-3731.
- Plotkin LI, 2005. Mechanical Stimulation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins, Src kinases, and ERKs. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C633-C643.
- Plotkin LI, 2007. Glucocorticoids Induce Osteocyte Apoptosis by Blocking Focal Adhesion Kinase-mediated Survival. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 282, No. 33, pp. 24120-24130.
- Ralston SH and Benoit de Crombrughe, 2006. Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. Cold Spring Harbor Laboratory Press. *Genes & Dev.* 2006 20: 2492-2506.
- Raison, CL, 2003. When Not Enough Is Too Much: The Role of Insufficient Glucocorticoid Signaling in the Pathophysiology of Stress-Related Disorders. *Am J Psychiatry*, 160:1554–1565.
- Raiz, 1999. Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. *Clinical Chemistry* 45(8): 1353-1358.
- Raisz GL, 2005. Pathogenesis of osteoporosis: Concept, Conflicts, and Prospect. *J.Clin.Invest.* 115: 3318-3325.

- Reid IR, 2005. Effects of a β -Blocker on Bone Turnover in Normal Postmenopausal Women: A Randomized Conytrrolled Trial. *The Journal of Clinical Endicrinology & Metabolism* 90(9):5212-5216.
- Riggs BL, Khosla S, and Melton JL, 2002. Sex steroid and The Construction and Conservation of the Adult Skeleton. *Endocrinology Reviews* 23(3): 279-302.
- Robergs RA, 2003. Fundamentals of Execise Physiology, For Fitness, Performance, and Health, Second Edition. McGraw Hill Higher Education, pp. 208-213, 356-358.
- Rubin J, 2002. Insulin Like Growth Factor-I (IGF-I) regulates osteoprotegerin (OPG) and RANK Ligand (RANKL) in vitro and osteoprotegerin in vivo. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87:4273-9.
- Salingcarnboriboon R, 2006. Runx is Target of Mechanical Unloading to alter Osteoblastic Activity and Bone Formation in Vivo. *Endocrinology* 147 (6): 2296-2305.
- Sambrook P, 2002. Bone Structure and Function in Normal and Disease States.
- Schroder K, Hual J, Jockel H, Oberle C, Bomer C, 2010. Non-caspase proteases: triggers or amplifiers of apoptosis? *Cell Mol Life Sc*: 67(10): 1607-18.
- Selim AA, Mahon M, Juppner H, Bringham FR dan Divieti P, 2006. Role of calcium channels in carboxy-terminal parathyroid hormone receptor signaling. *Am J Physiol Cell*; 291:C114-121.
- Simonet, WS, 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309-19
- Schnermann J, 2002. E x e r c l s e. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, Vol. 283, pp. R2-R6.
- Seibel MJ, 2005. Biochemical Markers of Bone Turnover Part I: Biochemistry and Variability. *Clin Biochem Rev* 26: 97-116.
- Sharan K, Siddiqui JA, Swarnkar G dan Chattopadhyay N, 2008. Role of calcium-sensing receptor in bone biology. *Indian J Med Res*; 127(March 2008):274-286.
- Sherwood L, 2004. Human Physiology From Cells to Systems. Australia: Thomson, pp. 769.
- Smith JB and Mangkoewidjojo S, 1987. The Care, Breeding and Management of Experimental animals for Research in the Tropics. Canberra: *The*

International development Program of Australian Universities and Colleges Limited (IDP), pp.11-57.

- Sperelakis N, 2001. Cell Physiology Sourcebook, A Molecular Approach 3rd edition. Academic Press, A Harcourt Science and Technology Company, Sandiego, California, USA, pp. 191-204; 1171-1182.
- Steel RGD, Torrie , 1991. Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik. Alih bahasa Bambang Sumantri, Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama, hlm.139-148.
- Suatmadji DW, 2001. Pathogenesis of Steroid-Induced Osteoporosis. Naskah lengkap Simposium Asma & Osteoporosis. PDPI Cabang Malang/ RSUD Dr Saiful Anwar. Pp. 41-55
- Sudiana IK, 2005. Teknologi Ilmu Jaringan dan Imunohistokimia. CV Sagung Seto, Jakarta.
- Swanson, 2006. Glucocorticoid Regulation of Osteoclast Differentiation and Expression of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) in Mouse Calvarial Bones. *Endocrinology* Vol. 147, pp. 3613-3622.
- Takuma A, 2003. Dexamethasone Enhances Osteoclast Formation Synergistically with transforming Growth Factor- β by Stimulating the Priming of Osteoclast Progenitors for Differentiation into Osteoclasts. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, No. 45, pp. 44667-44674.
- Tanaka Y, 2005. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Cur Drug Targets Inflamm Allergy*, 4(3):325-328.
- Tandra H, 2009. Segala sesuatu yang harus anda ketahui tentang osteoporosis, mengenal, mengatasi, dan mencegah tulang keropos. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, hlm. 4-77.
- Teitelbaum, 2007. Osteoclasts: What Do They Do and How Do They Do It? *The American Journal of Pathobiology*, Vol. 170, NO. 2, pp. 427-435.
- Tsujimoto K, 2005. Regulation of the Expression of Caspase-9 by the transcription Factor Activator Protein-4 in Glucocorticoid-induced Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, vol 280, No. 30, pp. 27638-27644.
- Udagawa N, 2000. Osteoprotegerin Produced by Osteoblasts Is an Important Regulator in Osteoclast Development and Function. *Endocrinology*, Vol. 147 (12), pp. 3478-84; 5592-5599.

- Umemura Y, 2002. Effect of 6-Month Whole Body Vibration Training on Hip density, Muscle Strength and Postural Control in Post Menopausal Women: Randomized Controlled Pilot Studi. *J Bone Mine Res* 19: 352-359.
- Wahyuni S, 1998. Pengaruh Pb asetat terhadap gambaran histologist tubulus contortus proksimalis, tubulus contortus distalis, glomerulus ginjal mencit (*Mus musculus*). Tesis Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- Wang Y, McNamara LM, Schaffler MB dan Weinbaum S, 2007. A model for the role of integrins in flow induced mechanotransduction in osteocyte. *PNAS* 104(40): 15941-15946.
- Warren MP, Constantini NW, 2000. Sports Endocrinology. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 43-76.
- Watkins J, 2010. Structure and Function of the Musculoskeletal System Second Edition. Human Kinetics Premier Print Group, United States of America, pp. 76-93.
- Watts NB, 1999. Clinical Utility of Biochemical Markers of Bone remodeling. *Clinical Chemistry* 45: 1359-1368.
- Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC, 1998. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanism of their deleterious effects on bone, *J Clin Invest* 102:274-82.
- West SL, 2009. The effect of exercise and estrogen on osteoprotegerin in premenopausal women. *Bone* 44(2009): 137-144.
- Wilmore JH, Costill DL, Kenney WL, 2008. Physiology of Sport and Exercise, fourth edition. Human Kinetics, United States of America, pp. 295-315; 381-446.
- Yirmiya R, 2006. Depression induces bone loss through stimulation of the sympathetic nervous system. *PNAS*, Vol. 103, No. 45, pp. 16876-16881.

Lampiran 1:

Surat Keterangan Kelaikan Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
*Animal Care and Use Committee (ACUC)***

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
“ETHICAL CLEARENCE”**

No : 109-KE

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :**

PENELITIAN BERJUDUL : Profil Apoptosis Osteoblas, Kadar Osteoprotegerin,
Osteoklasin Dan C-Telopeptide Pada Penurunan
Kepadatan Tulang Tikus Putih (*Rattus novergicus*)
Betina Akibat Latihan Fisik Intensitas Tinggi

PENELITI UTAMA : Gadis Meinar Sari

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT
PENELITIAN** : Program Studi Ilmu Kedokteran
Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga

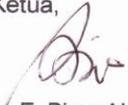
DINYATAKAN : LAIK ETIK

Surabaya, 7 Januari 2011

Mengetahui,
Dekan FKH-Uhair,

Ketua,


Prof. Romziah Sidik, Ph.D.,drh.
NIP. 130687305


Dr. E. Bimo Aksono, M.Kes.,Drh.
NIP. 132014464

Lampiran 2:**Data Hasil Penelitian**

Sam pel	Glukokor tikoid (ng/ml)	Osteoprotegerin (pg/ml)	Osteokalsin (ng/ml)	C- Telo peptide (ng/ml)	Apoptotik osteoblas (jml sel/lap pdg)
Kelompok Kontrol					
K1	3.93	118.2	161.8	1.92	2.0
K2	8.5	96.0	188.8	1.53	3.0
K3	3.21	93.4	283.2	0.63	9.0
K4	1.25	101.8	154.9	2.25	0.0
K5	4.2	80.5	130.3	2.14	5.0
K6	2.14	120.8	99.0	1.91	0.0
K7	0.36	98.6	148.2	2.04	16.0
K8	2.81	88.4	198.7	2.51	6.0
K9	5.36	140.1	117.0	1.68	1.0
K10	1.13	106.2	140.2	1.64	21.0
Kelompok Perlakuan					
P1	13.56	45.0	93.7	2.41	6.0
P2	12.81	53.7	71.0	4.77	18.0
P3	13.04	32.3	91.0	12.52	42.0
P4	9.36	20.5	91.6	4.76	0.0
P5	8.12	46.8	99.0	6.32	20.0
P6	6.1	52.8	77.4	4.1	62.0
P7	7.82	13.7	50.2	4.42	23.0
P8	6.16	38.8	82.1	3.87	0.0
P9	8.02	48.6	93.1	5.15	0.0
P10	11.34	50.2	80.8	5.36	13.0

Lampiran 3:**Tabel Contoh Pencatatan Waktu Latihan Fisik Intensitas Tinggi pada Hewan Percobaan**

Hewan percobaan	Berat Badan (gram)	Beban 18% BB (gram)	T maks (detik)	T90 (detik)	Istirahat 2 T90	T90
1	2	3	4	5	6	7
P 1	155	27,9	21	19	0:57	1:16
P 2	165	29,7	29	26	1:18	1:44
P 3	125	22,5	28	25	1:15	1:25
P 4	140	25,2	24	22	1:06	1;28
P 5	130	23,4	27	24	1:12	1:36
P 6	145	2,61	25	23	1:09	1:32
P 7	155	27,9	29	26	1:18	1:44
P 8	150	27,0	26	23	1:09	1:12
P 9	140	25,2	33	30	1:30	2:00
P 10	140	25,2	24	22	1:06	1:28

Keterangan :

1. Kode tikus percobaan.
2. Berat badan tikus yang ditimbang dengan timbangan analitik (Torbal) dalam satuan gram.
3. Beban 18% BB adalah berat beban yang dihitung berdasar berat badan tikus kali 18%, dalam satuan gram.
4. Tmaks adalah waktu maksimum yang dihitung sejak tikus dimasukkan ke kolam sampai tidak mampu lagi berenang yang ditandai dengan tenggelamnya tikus disertai pengeluaran gelembung udara besar pertama kali, dalam satuan detik.
5. T90 adalah waktu yang menunjukkan dosis latihan intensitas tinggi yang dihitung 90% kali waktu maksimum (Tmaks), dalam satuan detik.
6. Istirahat 2T90 adalah waktu istirahat yang dihitung 2 kali T90, dalam satuan detik.

Lampiran 4 :**Pembuatan Sediaan Jaringan Tulang dengan Teknik Imunohistokimia**Proses Dekalsifikasi:

1. Disiapkan larutan dekalsifikasi (aquades) dengan volume 30-60 x volume spesimen tulang. Diberi EDTA sedikit demi sedikit sambil diaduk sampai EDTA tidak bisa larut lagi (berarti EDTA sudah jenuh). Spesimen tulang dimasukkan ke dalamnya (direndam).
2. Setiap hari larutan dekalsifikasi tersebut diganti sampai jaringan tulang menjadi lunak (ditusuk dengan jarum). Tujuan diganti setiap hari supaya larutan dekalsifikasi tetap *fresh*, masih dapat mengikat Ca secara maksimal.
3. Kurang lebih selama 1 bulan, jaringan akan menjadi lunak. Kemudian spesimen dicuci dengan air mengalir supaya sisa-sisa asam hilang.

Proses pembuatan sediaan jaringan :

1. Penarikan air (DEHIDRASI)
Menggunakan alkohol dari konsentrasi rendah sampai tinggi (70% sampai konsentrasi absolute), supaya air tertarik sedikit demi sedikit sehingga tidak merusak morfologi jaringan. Air tidak bisa bertemu dengan paraffin sehingga dilarutkan dengan alkohol lebih dulu.
2. Dilakukan pelarutan organik untuk alkohol dengan menggunakan Xylool yang berfungsi juga menjernihkan jaringan (CLEARING)
3. Setelah jaringan terisi Xylool, diberi larutan parafin 50-60°C supaya menginfiltirasi jaringan (IMPREGNASI) dan menyamakan dengan proses pengeblokan (EMBEDDING)
4. Dilakukan pengeblokan dengan paraffin (BLOCKING)
5. Jaringan dalam blok paraffin dipotong dengan mikrotom.
Untuk jaringan dengan stroma yang jarang (tulang) pemotongan 3-4 µm (micron)
Untuk jaringan dengan stroma yang padat pemotongan bisa lebih tipis.

Penempelan pada slide:

1. Setelah jaringan dalam parafin dipotong kemudian ditempelkan pada mikroskop *slide* (bisa dengan dicelupkan ke dalam air hangat kemudian ditempelkan pada *slide*)
2. Dipanaskan sedikit supaya parafin leleh sehingga lengket di kaca
Boleh menggunakan cairan putih telur sebagai lem tetapi nanti akan mempengaruhi hasil pengecatan (ada background biru-biru).

Proses Pewarnaan Hematoxilen-Eosin untuk Pengamatan struktur

1. *Slide* dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit.
2. Kemudian diwarnai dengan hematoxilen selama 10 menit.
3. Setelah itu, direndam dalam tap water selama 10 menit.
4. Kemudian dibilas dengan dH₂O.
5. Dilakukan dehidrasi dengan alkohol berseri 30% dan 50% masing-masing selama 5 menit.
6. Kemudian diwarnai dengan larutan Eosin selama 3 menit.
7. Setelah itu dibilas dengan alkohol 30%.
8. Dicuci dengan dH₂O selama 5 menit dan dikering anginkan.
9. Kemudian dilakukan mounting dengan entelan dan tutup dengan *cover glass*.

Lampiran 5:

Deteksi Apoptosis dengan Apoptag Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Tunel assay)

Blok parafin jaringan tulang dipotong setebal 4-6 μm dengan mikrotom dan diletakkan di atas obyek glas selanjutnya dilakukan deparafinisasi jaringan dengan *xylene*, etanol absolute, etanol 95%, etanol 70% dan terakhir dengan PBS. Jaringan ditetesi proteinase K selama 15 menit, kemudian dicuci dengan dH_2O sebanyak 2 kali. Untuk menghilangkan *endogenous peroxidase*, jaringan ditetesi 3% H_2O_2 PBS selama 5 menit pada suhu kamar, lalu dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali dan masing-masing selama 2 menit. Cairan di sekitar jaringan dihisap dengan kertas pengering kemudian ditetesi dengan 75 μl *equibration buffer* dan diinkubasi 10 menit pada suhu kamar. Cairan di sekitar jaringan dihisap dengan kertas pengering dan ditetesi dengan *working strength* TdT enzyme 55 $\mu\text{l}/5 \text{ cm}^2$ kemudian diinkubasi selama satu jam dalam wadah yang lembab.

Sediaan jaringan dimasukkan dalam *coplin jar* berisi *working strength stop/wash buffer*, digoyang-goyangkan selama 15 detik, kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar. Sediaan jaringan lalu dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali, kemudian cairan di sekitar jaringan dihisap dengan kertas pengering dan ditetesi dengan *anti-digoxigenin conjugate* (yang dikeluarkan dari lemari es dan didiamkan pada suhu kamar). Cairan di sekitar jaringan dihisap dan diinkubasi dalam suhu ruangan selama 30 menit dalam tempat yang lembab. Selanjutnya dicuci dengan PBS sebanyak 4 kali, kemudian dilakukan pemberian warna yaitu dengan meneteskan peroxidase substrat 75 $\mu\text{l}/5 \text{ cm}^2$ dibiarkan selama 3-6 menit dalam suhu kamar. Sediaan dicuci 3x dengan dH_2O dalam *coplin jar* masing-masing satu menit selanjutnya diinkubasi dalam dH_2O selama 5 menit pada suhu kamar dan ditambahkan *counterstain methyl green*, kemudian dicuci dengan dH_2O sebanyak 3 kali. Kemudian sediaan diberikan *xylene* lalu cairan di sekitar potongan jaringan dikeringkan dengan kertas pengering.

Pewarnaan Hematoxylin Eosin

Blok parafin jaringan tulang dipotong setebal 4 – 6 μm dengan mikrotom dan potongan jaringan dipindahkan ke dalam *water bath* berisi air dengan suhu 60° C lalu diletakkan di atas obyek glas yang telah diolesi dengan *egg albumin*, kemudian dikeringkan di atas *hot plate*. Kemudian dilakukan pewarnaan *hematoxylin eosin* dengan cara mencelupkan sediaan dalam *xylo-1* selama 2 menit, *xylo-2* selama 2 menit, alkohol dari absolut ke rendah selanjutnya dicuci dengan air mengalir. Kemudian sediaan dicat dengan hematoxylin selama 15 menit, dicuci kembali dengan air mengalir, lalu dicat dengan eosin selama 1 menit selanjutnya dalam alkohol 95% bak-1 dan bak-2 masing-masing 1 menit, dan terakhir dalam alkohol absolute bak-1, 2 dan 3 masing-masing 2 menit.

Lampiran 6:**Pemeriksaan ELISA untuk Mengukur Kadar Glukokortikoid dengan Rat
Glucocorticoid (GC) ELISA Kit**

(Catalog No. CSB-E11326r)

Semua reagen dan sampel dalam temperatur ruangan sebelum digunakan.

1. Ditambahkan 100 μ l sampel pada setiap sumuran dan ditutup dengan selotip. Diinkubasikan selama 2 jam pada suhu 37° C.
2. Cairan duang dari setiap sumuran, jangan dibilas.
3. Ditambahkan 100 μ l larutan antibodi Biotin pada setiap sumuran. Diinkubasikan selama 1 jam pada 37°C. Larutan antibodi Biotin akan berkabut. Dihangatkan pada suhu ruangan dan campur perlahan hingga larutan homogen.
4. Aspirasi setiap sumuran dan cuci, ulangi proses tersebut tiga kali hingga tiga kali pencucian. Cuci dengan mengisi setiap sumuran dengan wash buffer (200 μ l). Dilakukan beberapa kali hingga bersih. Setelah akhir pencucian sisa *wash buffer* dihapus dengan mengaspirasi. Piring dibalik dan dikeringkan dengan kertas hisap.
5. Ditambahkan 100 μ l larutan HRP-avidin pada setiap sumuran dan tutup piringan dengan selotip baru. Diinkubasikan selama 1 jam pada 37°C.
6. Ulangi aspirasi dan dicuci tiga kali seperti nomor 4.
7. Ditambahkan 90 μ l *TMB substrate* pada setiap sumuran dan inkubasikan selama 30 menit pada 37°C. Simpan di tempat yang gelap dan terhindar dari angin dan perubahan suhu.
8. Tambahkan 50 μ l *stop solution* pada tiap sumuran. Bila perubahan tidak sewarna, tepuk piringan perlahan untuk meyakinkan larutan tercampur sempurna.
9. Ditentukan densitas optikal setiap sumuran dalam 30 menit menggunakan *microplate reader* yang diatur pada 450 nm.

Lampiran 7:**Pemeriksaan ELISA untuk Mengukur Kadar Osteoprotegerin dengan Osteoprotegerin ELISA Kit**

(Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim)

Persiapan Piringan:

1. Lapisi setiap sumuran dengan 100 μ l *diluted COATAB (capture antibody)*. Tutup dan diinkubasikan semalam pada suhu ruangan.
2. Aspirasi dan cuci sumuran 5x dengan 250 μ l ELISA *wash buffer*. Diulangi beberapa kali hingga bersih. Pada akhir pencucian hilangkan sisa wash buffer dengan mengaspirasi atau dengan membalik piringan dan dikeringkan dengan kertas hisap.
3. Tambahkan 250 μ l DIL (*reagent diluent*) pada setiap sumuran. Diinkubasikan pada suhu ruangan selama 1 jam.
4. Aspirasi dan cuci sumuran 5x dengan ELISA *wash buffer*. Pada akhir pencucian, hilangkan sisa wash buffer dengan mengaspirasi atau dengan membalik piringan dan dikeringkan dengan kertas hisap. Piringan siap untuk penambahan sampel.

Prosedur Pemeriksaan:

1. Tambahkan 100 μ l sampel dalam *reagent diluent* pada setiap sumuran. Tutup dengan selotip dan inkubasikan 2 jam pada suhu ruangan.
2. Aspirasi dan cuci sumuran 5x dengan ELISA *wash buffer*. Pada akhir pencucian, hilangkan sisa wash buffer dengan mengaspirasi atau dengan membalik piringan dan dikeringkan dengan kertas hisap. Piringan siap untuk penambahan sampel.
3. Tambahkan 100 μ l 2.AB (*detection antibody*), larutkan dalam *reagent diluent*, pada setiap sumuran. Tutup dengan selotip baru dan inkubasikan selama 2 jam pada suhu ruangan.

4. Aspirasi dan cuci sumuran 5x dengan 250 μ l ELISA *wash buffer*. Pada akhir pencucian hilangkan sisa *wash buffer* dengan mengaspirasi atau dengan membalik piringan dan dikeringkan dengan kertas hisap. Piringan siap untuk penambahan sampel.
5. Tambahkan 100 μ l larutan CONJ (*streptavidin-HRP*) pada setiap sumuran. Tutup dan inkubasikan selama 20 menit pada suhu ruangan. Hindarkan piringan dari cahaya langsung.
6. Aspirasi dan cuci sumuran 5x dengan 250 μ l ELISA *wash buffer*. Pada akhir pencucian, hilangkan sisa *wash buffer* dengan mengaspirasi atau dengan membalik piringan dan dikeringkan dengan kertas hisap.
7. Tambahkan 100 μ l SUB (*substrate solution*) pada setiap sumuran. Inkubasikan selama 20 menit pada suhu ruangan. Hindari penempatan piringan pada cahaya langsung.
8. Tambahkan 50 μ l STOP (*stop solution*) pada setiap sumuran. Tepuk perlahan untuk meyakinkan larutan tercampur sempurna.
9. Segera menentukan absorpsi dengan ELISA reader pada 450 nm sampai 620 nm (atau 690 nm) sesuai petunjuk. Bila tidak ada petunjuk panjang gelombang, baca hanya pada 450 nm.

Lampiran 8:**Pemeriksaan ELISA untuk mengukur kadar Osteokalsin dengan Osteocalcin/ Bone gla protein (OT/BGP) ELISA Kit**

(Catalog No. CSB-E05129r)

Prosedur pemeriksaan:

Semua reagen dan sampel dalam suhu ruangan sebelum digunakan.

1. Tambahkan 100 μ l sampel pada setiap sumuran. Tutup dengan selotip. Inkubasikan selama 2 jam pada suhu 37°C.
2. Buang cairan pada tiap sumuran, jangan dicuci.
3. Tambahkan 100 μ l larutan *Biotin-antibody* pada setiap sumuran. Inkubasikan selama 1 jam pada suhu 37°C. Larutan *Biotin-antibody* akan tampak berkabut. Hangatkan pada suhu ruangan dan campur dengan perlahan sampai larutan homogen.
4. Aspirasi setiap sumuran dan cuci, ulangi proses tersebut tiga kali hingga tiga kali pencucian. Cuci dengan mengisi setiap sumuran dengan *wash buffer* (200 μ l). Buang cairan pada setiap tahap dengan sempurna. Pada pencucian akhir, hilangkan sisa *wash buffer* dengan aspirasi. Piringan dibalik dan dikeringkan dengan kertas hisap.
5. Tambahkan 100 μ l larutan *HRP-avidin* pada setiap sumuran. Tutup dengan selotip baru. Inkubasikan selama 1 jam pada 37°C.
6. Ulangi aspirasi dan cuci tiga kali seperti nomor 4.
7. Tambahkan 90 μ l *TMB substrate* pada setiap sumuran. Inkubasikan selama 30 menit pada 37°C. Simpan piringan dalam tempat gelap dan hindarkan dari angin dan perubahan suhu.
8. Tambahkan 50 μ l STOP Solution pada setiap sumuran. Bila perubahan tidak sewarna, tepuk piringan perlahan untuk meyakinkan larutan tercampur sempurna.
9. Segera tentukan densitas optikal pada setiap sumuran dalam 30 menit menggunakan *microplate reader* yang diatur pada 450 nm.

Lampiran 9:**Pemeriksaan ELISA untuk Mengukur Kadar C-Telopeptide dengan Menggunakan Rat Cross-Linked C-Telopeptides Of Type I Collagen (CTX) ELISA Kit (Catalog No. CSB-E08403r):**

Prosedur Pemeriksaan:

Semua reagen dan sampel dalam suhu ruangan sebelum digunakan.

1. Tambahkan 100 μ l sampel pada setiap sumuran. Tutup dengan selotip. Inkubasikan selama 2 jam pada suhu 37°C.
2. Buang cairan pada tiap sumuran, jangan dicuci.
3. Tambahkan 100 μ l larutan *Biotin-antibody* pada setiap sumuran. Inkubasikan selama 1 jam pada suhu 37°C. Larutan *Biotin-antibody* akan tampak berkabut. Hangatkan pada suhu ruangan dan campur dengan perlahan sampai larutan homogen.
4. Aspirasi setiap sumuran dan cuci, ulangi proses tersebut tiga kali hingga tiga kali pencucian. Cuci dengan mengisi setiap sumuran dengan *wash buffer* (200 μ l). Buang cairan pada setiap tahap dengan sempurna. Pada pencucian akhir, hilangkan sisa *wash buffer* dengan aspirasi. Piringan dibalik dan dikeringkan dengan kertas hisap. Tambahkan 100 μ l larutan *HRP-avidin* pada setiap sumuran. Tutup dengan selotip baru. Inkubasikan selama 1 jam pada 37°C.
5. Ulangi aspirasi dan cuci tiga kali seperti nomor 4. Tambahkan 90 μ l *TMB substrate* pada setiap sumuran. Inkubasikan selama 30 menit pada 37°C. Simpan piringan dalam tempat gelap dan hindarkan dari angin dan perubahan suhu.
6. Tambahkan 50 μ l *STOP Solution* pada setiap sumuran. Bila perubahan tidak sewarna, tepuk piringan perlahan untuk meyakinkan larutan tercampur sempurna.
7. Segera tentukan densitas optikal pada setiap sumuran dalam 30 menit menggunakan *microplate reader* yang diatur pada 450 nm.

Lampiran 10:**Komposisi Pakan Standar Rendah Kalsium**

Per 10 kg pelet mengandung:

- Tepung jagung 2,35 kg
- Tepung terigu 3,47 kg
- Tepung kacang hijau 1,43 kg
- Tepung ikan 1,63 kg
- Lemak babi 0,82 kg
- Vitamin B1 0,48 g
- Vitamin B2 1,20 g
- Vitamin B6 0,40 g
- Multivitamin (A, D, B2, E) 40 g

Pembuatan pakan menggunakan komposisi standar tanpa penambahan kalsium dan fosfat.

Lampiran 11:**Pengolahan Data Statistik****a) Uji Normalitas - Kolmogorov Smirnov Test****NPar Tests****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Glukokortikoid	Osteoprotegerin	Osteokalsin	C-Telopeptide	Apoptotiksel	Rasio CT/OC
N		20	20	20	20	20	20
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	6.4610	72.3200	122.6000	3.5965	12.3500	.03905
	Std. Deviation	4.14032	36.35475	55.11495	2.63058	16.00748	.034320
Most Extreme Differences	Absolute	.107	.196	.216	.210	.220	.218
	Positive	.107	.196	.216	.210	.204	.218
	Negative	-.087	-.121	-.125	-.166	-.220	-.142
Kolmogorov-Smirnov Z		.481	.875	.965	.940	.985	.973
Asymp. Sig. (2-tailed)		.975	.428	.310	.340	.287	.300

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Kelompok Perlakuan = Kontrol**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test^c**

		Glukokortikoid	Osteoprotegerin	Osteokalsin	C-Telopeptide	Apoptotiksel	Rasio CT/OC
N		10	10	10	10	10	10
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	3.2890	104.4000	162.2100	1.8250	6.3000	.01249
	Std. Deviation	2.39532	17.62668	52.14206	.51444	7.11883	.004675
Most Extreme Differences	Absolute	.152	.159	.203	.183	.217	.233
	Positive	.152	.159	.203	.104	.217	.132
	Negative	-.111	-.088	-.113	-.183	-.188	-.233
Kolmogorov-Smirnov Z		.480	.504	.642	.579	.686	.736
Asymp. Sig. (2-tailed)		.975	.961	.804	.891	.735	.651

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Kelompok Perlakuan = Kontrol

Kelompok Perlakuan = Perlakuan**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test^c**

		Glukokortikoid	Osteoprotegerin	Osteokalsin	C-Telopeptide	Apoptotik sel	Rasio CT/OC
N		10	10	10	10	10	10
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	9.6330	40.2400	82.9900	5.3680	18.4000	.06561
	Std. Deviation	2.84473	13.87589	14.40412	2.71483	20.22210	.029952
Most Extreme Differences	Absolute	.203	.234	.211	.301	.210	.279
	Positive	.203	.166	.133	.301	.210	.279
	Negative	-.168	-.234	-.211	-.191	-.181	-.169
Kolmogorov-Smirnov Z		.641	.741	.667	.952	.664	.882
Asymp. Sig. (2-tailed)		.806	.643	.765	.325	.770	.417

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Kelompok Perlakuan = Perlakuan

b) Uji t- 2 sampel bebas (Independent t-test):**Group Statistics**

Kelompok Perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Glukokortikoid	Kontrol	10	3.2890	2.39532	.75747
	Perlakuan	10	9.6330	2.84473	.89958
Osteoprotegerin	Kontrol	10	104.4000	17.62668	5.57405
	Perlakuan	10	40.2400	13.87589	4.38794
Osteokalsin	Kontrol	10	162.2100	52.14206	16.48877
	Perlakuan	10	82.9900	14.40412	4.55498
C-Telopeptide	Kontrol	10	1.8250	.51444	.16268
	Perlakuan	10	5.3680	2.71483	.85850
Apoptotik sel	Kontrol	10	6.3000	7.11883	2.25117
	Perlakuan	10	18.4000	20.22210	6.39479
Rasio CT/OC	Kontrol	10	.01249	.004675	.001478
	Perlakuan	10	.06561	.029952	.009472

c) Analisis Regresi Linier Bertahap:

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Glukokortikoid	Equal variances assumed	1.229	.282	-5.395	18	.000	-6.34400	1.17601	-8.81471	-3.87329
	Equal variances not assumed			-5.395	17.493	.000	-6.34400	1.17601	-8.81986	-3.86814
Osteoprotegerin	Equal variances assumed	.358	.557	9.044	18	.000	64.16000	7.09394	49.25618	79.06382
	Equal variances not assumed			9.044	17.060	.000	64.16000	7.09394	49.19706	79.12294
Osteokalsin	Equal variances assumed	5.276	.034	4.631	18	.000	79.22000	17.10635	43.28089	115.15911
	Equal variances not assumed			4.631	10.366	.001	79.22000	17.10635	41.28615	117.15385
C-Telopeptide	Equal variances assumed	3.457	.079	-4.055	18	.001	-3.54300	.87378	-5.37875	-1.70725
	Equal variances not assumed			-4.055	9.646	.002	-3.54300	.87378	-5.49965	-1.58635
Apoptotik sel	Equal variances assumed	4.573	.046	-1.785	18	.091	-12.10000	6.77946	-26.34312	2.14312
	Equal variances not assumed			-1.785	11.197	.101	-12.10000	6.77946	-26.98954	2.78954
Rasio CT/OC	Equal variances assumed	5.290	.034	-5.541	18	.000	-.053121	.009586	-.073261	-.032981
	Equal variances not assumed			-5.541	9.438	.000	-.053121	.009586	-.074654	-.031588

Regression

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Glukokortikoid ^a		. Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: Osteoprotegerin

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.688 ^a	.473	.444	27.10475

a. Predictors: (Constant), Glukokortikoid

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	11887.673	1	11887.673	16.181	.001 ^a
	Residual	13224.019	18	734.668		
	Total	25111.692	19			

a. Predictors: (Constant), Glukokortikoid

b. Dependent Variable: Osteoprotegerin

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	111.354	11.441		9.733	.000
	Glukokortikoid	-6.041	1.502	-.688	-4.023	.001

a. Dependent Variable: Osteoprotegerin

Regression**Variables Entered/Removed^b**

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Glukokortikoid ^a		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: Apoptotik sel

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.212 ^a	.045	-.008	16.07334

a. Predictors: (Constant), Glukokortikoid

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	218.211	1	218.211	.845	.370 ^a
	Residual	4650.339	18	258.352		
	Total	4868.550	19			

a. Predictors: (Constant), Glukokortikoid

b. Dependent Variable: Apoptotik sel

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	7.062	6.785		1.041	.312
	Glukokortikoid	.819	.891	.212	.919	.370

a. Dependent Variable: Apoptotik sel

Regression**Variables Entered/Removed^b**

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Osteoprotegerin ^a		. Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: C-Telopeptide

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.658 ^a	.433	.402	2.03492

a. Predictors: (Constant), Osteoprotegerin

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	56.943	1	56.943	13.751	.002 ^a
	Residual	74.536	18	4.141		
	Total	131.479	19			

a. Predictors: (Constant), Osteoprotegerin

b. Dependent Variable: C-Telopeptide

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	7.040	1.034		6.808	.000
	Osteoprotegerin	-.048	.013	-.658	-3.708	.002

a. Dependent Variable: C-Telopeptide

Regression

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Apoptotik sel ^a		. Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: Osteokalsin

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.294 ^a	.086	.035	54.12993

a. Predictors: (Constant), Apoptotik sel

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	4974.622	1	4974.622	1.698	.209 ^a
	Residual	52740.878	18	2930.049		
	Total	57715.500	19			

a. Predictors: (Constant), Apoptotik sel

b. Dependent Variable: Osteokalsin

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	135.084	15.437		8.751	.000
	Apoptotik sel	-1.011	.776	-.294	-1.303	.209

a. Dependent Variable: Osteokalsin

Regression

Variables Entered/Removed

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Osteokalsin, C-Telopeptide ^a		. Enter

a. All requested variables entered.

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.964 ^a	.929	.920	.009681

a. Predictors: (Constant), Osteokalsin, C-Telopeptide

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.021	2	.010	110.883	.000 ^a
	Residual	.002	17	.000		
	Total	.022	19			

a. Predictors: (Constant), Osteokalsin, C-Telopeptide

b. Dependent Variable: Rasio CT/OC

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	.017	.009		2.036	.058
	C-Telopeptide	.011	.001	.825	10.811	.000
	Osteokalsin	.000	.000	-.225	-2.944	.009

a. Dependent Variable: Rasio CT/OC

Regression

Variables Entered/Removed

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Apoptotik sel, Glukokortikoid ^a		. Enter

a. All requested variables entered.

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.558 ^a	.312	.231	48.34389

a. Predictors: (Constant), Apoptotik sel, Glukokortikoid

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	17984.255	2	8992.127	3.848	.042 ^a
	Residual	39731.245	17	2337.132		
	Total	57715.500	19			

a. Predictors: (Constant), Apoptotik sel, Glukokortikoid

b. Dependent Variable: Osteokalsin

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	172.492	21.011		8.210	.000
	Glukokortikoid	-6.467	2.741	-.486	-2.359	.031
	Apoptotik sel	-.657	.709	-.191	-.926	.367

a. Dependent Variable: Osteokalsin

d) Analisis Regresi Kategorikal – Perlakuan Latihan Fisik Intensitas Tinggi terhadap Kadar Glukokortikoid

CATREG - Regression for Categorical Data

Credit

Catreg
Version 3.0
by
Data Theory Scaling System Group (DTSS)
Faculty of Social and Behavioral Sciences
Leiden University, The Netherlands

Case Processing Summary

Valid Active Cases	20
Active Cases with Missing Values	0
Supplementary Cases	0
Total	20
Cases Used in Analysis	20

Model Summary

	Multiple R	R Square	Adjusted R Square	Apparent Prediction Error
Standardized Data	.793	.628	.608	.372

Dependent Variable: Glukokortikoid
 Predictor: Kelompok Perlakuan

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	12.565	1	12.565	30.420	.000
Residual	7.435	18	.413		
Total	20.000	19			

Dependent Variable: Glukokortikoid
 Predictor: Kelompok Perlakuan

Coefficients

	Standardized Coefficients		df	F	Sig.
	Beta	Bootstrap (1000) Estimate of Std. Error			
Kelompok Perlakuan	.793	.076	1	109.936	.000

Dependent Variable: Glukokortikoid

Correlations and Tolerance

	Correlations			Importance	Tolerance	
	Zero-Order	Partial	Part		After Transformation	Before Transformation
Kelompok Perlakuan	.793	.793	.793	1.000	1.000	1.000

Dependent Variable: Glukokortikoid

Regression**Variables Entered/Removed**

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Apoptotik sel, Glukokortikoid ^a		Enter

a. All requested variables entered.

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.558 ^a	.312	.231	48.34389

a. Predictors: (Constant), Apoptotik sel, Glukokortikoid

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	17984.255	2	8992.127	3.848	.042 ^a
	Residual	39731.245	17	2337.132		
	Total	57715.500	19			

a. Predictors: (Constant), Apoptotik sel, Glukokortikoid

b. Dependent Variable: Osteokalsin

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	172.492	21.011		8.210	.000
	Glukokortikoid	-6.467	2.741	-.486	-2.359	.031
	Apoptotik sel	-.657	.709	-.191	-.926	.367

a. Dependent Variable: Osteokalsin