

The Effect of Sipatah-Patah (*Cissus quadrangularis Salisb*) Extract on Mandible Density of Ovariectomized Rats (*Rattus norvegicus*)

Indah Maghfirah¹, Muhammad Jalaluddin², Dian Masyitha³, Mustafa Sabri², Fadli A Gani², Herrialfian⁴

¹Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

³Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁴Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

Email : indahmaghfirah02@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this research was to identify the effect of sipatah-patah (*Cissus quadrangularis Salisb*) leaf extract on mandible density of ovariectomized rats (*Rattus norvegicus*). The samples were 12 female rats which were divided into 4 treatment groups with 3 replications. K0 consisted of ovariectomized rats without *Cissus quadrangularis Salisb* extract, whereas K1, K2 and K3 consisted of ovariectomized rats and were given Sipatah-patah extract with 500mg/kg body weight, 700mg/kg body weight and 900mg/kg body weight for 30 days. On 31st day, rats were euthanized with chloroform and mandible bones were collected for histological preparation. Parameters observed were bone structures (osteosit, osteoblast, osteoclast and trabekula). The results showed that in K0 group, bone density was decreased and became thinner, osteoclast cells were found on trabekula, and low density of active and passive osteoblast were also detected. The treatment group (K1 and K2) showed an improvement structure of trabekula, where the amount of osteoclast were lower than K0, as well as the amount of active osteoblast, although a lot of passive osteoblast were still found. The treatment group (K3) showed an improvement as the most dense trabekula structure with large amount of active osteoblast cell density without the existence of osteoclast compared to other groups. In this research, it would be concluded that the adding sipatah-patah extract with a dose of 900 mg/kg body weight showed a higher number of active osteoblasts and trabekula density compared to the control groups, K1, and K2 on ovariectomized mandible bone rats.

Keywords : Sipatah-patah (*Cissus quadrangularis Salisb*), osteoporosis, ovariectomy, Mandible Bones, osteosit, osteoblast, osteoclast and trabekula

PENDAHULUAN

Osteoporosis adalah penyakit yang ditandai dengan berkurangnya kepadatan massa tulang dan kerusakan mikro struktur jaringan tulang yang mengakibatkan tulang rapuh dan mudah patah. Osteoporosis terjadi pada saat absorpsi tulang melebihi kecepatan pembentukan tulang (Corwin dan Elizabet, 2001). Penyakit ini merupakan gangguan metabolisme tulang yang ditandai dengan pengurangan massa tulang, pengurangan densitas tulang dan fragilitas tulang yang meningkat, sehingga resiko fraktur menjadi lebih besar (Arjmandi, 1996).

Krane (1974) menyebutkan osteoporosis pertama-tama menyerang tulang aksial, baru kemudian tulang ekstremitas. Keadaan ini

karena tulang aksial merupakan tulang yang kurang mendapat latihan fisik. Oleh karena itu untuk menghindarkan kerapuhan tulang sangat penting untuk memperhatikan kualitas tulang aksial terutama tulang mandibula.

Pengeroposan tulang dapat dihindari dengan cara memberikan asupan kalsium, vitamin D dan fosfor. Kalsium dan fosfor merupakan mineral yang paling penting pada saat proses metabolisme tulang. Menurut Sabri (2011) bahwa 85% fosfor terdapat dalam tulang. Almatsier (2004) mengatakan bahwa fosfor merupakan mineral kedua terbanyak di dalam tubuh, yaitu 1% dari berat badan. Fosfor di dalam tulang berada dalam perbandingan 1:2 dengan kalsium. Selain itu fosfor terdapat di

dalam semua sel tubuh, setengahnya di dalam otot dan di dalam cairan ekstraselular. Kalsium dan fosfor membentuk kalsium fosfat atau disebut dengan kristal kalsium hidroksiapatit $[3Ca_3(PO_4)_2Ca(OH)_2]$ sebagai penyusun utama pembentuk tulang (Sabri, 2011).

Beberapa faktor yang mempengaruhi penurunan kepadatan tulang diantaranya adalah umur, ras, berat badan, kurangnya paparan sinar matahari dan asupan kalsium, gaya hidup yang tidak sehat seperti merokok, mrngkonsumsi alkohol, kurangnya latihan fisik serta penggunaan obat kortiko steroid dalam jangka waktu panjang (Sabri, 2013).

Penelitian ini sangat penting dilakukan untuk mengetahui bagaimana pengaruh pemberian ekstrak sipatah-patah terhadap kepadatan tulang mandibula tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina ovariektomi. Pemberian ekstrak sipatah-patah (*Cissus quadrangula* Salisb) diharapkan dapat mengurangi tingkat osteoporosis pada tulang. Tingkat kepadatan tulang dapat diketahui dari gambaran histologi tulang.

MATERI DAN METODE

Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan adalah timbangan digital, *vacuum rotary evaporator*, erlenmeyer 100 ml, spuit 3 cc, sonde lambung, wadah stok, kertas saring, *scalpel*, gunting, jarum, benang *cat gut*, *needle holder*, klem arteri, tampon, cover glass, *object glass*, *microtome rotary*, botol spesimen dan waterbath. Selanjutnya untuk pengamatan hasil penelitian digunakan mikroskop cahaya, dan untuk pemotretan digunakan alat mikrofotografi.

Bahan yang digunakan dalam perlakuan adalah ekstrak sipatah-patah. Bahan-bahan yang digunakan untuk membuat preparat histologi adalah larutan *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10%, akuades, silol,

alkohol dengan konsentrasi bertingkat (70%, 80%, 90%, 95% dan absolut), NaCl fisiologis 0,95%, parafin (Merck®), pewarna hematoksin eosin (HE) dan Entellan®.

Prosedur Penelitian

Pembuatan ekstrak Sipatah-patah

Pembuatan ekstrak sipatah-patah (ESP) dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Unsyiah. Batang *Cissus quasrangularis* Salisb (sipatah-patah) di ambil dari Desa Neuhen, Kecamatan Mesjid Raya, Kabupaten Aceh Besar, Provinsi Aceh. Bagian tanaman sipatah-patah yang diambil adalah batang yang kemudian dipotong-potong sepanjang sekitar 1 cm, lalu diangin-anginkan sehingga menjadi kering. Dalam penelitian ini diperlukan 3 kg batang tanaman sipatah-patah yang sudah kering. Selanjutnya tanaman dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 60°C selama 48 jam. Setelah kering, batang sipatah-patah kemudian dihaluskan dengan penggilingan sehingga menjadi serbuk. Serbuk ini kemudian dimaserasi dengan menggunakan etanol 96%. Ekstrak cair sipatah-patah tersebut selanjutnya dikentalkan dengan rotavapor (Hahnvapor HS-2005S® Korea) sehingga mendapatkan ekstrak sipatah-patah yang kental.

Persiapan hewan coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah 12 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina umur 5 bulan dari galur Sprague Dawleys dengan bobot badan 250 g, terdiri dari 4 kelompok perlakuan dengan 3 ulangan. Seluruh tikus dalam kelompok dilakukan ovariektomi.

Ovariektomi dilakukan melalui sayatan kulit daerah abdomen. Anastesi dilakukan dengan menggunakan Ketamin dosis 50-150 mg/kg BB secara intramuskular. Selanjutnya rambut di area bedah dicukur pada sisi lateral tubuh tikus, pada daerah insisi

dilakukan desinfeksi dengan alkohol 70% dan *iodin tincture*. Sayatan dilakukan pada area bedah yaitu 2 cm mengikuti tulang belakang dan berjarak 1,5 cm dari tulang belakang, dicari ovarium kemudian ikat dengan benang *cat gut*. Ovarium yang telah diikat dilakukan pemotongan kemudian disisihkan. Langkah selanjutnya menjahit otot dengan *cat gut* kromik dengan tipe jahitan sederhana terputus (*simple interrupted*) dan menjahit kulit dengan benang *silk* dengan tipe jahitan sederhana terputus. Untuk pemulihan luka pada tikus dibutuhkan waktu selama 10 hari.

Perlakuan pemberian ekstrak Sipatah-patah (*Cissus quadrangularis* Salisb)

Ekstrak sipatah-patah (ESP) diberikan dengan dosis 0 (K0/kontrol), 500 mg/Kg BB (K1), 700 mg/Kg BB (K2), dan 900 mg/Kg BB (K3) selama 30 hari. Pemberian ekstrak dilakukan peroral dengan volume pemberian masing-masing 1 ml.

Pembuatan preparat histologis tulang mandibula

Pada akhir masa perlakuan semua tikus dieuthanasia dengan menggunakan klorofom, kemudian dilakukan pembedahan dan diambil tulang mandibula. Tahapan pembuatan preparat histologi meliputi proses fiksasi, dekalsifikasi, dehidrasi, *clearing*, infiltrasi, *embedding*, dan *sectioning*. Untuk membuat preparat histologi, tulang mandibula difiksasi dengan larutan BNF selama 2x24 jam. Kemudian dilakukan proses dekalsifikasi menggunakan asam nitrat 5% dan dalam alkohol 70% selama 12 jam, lalu dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat 80%, 90%, 95%, dan alkohol absolut masing-masing selama 2 jam. Jaringan kemudian dijernihkan dalam cairan xylol I (selama 1 jam), xylol II (selama 45 menit), dan xylol III (selama 45 menit). Selanjutnya jaringan diinfiltrasi dalam

parafin cair I (selama 1 jam), parafin cair II (selama 45 menit), dan parafin cair III (selama 45 menit), kemudian dilakukan proses *embedding* dalam parafin blok. Jaringan di dalam blok parafin disayat dengan ketebalan 5 mikron dan irisan diletakkan pada object glass untuk selanjutnya diinkubasikan untuk pembuangan parafin kemudian diwarnai dengan pewarnaan HE dan diberi perekat Entellan (Kiernan, 1990). Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya Olympus dilanjutkan dengan pembuatan foto mikrograf.

Proses pewarnaan hemaktosilin-eosin (HE)

Pewarnaan hemaktosilin-eosin mengacu pada metode Kiernan (1990). Proses pewarnaan HE dimulai dengan deparafinisasi yang bertujuan untuk menghilangkan parafin yang terdapat di dalam jaringan. Preparat dimasukkan ke dalam larutan xilol I dan II selama 2 menit. Selanjutnya dilakukan proses rehidrasi dengan cara preparat (sediaan) dimasukkan ke dalam larutan alkohol konsentrasi menurun masing-masing selama 2 menit dan dicuci dengan akuades selama 2 menit, kemudian preparat diwarnai dengan hemaktosilin selama 3 menit sambil dikontrol dibawah mikroskop. Setelah diberi zat warna, preparat dicuci dengan air mengalir (air kran) selama 1 menit dan dicuci dengan alkohol asam sebanyak 3 kali celup. Selanjutnya preparat diwarnai dengan eosin selama 2 menit. Lalu preparat didehidrasi dengan cara dimasukkan ke dalam larutan alkohol bertingkat dimulai 70%, 80%, 90% dan 95% selama beberapa kali celup (± 15 detik) serta dilanjutkan dengan proses *clearing* (penjernihan) dengan silol I, II masing-masing selama 5 menit, silol berfungsi untuk menjernihkan jaringan yang sudah terpulas. Selanjutnya preparat ditutup dengan gelas objek dengan

menggunakan Entellan®. Preparat hasil pewarnaan diamati dengan mikroskop dengan perbesaran 4 kali, 10 kali, dan 40 kali untuk mengukur tingkat kepadatan pada tulang tikus.

Parameter Penelitian

Parameter yang diamati yaitu struktur tulang (osteosit, osteoblas, osteoklas dan trabekula).

Analisis Data

Data hasil penelitian pengaruh pemberian ekstrak sipatah-patah (*Cissus quadrangularis* Salisb) terhadap kepadatan tulang mandibula tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariectomi akan dianalisa secara deskriptif.

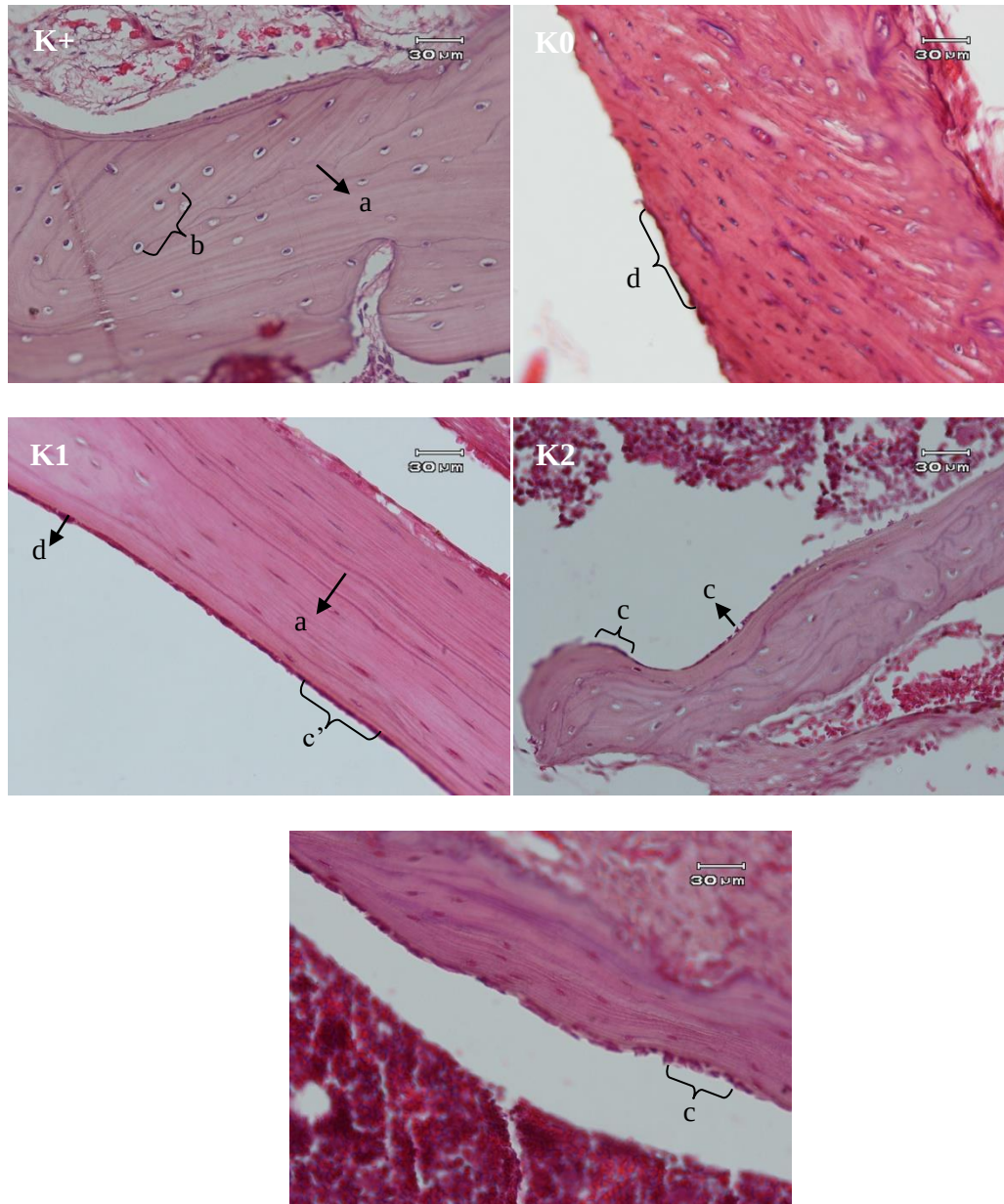
HASIL DAN PEMBAHASAN

Tulang mandibula termasuk skeleton aksiale terdapat pada fasialis kranium pada ventrolateral. Dibandingkan tulang ekstremitas, pada tulang ini kurang mendapat latihan fisik (Suleiman dkk., 1997). Berdasarkan hasil yang telah diuji, setelah diberikan perlakuan selama 30 hari terlihat perbedaan pada tulang mandibula kelompok kontrol ovariectomi (K0) dan kelompok perlakuan (K1, K2 dan K3). Pada kelompok K0 terjadinya penurunan densitas

tulang dibandingkan tikus normal dan tikus kelompok perlakuan (K1, K2 dan K3). Pada K0 terlihat rongga sumsum tulang meluas dipenuhi dengan eritrosit dan trabekula terlihat menipis (Gambar 1).

Menurut Eklou-Kalonji dkk. (1999) bahwa tikus putih yang dilakukan ovariectomi merupakan hewan model paling cocok untuk penelitian osteoporosis. Karena pada tikus tersebut memiliki ciri-ciri klinik yaitu hilangnya massa tulang kanselus dan peningkatan angka pergantian tulang seperti kondisi alami yang terjadi pada wanita pasca menopause. Ovariectomi dikondisikan agar menyerupai wanita pasca menopause, karena pada saat menopause terjadi penurunan estrogen yang dihasilkan ovarium. Penurunan estrogen akan menyebabkan resorpsi tulang meningkat (Mahaputra, 2002).

Hasil penelitian Sumiyati dan Sunaryo (1998) osteoporosis terutama terjadi pada tulang atau bagian tulang yang sebagian besar tersusun dari jaringan kanselus, seperti korpus vertebralis, tulang pipih pada tengkorak, skapula, ilium dan trabekula metafisis tulang panjang. Pada tulang-tulang itu terjadi penyerapan trabekula maka spikulum trabekula menjadi lebih tipis dan jumlahnya berkurang. Gambaran densitas trabekula, osteosit, osteoblas dan osteoklas dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Gambaran densitas trabekula, osteosit, osteoblast dan osteoklas. Pewarnaan HE pembesaran 40x10 skala bar 30µm. Inset: memperlihatkan trabekula (a), sel osteosit (b), osteoblas aktif (c), sel osteoblas pasif (c') dan osteoklas (d).

Masyitha (2003) menyatakan gambaran osteoporosis lebih jelas terlihat pada tulang mandibula, dikarenakan tulang mandibula kurang mendapat latihan fisik dibandingkan tulang ekstremitas. Osteoporosis mencakup dua mekanisme perubahan mikroanatomi trabekula, yaitu proses penipisan dan erosi tulang trabekula. Kedua proses tersebut

bergantung pada perubahan yang mendasari proses remodeling (Eriksen dkk., 1994).

Berdasarkan pernyataan (Jubb dkk., 1991) osteoporosis yang terjadi akibat meningkatnya penyerapan tulang yaitu dengan menurunnya jumlah trabekula, sementara yang terjadi akibat menurunnya pembentukan tulang, jumlah trabekula tetap

normal akan tetapi trabekula yang terbentuk lebih tipis. Arjmandi, dkk (1996) membuktikan bahwa ovariectomi kedua ovarium pada tikus percobaan akan menginduksi osteoporosis pada trabekula tulang rahang karena ovariectomi akan menstimulasi kerja osteoklas.

Gambaran histopatologis menunjukkan adanya perbedaan struktur trabekula tulang mandibula dari setiap perlakuan. Pada kelompok kontrol ovariectomi (K0) ditandai dengan penipisan trabekula. Struktur trabekula melebar sehingga terbentuk rongga, sumsum tulang dipenuhi oleh eritrosit dan berkurangnya jumlah osteosit. Kelompok perlakuan (K1 dan K2) mulai terlihat perbaikannya struktur trabekula dibandingkan K0, ditandai dengan rongga yang melebar dan dipenuhi eritrosit sudah terlihat padat. Sedangkan pada kelompok perlakuan (K3) terlihat perbaikan struktur trabekula yang lebih padat. Meningkatnya osteoblas aktif, osteosit dan penurunan osteoklas dibandingkan dengan K0, K1 dan K2. Osteoblas aktif berbentuk kuboid sedangkan osteoblas pasif berbentuk pipih (gambar 1). Kierszenbaum (2002) osteoblas aktif merupakan sel yang berbentuk kubus atau kolumnar sedangkan dalam keadaan tidak aktif berbentuk pipih.

Densitas osteoblas aktif yang lebih tinggi disebabkan karena adanya proses modeling dan remodeling yang masih berjalan akibat pengaruh fitoestrogen dalam ekstrak sipatapatih yang berpengaruh pada aktifitas osteoblas dan osteoklas. Adanya osteoblas aktif menandakan tulang dalam kondisi bekerja sedangkan adanya osteoblas pasif menunjukkan tulang dalam kondisi istirahat dalam pembentukan tulang (Sabri, 2011). Penentuan dasar proses remodeling tulang berupa penipisan tulang trabekula menuju pada perubahan arsitektur tulang dan erosi tulang sehingga kehilangan tulang trabekula dapat secara keseluruhan atau proporsional (Kalu dkk, 1993).

Hormon paratiroid (PTH) adalah hormon utama yang bertanggung jawab memelihara konsentrasi kalsium setiap saat. Pengaruh biologis yang sangat penting dari PTH meliputi: 1). meningkatkan kalsium plasma yang bersamaan dengan penurunan fosfat plasma, 2). Meningkatkan ekskresi fosfat urin (fosfaturia), 3). meningkatkan resorpsi kalsium urin, 4). meningkatkan kecepatan remodeling tulang, 5). meningkatkan osteolisis osteosit, 6). membantu pembentukan 1,25-dihidroksi vitamin D₃ dengan memengaruhi sistem 1-hidrolase, dan 7). meningkatkan absorpsi kalsium dan fosfat dari usus halus oleh pengaruh langsung pada pembentukan 1,25-dihidroksikolekalsiferol (Banks, 1993).

Kalsium sangat berperan dalam berbagai proses biologik seperti koagulasi darah, aktivitas enzim, kontraksi otot, eksitabilitas saraf, pembebasan hormon, permeabilitas membran, dan sebagai unsur esensial struktur tulang (Nieves, 2005). Aktivitas tersebut di atas dapat berlangsung normal apabila kadar kalsium dalam darah berada dalam kisaran normal (Winarno, 1998). Untuk mempertahankan dalam keadaan normal kalsium dipengaruhi oleh PTH, vitamin D, dan kalsitonin (Zhang dkk, 2006).

Osteoklastogenesis yang terjadi karena defisiensi estrogen. Sehingga menyebabkan terjadinya peningkatan sekresi sitokin seperti; Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) dan Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α), sitokin tersebut berfungsi dalam penyerapan tulang (Masyitha, 2006). Sekresi sitokin yang meningkat dapat dihambat oleh estrogen apabila kadar estrogen rendah maka aktifitas osteoblas akan dihambat dan akan mengakibatkan peningkatan jumlah osteoklas (Rachman, 2006).

Resorpsi tulang akan terjadi pada saat sitokin diaktivasi oleh osteoblas. Apabila estrogen meningkat akan menghambat osteoklastogenesis dan sitokin tidak

melakukan aktifitas penyerapan tulang yang berlebihan. Menurut Oursler (2003) estrogen juga merangsang ekspresi dari osteoprotegerin (OPG) dan transforming growth factor- β (TGF- β) oleh sel osteoblas dan sel stroma, sehingga estrogen berfungsi menghambat penyerapan tulang dengan cara mempercepat atau merangsang apoptosis sel osteoklas.

Shirwaikar dkk (2003) mengatakan, efek fitoestrogen dari kandungan sipatah-patah terhadap tulang diketahui sebagai antiosteoporosis. Fitoestrogen ini mempunyai kesamaan struktur kimia dan aktivitas yang sama dengan hormon estrogen (Dewell dkk, 2002). Karena kesamaan struktur kimianya maka fitoestrogen mempunyai kemampuan untuk berikatan dengan reseptor estrogen pada osteoblas dan dapat menggantikan fungsi estrogen di dalam perbaikan tulang pada wanita yang mengalami osteoporosis (Turner dkk, 2007).

Dengan demikian kandungan yang terdapat pada *Cissus quadrangularis* Salisb dan beberapa biomolekul yang terkandung dalam ESP diduga berpengaruh mengatasi osteoporosis. Kehilangan atau defisiensi kalsium, fosfat, dan estrogen juga dapat diatasi dengan pemberian ESP. ESP diharapkan dapat digunakan sebagai terapi pada saat kondisi osteoporosis. Sesuai dengan pernyataan Thuong dkk (2005), Jainu dan Devi (2006) kandungan fitoestrogen ESP diduga dapat menekan produksi sitokin (IL-1, IL-6, dan TNF- α) dan terjadi pembentukan massa tulang kembali setelah ovariectomi.

Tikus perlakuan (K3) dengan dosis 900mg/kg/BB berdasarkan hasil yang diteliti menunjukkan densitas tulang yang lebih padat dibandingkan dengan kelompok tikus lainnya, tetapi dosis tersebut belum tepat dikatakan sebagai dosis maksimal yang baik sebagai dosis terapi. Karena belum dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis letal, dan efek samping dari dosis

tersebut seperti pada ginjal maupun efek samping terhadap yang lainnya.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol sipatah-patah dosis 900 mg/Kg BB menunjukkan peningkatan densitas trabekula, jumlah osteoblas aktif yang lebih tinggi, serta jumlah osteoklas yang sangat rendah dibandingkan dengan kelompok lain. Dengan demikian ekstrak etanol daun sipatah-patah ini sangat potensial sebagai salah satu tanaman herbal untuk mengatasi gangguan osteoporosis.

DAFTAR PUSTAKA

- Almatsier, 2004. **Prinsip Dasar Ilmu Gizi** Jakarta, Gramedia Pustaka Utama.
- Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P and Kukreja SC. 1996. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. **J. Nutr.** 126:161-167.
- Arjmandi, BH. 1996. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. **J. Nutr.** 126(1):161-167.
- Banks, WJ. 1993. **Applied Veterinary Histology**. 3rd Ed : Mosby Year Book. Toronto.
- Corwin dan Elizabet. 2001. **Buku Saku Patofisiologi**. EGC, Jakarta.
- Dewell, A., B.H. Clarie, and B. Bonnie. 2002. The effect of soy-derived phytoestrogens on serum lipids and lipoprotein in moderately hypercholesterolemic postmenopausal women. **J. Clin. Endocrin. Metab.** 87(1):118-121.
- Eklou-Kalonji, E., E. Zerath, C. Colin, C. Lacroix, X. Holy, I. Denis and Pointillart. 1999. Calcium regulating hormones, bone mineral content, breaking load and trabecular remodeling are altered in growing pigs fed calcium-deficient diets. **J. Nutr.** 129: 188-193.
- Eriksen, EF., Axelrod DW, and Melsen F. 1994. **Bone Histomorphometry**. Raven press, New York.
- Jainu, J.M. dan Devi, C.S.S. 2006. Gastroprotective effect of *Cissus quadrangularis* extract in rats with experimentally induced ulcer. **Indian J. Med. Res.** 123:799-806.
- Jubb, K.V.F., P. C. Kennedy, and N. Palmer. 1991. **Pathology of Domestic Animal**. 3rd ed: Academic Press, Inc. San Diego.
- Kalu, DN, Elena S, Chung-Ching L, Fabrizio F, Arjmandi BH, Mohammed, A and Salih. 1993. Ovariectomy-induced bone loss and the

- hematopoetic system. **Bone and Mineral**. 23:145-161.
- Kiernan, J.A. 1990. **Histological and Histochemical Method: Theory and Practice**. 2nd ed. Pergamon Press, New York.
- Kierszenbaum, A.L. 2002. **Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology** Inc. An Affiliate of Elsevier. . Mosby. St. Louis.
- Krane, S.M. 1974. **Metabolic Bone Disease: Principle of Internal Medicine**. Edisi 7. JMC Press Inc. Quezon City, Filipina.
- Mahaputra, L. 2002. Reseptor estrogen pada mencit menopause dan masih bersiklus reproduksi. **J. Biosains**. 4:65-68.
- Masyitha, D. 2003. Struktur mikroskopik tulang ischium pada tikus ovariektomi dan pemberian pakan rasio fosfat/kalsium tinggi. **Media Kedokteran Hewan**. 19(1): 21-24.
- Masyitha, D. 2006. Struktur mikroskopik tulang mandibula pada tikus ovariektomi dan pemberian pakan rasio fosfat/kalsium tinggi. **Media Kedokteran Hewan**. 22(2):112-7.
- Nieves. 2005. Osteoporosis: the role of micronutrients. **J. Am. Clin. Nutr.** 81:1232S-1239S.
- Oursler, M.J. 2003. Direct and indirect effects of estrogen on osteoclast. **J. Musculoskel Neuron Interact**. 3(4):363-6.
- Rachman, I.A. 2006, **Osteoporosis primer (Post menopause osteoporosis)**. In: **Osteoporosis**. (Editor: Suherman SK, Tobing S Dohar AL). Edisi I. Perhimpunan osteoporosis Indonesia. Indomedika:1-6.
- Sabri, M. 2011. Aktivitas Ekstrak Etanol Batang Sipatah-patah (*Cissus quadrangula Salisb*) Sebagai Antiosteoporosis Pada Tikus (*Rattus norvegicus*). **Disertasi**. Sekolah Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Sabri, M. 2013. Administration's effects of ethanol extract of *Cissus quadrangularis* Salisb on growth of lumbal bone ovariectomized rats. **Jurnal Natural**. 12(2):48-49.
- Shirwaikar, A.N. S. Khan, and S. Malini. 2003. Antiosteoporotic effect of ethanol extract of *Cissus quadrangularis* Linn. on ovariectomized rat. **J. Ethnopharmacol**. 89:245-250.
- Suleiman, S., M. Nelson, F. Li, M. Thomas, B and C. Moniz. 1997. Effect of calcium intake and physical activity level on bone mass and turnover in healthy, white, postmenopausal women. **J. Am. Clin. Nutr.** 66:937 -43.
- Sumiyati dan Sunaryo. 1998. Penanggulangan Osteoporosis Imbas Panhisteroovariektomi dan Diet Rasio Kalsium/Fosfat Tinggi dengan Rebon pada Tikus. **Penelitian DPP Mandiri UGM**: 13-22.
- Thuong, P.T. W. Jin, J. Lee, R. Seong, Y.M. Lee, Y. Seong, K. Song, K. Bae. 2005. Inhibitory effect on TNF-alpha-induced IL-8 production in the HT29 cell of constituents from the leaf and stem of *Weigela subsessilis*, **Arch. Pharm. Res**. 28:1135-1141
- Turner, J.V, Agatonovic-Kustrin S, Glass BD. 2007. Molecular aspects of phytoestrogen selective binding at estrogen reseptor. **J. Pharm. Sci**. 96(8):1879-1885.
- Winarno B. 1998. Densitas mineral tulang wanita menyusui. **Tesis**. Program Pendidikan Dokter Spesialis. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Zhang, Y. Ping, W. Leung, P.C. Wu. C.F. Yao, X.S and Wong, M.S. 2006. Effects of fructus *Ligustri lucidi* extract on bone turnover and calcium balance in ovariectomized rats. **Biol. Pharm. Bull**. 29(2):291-296.