

Ekspresi Extracellular Signal Regulated Kinase (ERK1/2), Reseptor Estrogen (ER) α , dan Insulin Like Growth Factor I (IGF-IR) pada Osteoblas dalam Memengaruhi Kepadatan Tulang Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Betina Usia Muda Pasca-Latihan Fisik

(Extracellular Signal Regulated Kinase (ERK1/2), Reseptor Estrogen (ER) α , and Insuline Like Growth Factor I (IGF-IR) Expressions on Osteoblast in Influencing Bone Density in the Female Young Rat (*Rattus Norvegicus*) after Exercise Training)

Nurul Mahmudati*, Martin Setiabudi**, Indri Safitri Mukono**, I.B. Tjakra Wibawa Manuaba***

ABSTRACT

*It is known that exercise training can increase bone density both for male and female on human and animals. The fact shows that increase bone density mechanism by exercise training up to know is not yet clear. Exercise training in the young is very important because one of the main cause factors of osteoporosis is peak reach of bone density that is not optimal in the young. It can cause bone strength decreasing. This research was aimed to know the effect of exercise training on moderate intensity on ER α , ERK1/2, and IGF-IR expression and it's role in influencing bone density. This research was The Randomized Posttest only Control Group Design. The experimental unit in this research was white rat strain wistar, female in the age of 4 moths, and total number were fourteen. Independent variables of this research was exercise training on moderate intensity, and dependent variables were ER α , ERK1/2, and IGF-IR expression and bone density. ER α , ERK1/2, and IGF-IR expression was measured by using immunoblotting methode, while bone density was measured by using ultra-sound DBM 1200. The data analysis used was MANOVA and Pearson correlations. **Base on MANOVA analysis showed that there were increasing of ER α , ERK1/2, and IGF-IR expression and bone density together on exercise training ($p = 0.00 < \alpha = 0.05$). Based on Pearson correlation analysis showed that increasing ER α , ERK1/2, and IGF-IR give contribution in increasing bone density $r = 0.692$ for ER α , $r = 0.711$ for ERK1/2, and $r = 0.608$ for IGF-IR ($\alpha = 0.05$). Futhermore a strong correlation was found between ER α and IGF-IR $r = 0.965$ and EKR1/2 $r = 0.985$ also between IGF-IR and ERK1/2 $r = 0.914$ ($\alpha = 0.05$). **There fore this study concluded that exercise training be able to increase bone density through ERK1/2-ER α -IGF-IR pathway.*****

Key words: exercise training, ER α , ERK1/2 and IGF-IR expression, bone density

PENDAHULUAN

Latar Belakang Penelitian

Latihan fisik diketahui dapat meningkatkan kepadatan tulang baik pada laki-laki maupun pada wanita (Kemmler *et al.*, 2002; Yamasaki *et al.*, 2004), akan tetapi mekanisme

peningkatan kepadatan tulang akibat latihan fisik belum jelas.

Latihan fisik diusia muda sangat penting, mengingat salah satu faktor utama penyebab osteoporosis adalah pencapaian puncak kepadatan tulang yang tidak maksimal (Kenny & Prestwooe, 2000; Riggs, 2002;

* Fakultas Keguruan & Ilmu Pendidikan Universitas Muhammadiyah Malang

** Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

*** Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

Downey & Siegel, 2006). Pencapaian puncak kepadatan tulang yang tidak maksimal akan menyebabkan penurunan kekuatan tulang yang lebih cepat (Baylink *et al.*, 1999; Riggs, 2002), sedang puncak kepadatan tulang akan dicapai secara maksimal apabila ada stimulasi mekanik terhadap tulang (Robling *et al.*, 2006). Berdasarkan hal tersebut di atas, mengetahui kejelasan mekanisme peran latihan fisik terhadap peningkatan kepadatan tulang diusia muda menjadi hal yang penting.

Osteoporosis merupakan penyakit utama di negara Amerika, di mana saat ini 10 juta orang menderita osteoporosis dan 34 juta orang menderita osteopenia (National Institutes of Health, 2005). Berdasarkan data dari Departemen Kesehatan tahun 2006 diketahui bahwa Indonesia pada saat ini, satu dari tiga wanita dan satu dari lima pria punya kecenderungan menderita osteoporosis pada usia 45 tahun. Angka tersebut menunjukkan bahwa prevalensi osteoporosis di Indonesia sudah lebih tinggi dari Belanda dan angka ini juga lebih tinggi dari prevalensi dunia, sehingga osteoporosis di Indonesia sudah pada taraf perlu diwaspadai (Supari, 2007).

Metabolisme tulang melibatkan banyak faktor, namun demikian estrogen merupakan salah satu faktor yang cukup potensial terhadap pengaturan kepadatan tulang pada perempuan dan laki-laki (Monologas *et al.*, 2002; Khosla *et al.*, 2002; Gennari *et al.*, 2004). Aksi biologi estrogen dalam mempengaruhi tulang melalui reseptor estrogen α (ER α) (Riggs, 2002), terutama melalui ER α yang berada di inti sel (Farhan *et al.*, 2007). Aksi biologi estrogen yang melibatkan aktivitas reseptor di inti sel dikenal sebagai jalur klasik. Mekanisme secara klasik yang merupakan jalur utama memerlukan ikatan antara hormon dan reseptor dengan DNA spesifik pada daerah promoter dari target gen yang dikenal sebagai *estrogen response element (ERE)* yang kemudian akan memodulasi proses transkripsi gen dan sintesis protein. Aksi ini juga dikenal sebagai aksi genomik (*genomic action*) (Nilsson *et al.*, 2001; Losel *et al.*, 2003). Akhir-akhir ini diketahui ada jalur lain yang tidak memerlukan ikatan dengan ERE dan jalur ini kemudian dikenal sebagai aksi non genomik (*non genomic action*) (Kousteni *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2006). Aksi non genomik tersebut melalui aktivasi protein kinase yaitu *extracellular signal regulated kinase (ERK)* dalam hal ini adalah ERK1/2 (Pedram *et al.*, 2002; Razandi *et al.*, 2003; Kousteni *et al.*, 2003; Rai *et al.*, 2005).

Faktor lain yang juga cukup penting dalam metabolisme tulang adalah stimulasi mekanik (*mechanical stimulation*).

Berdasarkan beberapa hasil penelitian diketahui bahwa bahwa pada kultur sel osteoblas, stimulasi mekanik dapat meningkatkan proliferasi sel melalui aktivasi terhadap ER α (Cheng *et al.*, 2002). Pemberian stimulasi mekanik pada berbagai tipe sel termasuk osteoblas dapat mengaktivasi ERK1/2 (Ingram *et al.*, 2000; Fanning *et al.*, 2003; Aquirre *et al.*, 2007). Lai *et al.*, (2001) menyatakan bahwa ERK1/2 memengaruhi proliferasi dan diferensiasi sel pada berbagai tipe sel termasuk osteoblas.

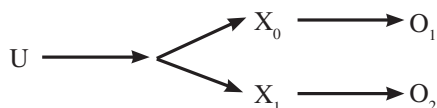
Peningkatan ERK1/2 yang teraktivasi oleh karena stimulasi mekanik akan meningkatkan aktivitas ER α sehingga terjadi peningkatan fosforilasi ER α (Jessop *et al.*, 2001). Peningkatan aktivitas ER α dapat menginduksi proses transkripsi gen di nukleus yaitu gen *c-fos*, *erg-1* dan diikuti sintesis protein yang berperan pada peningkatan proliferasi osteoblas. ER α selain berperan pada proliferasi juga memengaruhi diferensiasi osteoblas yaitu dengan menginduksi transkripsi gen *core binding factor-1 (c-bfa1)* yang berperan pada diferensiasi osteoblas (Okazaki *et al.*, 2002; McCharty, 2008). Peningkatan aktivitas ER α dan ERK1/2 akibat stimulasi mekanik tersebut juga akan menyebabkan peningkatan proses transkripsi gen ER α , sehingga jumlah ER α meningkat. Peningkatan aktivitas ER α dan ERK1/2 di nukleus juga akan meningkatkan proses transkripsi gen *insulin like growth factor-I (IGF-I)* dan selanjutnya akan mengaktivasi IGF-IR (Lanyon *et al.*, 2004). Aktivasi pada ER α dan ERK1/2 dapat mengaktivasi IGF-IR dan biasa disebut *cross talk* (Kahlert *et al.*, 2000; Lanyon *et al.*, 2004).

Atas dasar kajian teori di atas, tujuan penelitian ini adalah untuk mendapat informasi akibat pemberian stimulasi mekanik melalui latihan fisik intensitas sedang di usia muda terhadap ekspresi ER α , ERK1/2, dan IGF-IR dalam mempengaruhi peningkatan kepadatan tulang.

MATERI DAN METODE

Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental murni yang dilakukan di laboratorium sehingga perlakuan dapat terkendali dan terukur. Rancangan penelitian yang digunakan adalah: *The Randomized Posttest only Control Group Design* (Campbell (1966) dalam Gibbon *et al.*, 1997). Perlakuan yang diberikan adalah: latihan fisik pembebanan dengan intensitas sedang pada tikus putih betina usia muda. Rancangan percobaan disajikan pada gambar.



Gambar 1. Bagan Rancangan Penelitian.
Keterangan: U: Unit Eksperimen; X_0 : Kelompok kontrol, yaitu kelompok yang tidak diberi latihan fisik; X_1 : Kelompok perlakuan, yaitu kelompok yang diberi latihan fisik pembebanan dengan intensitas sedang; O_1 : Observasi X_0 ; O_2 : Observasi X_1

Pada penelitian ini sebagai unit eksperimen adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar, jenis kelamin betina, dan umur sekitar 4 bulan, diberikan latihan selama 45 menit pada kelompok perlakuan.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi/Kimia Universitas Muhammadiyah Malang dan Laboratorium Fisiologi Molekuler Universitas Brawijaya Malang pada bulan Pebruari 2006–September 2007.

Bagan Kerangka Operasional Penelitian

Data hasil penelitian ditabulasi dan dianalisis dengan *Multivariate Analysis of Variance (MANOVA)* dan analisis korelasi Pearson.



Gambar 2. Bagan kerangka operasional penelitian.

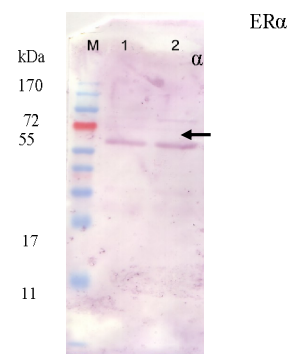
HASIL DAN DISKUSI

Data ekspresi ERα pada tikus putih usia muda setelah pemberian latihan fisik

Data ekspresi ERα pada tikus putih usia muda setelah pemberian latihan fisik disajikan pada *tabel 1*.

Tabel 1. Data ekspresi ERα pada tikus putih betina usia muda setelah pemberian latihan fisik

Perlakuan	Ulangan	Mean ± SD* (intensitas)
Kontrol	7	183,90 ± 2,03
Perlakuan	7	212,23 ± 1,25



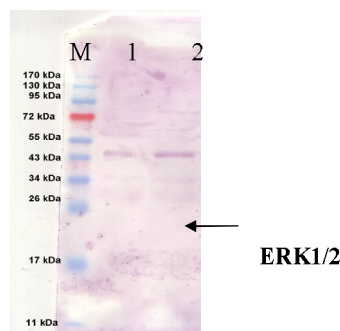
Gambar 3. Hasil immunoblotting ERα pada tikus putih betina usia muda setelah pemberian latihan fisik.

Keterangan: M: Marker; 1: Kontrol; 2: Perlakuan

Ekspresi ERK1/2 pada tikus usia muda setelah pemberian latihan fisik

Tabel 2. Data ekspresi ERK1/2 pada tikus putih betina usia muda setelah pemberian latihan fisik

Perlakuan	Ulangan	Mean ± SD* (intensitas)
Kontrol	7	183,89 ± 2,03
Perlakuan	7	219,23 ± 5,11



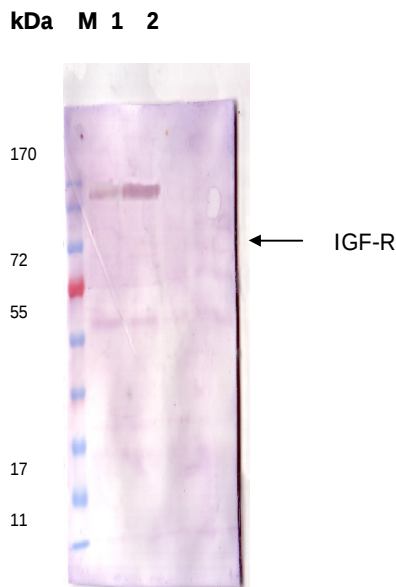
Gambar 4. Hasil immunoblotting ERK 1/2 pada tikus putih betina usia muda setelah pemberian latihan fisik.

Ekspresi IGF-1R setelah pemberian latihan fisik pada tikus putih usia muda

Data ekspresi IGF-IR pada tikus putih usia muda setelah pemberian latihan fisik disajikan pada *tabel 3*.

Tabel 3. Data ekspresi IGF-IR pada tikus putih usia muda setelah pemberian latihan fisik

Perlakuan	Ulangan	Mean $\pm$ SD* (intensitas)
Kontrol	7	189,97 $\pm$ 0,89
Perlakuan	7	214,93 $\pm$ 4,41



Gambar 5. Hasil immunobloting IGF-IR pada tikus putih betina usia muda setelah pemberian latihan fisik.

Data kepadatan tulang pada tikus putih usia muda setelah pemberian latihan fisik.

Tabel 4. Data kepadatan tulang pada tikus putih usia muda setelah pemberian latihan fisik

Perlakuan	Ulangan	Mean $\pm$ SD*
Kontrol	7	1262,5 $\pm$ 65,93
Perlakuan	7	1357,43 $\pm$ 48,49

Hasil analisis MANOVA menunjukkan bahwa ada peningkatan ekspresi ER α , ERK1/2, IGF-IR dan kepadatan tulang secara nyata pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol secara bersama-sama dengan dengan Uji *Hotelling's Trace* $p = 0,000 < \alpha = 0,05$.

Berdasarkan hasil analisis korelasi Pearson menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi ER α , ERK1/2, IGF-IR berkorelasi cukup kuat dengan peningkatan

kepadatan tulang, artinya peningkatan ekspresi ER α , ERK1/2, IGF-IR memengaruhi peningkatan kepadatan tulang. Adapun korelasi masing-masing terhadap padat tulang adalah sebagai berikut: $r = 0,692$ untuk ER α dengan padat tulang $r = 0,711$ untuk ERK1/2 dengan padat tulang, dan $r = 0,608$ IGF-IR ($\alpha = 0,05$). Peningkatan ER α juga berkorelasi cukup erat dengan peningkatan IGF-IR dengan $r = 0,965$ dan ERK1/2 dan $r = 0,914$ ($\alpha = 0,05$).

Peran Latihan Fisik terhadap Aktivasi ER α , ERK1/2, dan IGF-IR pada Metabolisme Tulang dalam Meningkatkan Kepadatan Tulang

Berdasarkan hasil analisis multivariat (MANOVA) diketahui bahwa pemberian stimulasi mekanik dengan latihan fisik dapat meningkatkan ekspresi ER α , ERK1/2, dan IGF-IR pada osteoblas dan meningkatkan kepadatan tulang secara bersama-sama ($p = 0,000 < \alpha = 0,05$). Berdasarkan hasil analisis korelasi Pearson menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi ER α , ERK1/2, dan IGF-IR memengaruhi peningkatan kepadatan tulang yang ditunjukkan oleh adanya angka korelasi yang cukup kuat. Pembahasan ini akan mencoba menguraikan beberapa kemungkinan mekanisme peran stimulasi mekanik akibat latihan fisik terhadap aktivasi ER α , ERK1/2, dan IGF-IR dan perannya dalam peningkatan kepadatan tulang.

Mekanisme stimulasi mekanik dalam menimbulkan signal terhadap aktivitas osteoblas belum semuanya diungkap. Salah satu dugaan adalah melalui peristiwa yang dikenal sebagai mekanotransduksi (Turner & Roubling, 2004). Mekanotransduksi adalah proses pengubahan signal mekanik pada sel untuk diubah menjadi signal biokimiawi (Burger & Nulend, 1999).

Latihan fisik merupakan salah satu cara untuk menimbulkan stimulasi mekanik. Pemberian latihan fisik dapat menyebabkan terjadi perubahan struktur jaringan/ sel dan dimungkinkan menyebabkan adanya tegangan, aliran cairan (*fluid flow*) atau *fluid shear stress* melalui intrakanalikuli dan akan diterima oleh sel mekanosensitif yaitu osteosit melalui *gap junction* osteosit. *Gap junction* merupakan saluran transmembran yang berhubungan dengan sitoplasma dari sel yang berdekatan, dan hanya bisa dilewati oleh molekul yang sangat kecil lebih kurang 1kDa seperti ion, molekul intraseluler signaling (kalsium, cAMP, inositol trifosfat) dan saluran ini disusun atas protein yang dinamakan *connexins* (Cheng, 2001). *Gap junction* akan memperantarai osteosit untuk bekerja sebagai mekanosensor diperantarai oleh prostaglandin E₂ (PGE₂) (Cheng, 2001; Cherianty, 2008). *Gap junctions* juga memengaruhi ERK1/2 (Stains, 2005).

Signal mekanik diterima oleh osteoblas melalui ECM akan menyebabkan aktivasi terhadap integrin signaling (**Fulferd**, 2004). Integrin akan mentransmisikan signal mekanik dari ECM melalui membran plasma (**Katsumi**, 2004) untuk kemudian terjadi aktivasi terhadap integrin signaling. Ikatan antara integrin dan komponen ECM yang teraktivasi sangat penting untuk aktivitas osteoblas termasuk pembentukan matriks tulang (**Garcia & Rayes**, 2005) dan untuk pertahanan osteoblas (**Grigorious**, 2004). Integrin selanjutnya akan mentransduksi signal ke sitoskeleton melalui aktivasi terhadap FAK (**Ponik & Pavalko**, 2004). FAK yang sudah teraktivasi lebih lanjut akan mengaktifkan jalur ERK1/2 (**Katsumi**, 2004; **Katsumi et al.**, 2005). Konsekuensi dari teraktivasinya ERK1/2 adalah regulasi terhadap ekspresi gen yang bertanggung jawab terhadap pertumbuhan dan diferensiasi (**Owen et al.**, 2005).

ERK1/2 sangat penting untuk proliferasi dan diferensiasi (**Lai et al.**, 2001). Lebih lanjut **Ge et al.**, (2007) menyatakan MAPK-ERK1/2 merupakan faktor penting pada aktivitas osteoblas melalui aktivasi terhadap faktor transkripsi yaitu *Runx2/c-bfa1* yang bertanggung jawab terhadap diferensiasi dan pembentukan matriks tulang. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya dimana MAPK inhibitor pada fase diferensiasi sel menyebabkan penghambatan terhadap ekspresi gen spesifik pada osteoblas (**Xiao et al.**, 2002). Penelitian senada dengan menggunakan dominan negatif ERK menunjukkan adanya hambatan terhadap diferensiasi pada osteoblas manusia (**Jaiswa et al.**, 2000). ERK1/2 juga berperan pada apoptosis osteoklas (**Kousteni et al.**, 2003).

Aktivasi ERK1/2 akan mengaktivasi ER α yang terdapat di membran plasma di mana ER α yang teraktivasi kemudian akan menuju ke nukleus untuk berikatan dengan DNA yang spesifik yang dikenal sebagai ERE (aksi genomik) atau juga pada daerah yang bukan ERE (non genomik) untuk kemudian akan terjadi proses transkripsi gen untuk proliferasi dan diferensiasi yaitu c-fos, egr-1, IGF-I dan juga ER α . ER α juga akan berinteraksi dengan faktor transkripsi *Runx 2/cbfa-1* yang berperan pada diferensiasi osteoblas dan pembentukan matriks tulang. *Runx 2/cbfa-1* akan memengaruhi ekspresi gen *alkaline phosphatase*, *type 1 collagen*, dan *osteocalcin* yang berperan dalam pembentukan matriks tulang (**Karsenty**, 2001; **Okazaki et al.**, 2002; **McCarthy**, 2008). Pemberian stimulasi mekanik tidak hanya menyebabkan aktivasi terhadap ER α tapi juga terjadi *up regulated* terhadap ER α dan berakibat terjadi peningkatan ekspresi ER α (**Lau et al.**, 2006). ER α yang teraktivasi juga dapat mengaktivasi IGF-IR yang berikatan dengan integrin atau bersifat *crosstalk*

(**Kahlert et al.**, 2000), di mana IGF-IR yang teraktivasi kemudian dapat mengaktivasi ERK1/2 sehingga aktivitas ERK1/2 meningkat (**Lau et al.**, 2006). Aktivasi IGF-IR juga dipengaruhi oleh integrin yang teraktivasi atau terjadi *crosstalk* antara integrin dan IGF-I signaling akibat adanya stimulasi mekanik (**Kapur et al.**, 2005).

Peningkatan ekspresi ER α , IGF-IR, dan ERK1/2 akan mempengaruhi proliferasi dan diferensiasi osteoblas dan lebih lanjut akan meningkatkan pembentukan matriks tulang, oleh karena itu kepadatan tulang meningkat. Berdasarkan kajian tersebut peningkatan ekspresi ER α , ERK1/2, dan IGF-IR memerlukan aktivasi terhadap integrin untuk terjadinya transduksi signal mekanik dari luar sel menjadi signal biokimiawi di dalam sel untuk memengaruhi aktivitas osteoblas. **Jalali et al.**, (2001) menyatakan bahwa formasi yang dinamik dan koneksi baru antara integrin dengan ECM merupakan faktor penting untuk penghantaran signal mekanik dari luar sel ke intrasel yang diakibatkan oleh adanya stimulasi mekanik.

SIMPULAN

Simpulan pada penelitian ini adalah:

1. Latihan fisik intensitas sedang meningkatkan ekspresi ER α pada osteoblas tikus putih betina usia muda.
2. Latihan fisik intensitas sedang meningkatkan ekspresi ERK1/2 pada osteoblas tikus putih betina usia muda.
3. Latihan fisik intensitas sedang meningkatkan ekspresi IGF-IR pada osteoblas tikus putih betina usia muda.
4. Latihan fisik intensitas sedang meningkatkan kepadatan tulang melalui ERK1/2-ER α -IGF-IR.

SARAN

Perlu penelitian lebih lanjut terhadap ekspresi gen c-fos, *c-bfa1* oleh karena adanya stimulasi mekanik akibat pemberian latihan fisik di usia muda mengingat ERK1/2 dapat memengaruhi ekspresi gen c-fos maupun *c-bfa1* tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Almeida A, Han L, Brien CAO, Kousteni S, Monologas SC**, 2006. Classical Genotropic Versus Kinase Regulated of Gene Transcription by the Estrogen Receptor Alfa. *Endocrinology* 147(4): 1986–1996.
- Aquirre JI, Plotkin LI, Gortazar AR, Milan MM, Brien CAO, Monologas SC, Bellido T**, 2007. A Novel Ligand Independent Function of The Estrogen Receptor is Essential for Osteocyte and osteoblast Mechanotransduction. *J. Biol Chem.* 282(35): 25501–25508.

- Baylink DJ, Strong DD, Mohan S**, 1999. The Diagnosis and Treatment of Osteoporosis Future Prospects. *Mol Med Today* 5: 133–140.
- Burger EH, Nulend JK**, 1999. Mechanotransduction in Bone Role of The Lacuno Canalicular Network. *FASEB J.* 10: 13101–112.
- Cheng B, Kato Y, Zhao S, Luo J, Bonewald F**, 2001. PGE2 is Essential for Gap Junctions-Mediated Intercellular Communication between Osteocyte Like Cell in Response to Mechanical Strain. *Endoc.* 142(8): 3464–3473.
- Cheng MZ, Rowlinson SC, Pitsilides AA, Zaman G, Mohan S, Baylink DJ, Lanyon LE**, 2002. Human Osteoblast Proliferative Responses to Strain and 17 β Estradiol are Mediated by the Estrogen Receptor and the Receptor of IGF-I. *J of Bone and Mineral Research.* 17: 593–602.
- Cherian PP, Cheng B, Gut S, Spragust E, Bonewald LF, Jiang JX**, 2008. Effect of mechanical Strain on The Function of Gap Junctions in Osteocyte are mediated through The Prostaglandin EP2 Receptor. *J of Biol. Chem.* 278(44): 43146–43156.
- Downey PA, Siegel MI**, 2006. Bone Biology and the Clinical Implications for Osteoporosis. *Phys Ther* 86: 77–91.
- Fanning PJ, Emkey G, Smith RJ, Grodzinsky AJ, Szasz N, Tripel SB**, 2003 *J. Biol Chem.* 278: 50940–50948.
- Farhan A, Daniel G, Thomas C, Clifford J, Krust**, 2007. Effect of Loss Classical Estrogen Response Element Signaling on Bone in Male Mice. *Endoc.* 148: 1902–1910.
- Fulferd HM**, 2004. Signal Transduction and Mechanical Stress. *Sci. STKE* 8: 1–88.
- Garcia AJ, Rayes CD**, 2005. Bio-adhesive Surface to Promote Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *J. of Dental Research* 84(5): 407–413.
- Gennari L, Nuti R, Bilezikian JP**, 2004. Aromatase activity and Bone Homeostasis in Men. *J. Clin Endocrinol Metab* 89: 5898–5907.
- Ge C, Xiao G, Jiang D, Franceschi TR**, 2007. Critical Role of The Extracellular Signal Regulated Kinase-MAPK Pathway in Osteoblast Differentiation and Skeletal Development. *J of Cell Biol.* 176(5): 709–716.
- Gibbon, Barry, Herman & Joan**, 1997. True and Quasi Experimental Designs. *Practical Assessment, Research dan Evaluation* 5(14).
- Grigoriou V, Saphiro IM, Adam FAC, Compston RJ, Ducheyne P & Adam CS**, 2004. Apoptosis and Survival of Osteoblast-Like Cell are Regulated by Surface Attachment. *J. Biol Chem.* 280(3): 1733–1739.
- Ingram AJ, Jim L, Cai L, Thai K, Ly H, Scolley JW**, 2000. NO Inhibits Stretch-Induced MAPK Activity by Cytoskeletal Disruption. *J. Biol. Chem.* 275: 40301–40306.
- Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marsha DR, Pittenger MF**, 2000. Adult Human Appl Physiol Mesenchymal Stem Cell Differentiation to the Osteogenic or Adipogenic Lineage Is Regulated by Mitogen Activated Protein Kinase. *J Biol Chem.* 275(13): 9645–9652.
- Jalali S, Pozo MA, Chen KD, Miao Hui, Shuan Yi Li, Schwerts MA, Chen S**, 2001. Integrin-mediated Mechanotransduction Requires its Dynamic Interaction with Specific Extracellular Matrix (ECM) ligands. *PNAS* 98(3): 1042–1046.
- Jessop HL, Shoberg M, Cheng MZ, Zaman G, Jones W, Lanyon E**, 2001. Mechanical Strain and Estrogen Activate Estrogen Receptor α in Bone Cells. *JBM.* 16(6): 117–128.
- Kahlert S, Nuedling S, Eickels, Vetter H, Meyer R, Grohe C**, 2000. Estrogen Receptor α Rapidly Activates the IGF-I Receptor Pathway. *J.Biol.Chem* 275(24): 18447–18453.
- Kapur S, Mohan S, Baylink D, Lau KW**, 2005. Fluid Shear Stress Synergizes with Insulin Like Growth Factor-I on Osteoblast Proliferation through Integrin Dependent Activation of IGF-I Mitogenic Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 280(20): 20163–20170.
- Karsenty G**, 2001. Transcriptional Control of Osteoblast Differentiation. *Endocrinology* 149(7): 2731–2733.
- Katsumi**, 2004. Integrin in Mechanotransduction. *The Journal of Biological Chemistry* 279(13): 12001–12004.
- Katsumi A, Nul T, Matshushita T, Keibuchi, Schawrtt MA**, 2005. Integrin Activation Matrix Banding Mediate Cellular Respond to Mechanical Stretch. *J of Bioche. Chem.* 280 (29): 16546–16549.
- Kemmler W, Engelke K, Lauber D, Weineck J, Hensen J, Kelender WA**, 2002. Exercise Effect on Fitness and Bone Mineral Density in early Post Menopausal Women: 1-year EFOPS results. *Med. Sci. Sport Exercise* 34(2): 2115–2123.
- Kenny AM, Prestwood KM**, 2000. Osteoporosis Pathogenesis, Diagnosis and Treatment in Older Adult Skeleton. *Endocr Rev.* 23: 279–302.

- Khosla S, Melton LJ, Riggs BL**, 2002. Estrogen and the Male Skeleton. *J.Clin Endocrinol Metab* 87: 1443–1450.
- Kousteni S, Han L, Chen JR, Almeida M, Plotkin L, Bellido T, Monlogas**, 2003. Kinase-Mediated Regulation of Common Transcription Factors Accounts for the Bone-Protective Effect of Sex Steroids. *J.Clin. Invest.* 111: 1651–1664.
- Lai CF, Chaundary L, Fausto A, Halstead R, Ory DS, Avioli LV, Cheng SL**, 2001. ERK is Essential for Growth, Differentiation, Integrin Expression, and Cell Function in Human Osteoblastic Cells.
- Lanyon LE, Armstrong V, Zaman, Price J**, 2004. Is Estrogen Receptor Alfa Key to Controlling Bone Resistance to Fracture. *Journal of Endocrinology* 182: 183–191.
- Lau KW, Kapur S, Kesavan, Baylink**, 2006. Up regulation of Wnt, ER, IGF-IR, and Bone Morphogenetic Protein Pathway in C57BL/6J Osteoblast to The Differential Anabolic Resonse To Fluid Shear Stress. *J Biol Chem.* 281(14): 9576–9588.
- Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillman HM, Haseroth KR, Wehlin**, 2003. Nongenomic Steroid Action: Controversies, Questions, and Answers. *Physiol Rev* 83: 965–1016.
- McCharty TL, Chang WZ, Liu Y, Centrella M**, 2008. Runx2 Integrated Estrogen Activity in Osteoblast. *The Journal of Biological Chemistry* 278(44): 43121–43128.
- Monologas SC, Kousteni, Jilka**, 2002. Sex Steroid and Bone. *Recent Progress in Hormone Research.* 57: 385–409.
- National Institutes of Health**, 2005. Osteoporosis Overview. *NIAM*: 1–9.
- Nilsson S, Makelia S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Anderson G, Enmark E, Petterson K, Warner M, Gustafsson JA**, 2001. Mechanisme of Estrogen Action. *Physiological Review* 81(4): 1535–1565.
- Okazaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M, Kido S, OOK H**, 2002. Estrogen Promotes Early Osteoblast Differentiation in Mouse Bone Marrow Stromal Cell Lines that Express Estrogen Receptor α atau β . *Endocrinology* 143(6): 2349–2356.
- Owen GRH, Meredit DO, Gwynn, Richard RG**, 2005. Focal Adhesion Quantification—A New Essay of Material Biocompatibility. *European Cell and Material.* 9: 85–96.
- Pedram A, Razandi, Aid kenhead M, Hughes CCW, Levin ER**, 2002. Integration of the Non Genomic and Genomic Actions of Estrogen. *J. Biol. Chem.* 277(52): 50768–50775.
- Ponik SM, Pavalko FM**, 2004. Formation of Focal Adhesion on Fibronectin Promotes Fluid Shear Stress Induction of COX2 and PGE2 release in MC3T3-E1 Osteoblast. *The Journal Application Physiology* 97: 135–142.
- Rai D, Florova A, Frasor J, Carpenter AE, Katsenellenbogen BS**, 2005. Distinctive Action of Membran Targetet Versus Nuclear Localized Estrogen Reseptors in Breast Cancer Cell. *Molecular Endocrinology* 19(6): 1606–1617.
- Razandi M, Alton G, Pedram A, Ghonsani S, Webb P, Levin ER**, 2003. Structural Determinant Necessary for the Localization and Function of Estrogen Receptor Alfa at the Plasma Membrane. *Molecular and Celullar Biology* 23(5): 1633–1646.
- Riggs Lawrence B**, 2002. Sex Steroid and the Construction and Conservation of the adult Skeleton. *Endocrine Reviews* 23(23): 279–302.
- RoblingAG, CastilloAB, Turner CH**, 2006. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. *Anual. RivIEWS Biomed Eng* 8: 455–498.
- Stains JP**, 2005. Gap Junctions Regulated ERK Kinase Signaling to Affect Gene Transcription. *Molecular Biology of the Cell.* 16: 64–72.
- Supari**, 2007. Satu dari Tiga Wanita Rawan Osteoporosis. [http://www.suarakaryaonline.com/news. Html](http://www.suarakaryaonline.com/news.Html), akses 20 Desember 2007.
- Turner CH, Roubing AG**, 2004. Exercise as Anabolic Stimulus For Bone. *Current Pharmaceutical Design.* 10(21): 2629–2641.
- Xiao G, Jiang D, Gopalakrisnan, Franceschi**, 2002. Fibroblast Growth Factor 2 Induction of the Osteocalcin Gene Require MAPK Activity and Phosphorylation of the Osteoblast Transcription Factor, Cbfa1/RUNX2. *J. Biol. Chem.* 277(39): 36181–36187.
- Yamazaki S, Ichimura S, IwamotoJ, TakedaT & Toyama Y**, 2004. Effect of Walking Exercise on Bone Metabolisme in Post Menopausal Women with Osteoponia/osteoporosis. *Bone Mineral Metabolisme* 22 (s): 500.