

Artikel Penelitian

Suplementasi Vitamin D₃ Dosis Tinggi Menurunkan Kalsifikasi Tulang Femur pada Janin Mencit

High Dose Vitamin D3 Supplementation Decrease Calcification of the Femur Bone in Fetal Mice

Timothy Imanuel M¹, Heddy Herdiman², Teresa L Wargasetia³

¹Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha Bandung

²Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha Bandung

³Bagian Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha Bandung

ABSTRAK

Kelebihan asupan vitamin D pada mencit yang bunting dapat menyebabkan penurunan massa tulang janin. Penelitian dilakukan untuk mengetahui apakah pemberian suplementasi vitamin D₃ dosis tinggi dapat mengganggu kalsifikasi tulang femur janin mencit. Metode eksperimental laboratorium dengan rancangan acak lengkap dilakukan menggunakan lima ekor mencit jantan dan lima ekor mencit (*Mus musculus L.*) betina galur *Swiss Webster* berumur 8-12 minggu. Subjek penelitian adalah lima janin mencit dari hasil perkawinan yang hidup. Mencit dibagi ke dalam lima macam perlakuan yaitu KN (kontrol negatif), perlakuan A (13 IU vitamin D₃), perlakuan B (13 IU vitamin D₃), perlakuan C (13 IU vitamin D₃), dan perlakuan D (13 IU vitamin D₃). Mencit dikawinkan, kemudian diberi suplementasi sejak usia kebuntingan 11 hari. Pada usia kebuntingan 20 hari, mencit dikorbankan kemudian dilakukan pewarnaan *Alizarin Red S* terhadap janin. Parameter yang diuji adalah panjang tulang femur janin mencit yang mengalami kalsifikasi setelah diberi perlakuan. Analisis data menggunakan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) satu arah yang dilanjutkan dengan uji *Least Significance Different* (LSD) dengan $\alpha=0,05$. Hasil menunjukkan bahwa janin mencit yang diberi vitamin D₃ dosis tinggi (kelompok C dan D) memiliki panjang kalsifikasi tulang femur yang berbeda bermakna ($p\leq 0,05$) yaitu lebih pendek dibandingkan dengan kontrol negatif, kelompok A, dan kelompok B. Simpulan penelitian adalah pemberian vitamin D₃ dosis tinggi menurunkan kalsifikasi tulang femur janin mencit.

Kata Kunci: Janin, kalsifikasi tulang, vitamin D₃

ABSTRACT

Excessive intake of vitamin D in pregnant mice can cause fetal bone mass loss. This research aimed to study whether high dose supplementation of vitamin D3 can interfere femur bone calcification in fetal mice. This research used true experimental laboratory method using completely randomized design on five male mice and five female mice (Mus musculus L.) of Swiss Webster strain aged 8-12 weeks. Subjects were five alive fetal mice of the mated mice. Experimental animals were divided into five treatments, namely, KN (negative control), treatment A (13 IU of vitamin D3), treatment B (26 IU of vitamin D3), treatment C (130 IU of vitamin D3), and treatment D (260 IU of vitamin D3). Mice were mated and supplemented since the 11th day of gestation. At the 20th day of gestation, the mice were sacrificed and the fetuses were stained with Alizarin Red S staining. The parameter tested was calcified fetal femur length after being treated. Data analysis was using One Way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Least Significance Different (LSD) test with $\alpha=0,05$. The research result showed that high-dose vitamin D3 supplemented-mice (C and D group) had significantly different calcified fetal femur length ($p\leq 0,05$) which were shorter compared to negative control, group A, and group B. The conclusion of this research is that the supplementation of high-dose vitamin D3 can decrease fetal femur bone calcification in mice.

Keywords: Bone calcification, fetus, vitamin D3

Korespondensi: Teresa L Wargasetia. Bagian Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha Bandung, Jl. Prof. drg. Suria Sumantri MPH. 65 Bandung 40164 Tel. (022) 2012186 Email: Teresa.lw@med.maranatha.edu.

DOI: <http://dx.doi.org/10.21776/ub.jkb.2017.029.03.1>

PENDAHULUAN

Vitamin D terdiri dari, kolekalsiferol (vitamin D₃) dan ergokalsiferol (vitamin D₂), pro-hormon dan vitamin. Vitamin D₃ dibentuk di kulit setelah pajanan terhadap sinar matahari atau dikonsumsi dari makanan alami dan suplemen, sedangkan vitamin D₂ diperoleh dari iradiasi tanaman atau suplemen. Vitamin D di dalam tubuh memerlukan dua langkah hidroksilasi agar menjadi aktif. Hidroksilasi pertama terjadi di hati sehingga terbentuk 25-hydroxyvitamin D₃ (25 OH D₃) yang merupakan metabolit vitamin D utama di sirkulasi. Hidroksilasi kedua terjadi di ginjal, membentuk 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25 (OH)₂ D₃] yang adalah metabolit aktif berupa hormon(2). 1,25 (OH)₂ D₃ kemudian berikatan dengan reseptor vitamin D di intestin, ginjal, dan tulang (1).

Vitamin D mempunyai peran penting dalam regulasi metabolisme, absorpsi kalsium dan fosfor dari tulang. Walaupun demikian, efek dari vitamin D tidak hanya terbatas pada homeostasis mineral dan mempertahankan kesehatan tulang (2). Keberadaan reseptor vitamin D pada jaringan dan organ lain selain tulang menunjukkan bahwa fisiologi vitamin D tidak hanya berperan dalam homeostatis tulang. Enzim 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase (1alpha-OHase) yang mengkatalisis konversi 25 OH D₃ menjadi 1,25 (OH)₂ D₃ tidak hanya terdapat di ginjal, tetapi ternyata terdapat di sel-sel lain seperti makrofag dan keratinosit (2,3). Sintesis ekstra renal 1,25 (OH)₂ D₃ menunjukkan adanya peran autokrin/parakrin dari 1,25 (OH)₂ D₃ yang berperan penting dalam regulasi proliferasi dan diferensiasi sel selain dalam homeostasis kalsium (1,4).

Pajanan sinar matahari yang banyak atau lama akan meningkatkan pelepasan vitamin D ke peredaran darah. Pajanan sinar matahari yang diterima seseorang dipengaruhi oleh lokasi geografis, cara berpakaian, penggunaan *sunscreen*, dan warna kulit. Orang Afrika Amerika yang berkulit gelap membutuhkan lima kali pajanan sinar matahari untuk memperoleh respons yang sama dengan orang kulit putih (5). Walaupun efisiensi pembentukan vitamin D di kulit bersifat heterogen, namun secara umum dapat ditetapkan rekomendasi untuk jumlah vitamin D yang dikonsumsi.

Pada tahun 2011, *the Institute of Medicine* Amerika melaporkan bahwa jumlah vitamin D yang direkomendasikan untuk dikonsumsi setiap hari (*Recommended Dietary Allowances*) adalah 600 IU/hari untuk usia 1-70 tahun dan 800 IU/hari untuk usia 71 atau lebih (6). Rekomendasi jumlah vitamin D untuk dikonsumsi oleh wanita hamil, wanita hamil dengan risiko tinggi pre-eklampsia, dan wanita hamil dengan risiko tinggi defisiensi vitamin D berturut-turut adalah 400, 800, dan 1.000 IU per hari (7). Seseorang dengan banyak melanin di kulit, obesitas, kurang pajanan sinar matahari, atau sudah tua membutuhkan vitamin D hingga 5.000 IU per hari (8). Batas aman untuk konsumsi vitamin D tanpa supervisi dokter adalah maksimum 50 mg atau 2.000 IU/hari untuk pemakaian jangka panjang (6).

Suplementasi vitamin D yang berlebih memunculkan kekhawatiran akan toksisitas. Hipotesis untuk toksisitas vitamin D bahwa asupan vitamin D meningkatkan konsentrasi berbagai metabolit vitamin D, termasuk vitamin D itu sendiri dan level 25 OH D₃ plasma pada konsentrasi yang melebihi kapasitas pengikatan dari protein pengikat/reseptor vitamin D dan 25 OH D₃ bebas mempunyai efek langsung pada ekspresi gen ketika

memasuki sel-sel target. Hipervitaminosis D dapat terjadi ketika dosis farmakologis vitamin D dikonsumsi untuk periode waktu yang panjang atau dari megadosis tunggal yang menyebabkan peningkatan konsentrasi 25(OH) D yang besar di peredaran darah (2). Toksisitas pada dewasa dapat muncul pada dosis lebih dari 10.000 IU/hari pada pajanan jangka pendek (kurang dari enam bulan). Suplemen dosis tunggal sebesar 7,5 mg (300.000 IU) atau lebih juga dapat membahayakan (9).

Toksisitas dari suplementasi vitamin D yang berlebihan telah menjadi perhatian. Penggunaan vitamin D yang meluas dari tahun 1930 hingga 1950-an di Amerika Serikat dan Eropa memunculkan berbagai kasus toksisitas (10). Asupan vitamin D yang berlebihan dapat menimbulkan toksisitas melalui hiperkalsemia. Gejala toksisitas vitamin D yaitu kelainan gastrointestinal seperti anoreksia, diare, konstipasi, mual, dan muntah. Sakit pada tulang, pusing, sakit kepala berkelanjutan, denyut jantung tidak teratur, hilang nafsu makan, sakit otot dan persendian adalah gejala lainnya yang muncul dalam beberapa hari atau minggu; sering buang air kecil terutama malam hari, haus berlebihan, lemas, cemas, gatal, dan batu ginjal (2).

Adanya toksisitas dari suplementasi vitamin D yang berlebihan memunculkan pertanyaan tentang efek hipervitaminosis D terhadap janin. Suatu penelitian *in vivo* menunjukkan bahwa kadar 1,25 (OH)₂ D₃ yang tinggi pada mencit model tanpa gen reseptor vitamin D (Vdr -/-) bunting mempunyai efek mengurangi massa tulang pada fetus Vdr +/- yang dikandungnya (11). Melalui penelitian ini ingin diketahui apakah suplementasi vitamin D₃ yang berlebihan (lebih dari dosis konversi batas aman pada manusia) dapat mempengaruhi kalsifikasi tulang femur janin mencit melalui pengukuran panjang tulang femur.

METODE

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium dengan rancangan acak lengkap. Mencit-mencit yang digunakan dalam penelitian diadaptasikan dengan hanya diberi makan dan minum, tanpa perlakuan selama satu minggu di laboratorium. Pada penelitian ini mencit-mencit yang digunakan tidak terpajan terhadap sinar matahari sehingga vitamin D diperoleh hanya dari perlakuan yang diberikan. Lima ekor mencit betina dan lima ekor mencit jantan dikawinkan dengan menempatkan setiap pasangan dalam satu kandang, kemudian dilakukan pemeriksaan sumbat vagina pada mencit-mencit betina pada esok paginya. Sumbat vagina adalah gumpalan berwarna putih kekuningan pada vagina mencit betina yang berasal dari koagulasi sekresi kelenjar vesikular mencit jantan. Keberadaan sumbat vagina mengindikasikan bahwa aktivitas seksual telah terjadi, dan bila mencit betina yang mempunyai sumbat vagina kemudian bunting, hari ditemukannya sumbat vagina ditentukan sebagai hari pertama kebuntingan (12).

Masing-masing mencit betina yang telah bunting selama 11 hari diberi perlakuan yang berbeda. Pada kelompok kontrol negatif mencit diberi 1,3 mL minyak secara oral. Pada empat kelompok perlakuan selain minyak per oral diberikan vitamin D₃ dalam tiga dosis berbeda, yaitu 13 IU vitamin D₃ untuk perlakuan A, 26 IU vitamin D₃ untuk perlakuan B, 130 IU vitamin D₃ untuk perlakuan C, dan 260 IU vitamin D₃ untuk perlakuan D. Perlakuan terhadap semua mencit dilakukan pada kebuntingan hari ke-11 hingga hari ke-20. Dosis vitamin D₃ yang digunakan pada

perlakuan A merupakan dosis yang dibutuhkan oleh seseorang dengan banyak melanin di kulit, obesitas, kurang pajanan sinar matahari, atau sudah tua yaitu 5.000 IU per hari (8) yang kemudian dikonversikan berdasarkan perbandingan dosis manusia dan mencit. Dosis pada manusia 70 kg adalah 5.000 IU, koefisien perkalian untuk mencit 20 gram adalah 0,0026 (13), sehingga dosis untuk mencit 20 gram = 5.000 IU x 0,0026 = 13 IU. Dosis vitamin D₃ yang digunakan pada perlakuan B adalah dua kali dosis perlakuan A. Dosis vitamin D₃ pada perlakuan C menggunakan *loading dose regiment* pada orang dengan defisiensi vitamin D₃ berdasarkan ketentuan yang dibuat oleh *National Osteoprosis Society* yaitu 50.000 IU (8) yang kemudian dikonversikan menjadi 50.000 IU x 0,0026 = 130 IU. Dosis vitamin D₃ yang digunakan pada perlakuan D adalah dua kali dosis perlakuan C.

Mencit diberi suplementasi vitamin D₃ sejak usia kebuntingan 11 hari. Vitamin D₃ diberikan pada usia kebuntingan 11 hari yang merupakan awal mula terjadinya kalsifikasi tulang femur janin mencit (14). Pada usia kebuntingan 20 hari, semua mencit betina dikorbankan untuk dibuka uterusnya. Mencit dikorbankan pada usia kebuntingan 20 hari dimaksudkan agar kondisi janin mendekati keadaan saat lahir dan belum mendapatkan nutrisi selain dari plasenta induk mencit. Sebelum tindakan pembukaan uterus, dilakukan tindakan anastesi terlebih dahulu dengan menggunakan eter. Setelah itu dilakukan pemilihan secara acak lima ekor janin mencit yang hidup dari setiap jenis perlakuan. Jumlah janin mencit yang digunakan dihitung menggunakan rumus: $(T-1)(r-1) \geq 15$ dan diperlukan 5 pengulangan pada setiap kelompok perlakuan (15). Semua sampel janin kemudian dimasukkan ke dalam larutan NaCl 0,9%. Janin-janin yang akan diwarnai difiksasi dalam alkohol 96% dan selanjutnya dilakukan pewarnaan rangka, yaitu dengan menggunakan pewarnaan *Alizarin Red S* 0,01%. Gambar 1 menunjukkan hasil fiksasi dan pewarnaan *Alizarin Red S* pada janin mencit.



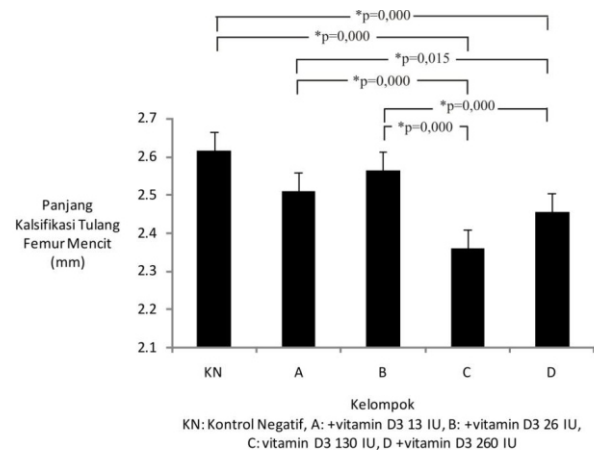
Gambar 1. Gambaran hasil fiksasi dan pewarnaan *Alizarin Red S* pada janin mencit (tanda panah menunjukkan bagian femur)

Penilaian kalsifikasi tulang pada hewan coba dinilai dengan melihat tulang femur janin mencit yang telah diwarnai dengan pewarnaan *Alizarin Red S* di bawah mikroskop cahaya (16). Penilaian dilakukan dengan mengukur panjang tulang femur janin mencit, tulang yang berukuran relatif panjang sehingga memudahkan pengukuran dalam penelitian. Analisis data menggunakan uji Analisis Varian (ANOVA) satu arah yang dilanjutkan

dengan uji *Least Significance Different* (LSD) dengan $\alpha=0,05$.

HASIL

Efek dari vitamin D₃ dinilai dengan mengukur panjang kalsifikasi tulang femur janin yang diwarnai dengan *Alizarin Red S*. Dari hasil penghitungan statistik ANOVA satu arah didapatkan bahwa panjang kalsifikasi tulang femur menunjukkan perbedaan yang bermakna yaitu ($p<0,05$). Rerata panjang kalsifikasi tulang femur janin mencit setelah perlakuan dan hasil analisis statistik LSD ditampilkan pada Gambar 2. Hasil analisis data menunjukkan terdapat perbedaan panjang kalsifikasi tulang femur janin mencit yang bermakna ($p<0,05$) antara kelompok kontrol negatif yang hanya diberi minyak dengan kelompok C yang diberi 130 IU vitamin D₃ dan juga dengan kelompok D yang diberi 260 IU vitamin D₃. Terdapat perbedaan panjang kalsifikasi tulang femur janin mencit yang bermakna ($p<0,05$) antara kelompok A yang diberi 13 IU vitamin D₃ dengan kelompok C yang diberi 130 IU vitamin D₃ dan juga dengan kelompok D yang diberi 260 IU vitamin D₃. Terdapat perbedaan panjang kalsifikasi tulang femur janin mencit yang bermakna ($p<0,05$) antara kelompok B yang diberi 26 IU vitamin D₃ dengan kelompok C yang diberi 130 IU vitamin D₃ dan juga dengan kelompok D yang diberi vitamin D₃ 260 IU ($p<0,05$). Hasil menunjukkan bahwa pemberian vitamin dosis tinggi (dibandingkan kondisi normal dan dosis anjuran) memberikan dampak panjang kalsifikasi tulang femur janin mencit yang lebih pendek.



Gambar 2. Rerata panjang kalsifikasi tulang femur janin mencit pada berbagai perlakuan

DISKUSI

Vitamin D dibutuhkan untuk mempertahankan konsentrasi kalsium pada kisaran fisiologis. Fungsi tersebut sangat penting karena ion kalsium bersifat esensial untuk berbagai proses seluler dan metabolisme. Selain diabsorpsi oleh usus, kalsium juga disimpan di tulang. Regulasi metabolisme vitamin D cukup kompleks, melibatkan kalsium, fosfor, dan berbagai hormon seperti hormon paratiroid dan *Fibroblast Growth Factor 23* (FGF 23) yang menghambat produksi 1,25(OH)₂ D₃ oleh ginjal (17). Vitamin D₃ bersifat unik karena dapat disintesis di subkutan kulit dari *7-dehydrocholecalciferol* oleh radiasi

UV dari sinar matahari atau didapat dari makanan (9). Vitamin D₃ dikonversi menjadi 25 OH D₃ di hati yang selanjutnya dihidroksilasi di ginjal atau organ lainnya menjadi 1,25 OH D₃ (kalsitriol), suatu hormon endogen yang berperan dalam pengikatan vitamin D ke reseptor vitamin D yang berada pada lebih dari 30 jenis jaringan. Kalsitriol menstimulasi transpor kalsium dan fosfat di usus dan resorpsi kalium dan fosfat di tulang. Kalsitriol menginduksi ligan *receptor activator of nuclear factor κB* (RANK) di osteoblas dan *osteocalcin* yang meregulasi proses mineralisasi (17).

Mekanisme aksi vitamin D₃ melalui bentuk hormonal yaitu dihidroksi vitamin D₃ melibatkan reseptor vitamin D yang meregulasi transkripsi sejumlah gen-gen target yang terlibat dalam homeostasis kalsium pada diferensiasi sel. Hipervitaminosis D terjadi ketika dosis farmakologis vitamin D dikonsumsi untuk periode yang lama atau megadosis tunggal menyebabkan peningkatan yang besar konsentrasi 25 OH D di peredaran darah (2). Pada penelitian ini, hipervitaminosis vitamin D terjadi karena pemberian vitamin D₃ dalam dosis tinggi yaitu 130 IU dan 260 IU yang setara dengan 50.000 IU dan 100.000 IU pada manusia.

Vitamin D dan hormon paratiroid merupakan mediator penting dalam regulasi kalsium di tulang. Defisiensi vitamin D menyebabkan penurunan absorpsi kalsium dari usus dan penurunan reabsorpsi kalsium dari ginjal sehingga dapat menyebabkan penurunan kadar kalsium serum yang berperan di dalam kalsifikasi. Selain itu vitamin D juga berperan di dalam *remodeling* tulang yang bertujuan untuk mengganti matriks tulang yang lama dengan yang baru melalui resorpsi tulang dan pembentukan matriks tulang. Vitamin D berperan dalam aktivasi osteoklas yang berperan dalam resorpsi tulang, sehingga bila didapatkan kadar vitamin D yang tinggi maka resorpsi tulang akan lebih dominan dibanding dengan kalsifikasinya. Jadi dengan kata lain, defisiensi vitamin D

akan menyebabkan pengurangan mineral tulang, sedangkan vitamin D dosis tinggi akan meningkatkan resorpsi tulang sehingga defisiensi maupun vitamin D berlebih mengganggu kalsifikasi tulang (18).

Dari hasil penelitian diketahui mencit-mencit yang diberi vitamin D₃ dosis tinggi yaitu perlakuan C dan D memiliki kalsifikasi tulang femur janin mencit yang lebih pendek dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, kelompok A, dan kelompok B (dengan dosis sesuai anjuran). Suplementasi vitamin D₃ dosis tinggi yang menyebabkan penurunan kalsifikasi tulang femur pada janin mencit pada penelitian ini akibat absorpsi kalsium dari tulang yang meningkat. Vitamin D pada tulang akan mengaktifkan *receptor activator of nuclear factor κB ligand* (RANKL) pada osteoblas yang akan berikatan dengan *receptor activator of nuclear factor κB* (RANK) pada osteoklas sehingga terjadi resorpsi tulang yang akan meningkatkan kalsium pada plasma. Kadar vitamin D yang berlebihan akan menyebabkan osteoklas lebih aktif dibandingkan dengan osteoblas sehingga resorpsi tulang akan meningkat dan pembentukan tulang akan terganggu (19). Pada keadaan hiperkalsemia akibat overdosis vitamin D, yaitu kadar kalsium dalam darah yang tinggi akibat peningkatan kalsium dari saluran pencernaan, terjadi penurunan aktivitas hormon paratiroid. Hal ini menyebabkan ekskresi kalsium melalui urin meningkat sehingga proses kalsifikasi tulang menurun (20). Hal ini didukung penelitian sebelumnya mengenai hipervitaminosis D₃ yang menyebutkan bahwa pemberian vitamin D₃ dosis tinggi pada embrio ayam menyebabkan terlambatnya pembentukan trabekula tulang (21). Hipervitaminosis D₃ pada induk mencit yang bunting dapat menyebabkan penurunan masa tulang dan mineral pada embrio mencit serta mengarah kepada kematian neonates (11). Penelitian ini membuktikan bahwa pemberian vitamin D₃ dosis tinggi menurunkan kalsifikasi tulang femur janin mencit.

DAFTAR PUSTAKA

1. de Paula FJA and Rosen CJ. *Vitamin D Safety and Requirements*. *Archives Biochemistry Biophys*. 2012; 523(1): 64-72.
2. Alshahrani F and Aljohani N. *Vitamin D: Deficiency, Sufficiency and Toxicity*. *Nutrients*. 2013; 5(9): 3605-3616.
3. Hewison M, Zehnder D, Bland R, and Stewart PM. *1α-Hydroxylase and the Action of Vitamin D*. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2000; 25(2): 141-148.
4. Holick MF, Chen TC, Lu Z, and Sauter E. *Vitamin D and Skin Physiology: a D-lightful Story*. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2007; 22(S2): v28-33.
5. Hollis BW and Wagner CL. *Assessment of Dietary Vitamin D Requirements during Pregnancy and Lactation*. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 79(5): 717-726.
6. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, et al. *The 2011 Report on Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D from the Institute of Medicine: What Clinicians Need to Know*. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2011; 96(1): 53-58.
7. Robinson S, Nelson-Piercy C, Harvey NC, Selby P, and Warner JO. *Vitamin D in Pregnancy*. London, England: Scientific Impact Paper No. 43. London, England: Royal College of Obstetricians and Gynaecologists: 2014.
8. Cannell JJ, Vieth R, Umhau JC, et al. *Epidemic Influenza and Vitamin D*. *Epidemiology and Infection*. 2006; 134(6): 1129-1140.
9. De-Regil LM, Palacios C, Ansary A, Kulier R, and Peña-Rosas JP. *Vitamin D Supplementation for Women during Pregnancy*. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012; 2.
10. Holick MF. *Vitamin D Deficiency: What a Pain It Is*. *Mayo Clinic Proceeding*. 2003; 78(12): 1457-1459.
11. Lieben L, Stocksman I, Moermans K, and Carmeliet G. *Maternal Hypervitaminosis D Reduces Fetal Bone Mass and Mineral Acquisition and Leads to Neonatal Lethality*. *Bone*. 2013; 57(1): 123-131.
12. Deb K, Reese J, and Paria BC. *Methodologies to Study Implantation in Mice*. In: Soares MJ and Hunt JS (Eds). *Placenta and Trophoblast: Methods and Protocols Volume 1*. Totowa: Humana Press; 2006: pp. 9-34.
13. Paget GE and Barnes JM. *Toxicity Tests in Evaluation of Drug Activities Pharmacometrics*. In: Laurence DR and Bacharach AL (Eds). London: Academic Press; 1964: pp. 161.

14. Martin P. *Tissue Patterning in the Developing Mouse Limb*. The International Journal of Developmental Biology. 1990; 34(3): 323-336.
15. Kemas AH. *Buku Metode: Dasar-dasar Ilmu Tanah*. Jakarta: Rajagrafindo Persada; 2005.
16. Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland, England: Sinauer Associates; 2000.
17. Kumar A and Malhotra P. *Vitamin D: Pharmacology of an Essential Micronutrient*. Journal International Medical Sciences Academy. 2014; 27(4): 226-228.
18. Kini U and Nandeesh BN. *Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism*. In: Fogelman I, Gnanasegaran G, and Van der Wall H (Eds). *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*. Verlag Berlin Heidelberg: Springer; 2012: pp. 29-57.
19. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, and Aster J. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8th edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010.
20. Guyton AC and Hall JE. *Human Physiology*. 15th edition. New York: Elsevier; 2014.
21. Narbaitz R and Fragiskos B. *Hypervitaminosis D in the Chick Embryo: Comparative Study on the Activity of Various Vitamin D₃ Metabolites*. Calcified Tissue International. 1984; 36(4): 392-400.